



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

Posgrado en Ciencias en Biología Molecular

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES
DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) INDUCIDOS POR
ESTRÉS SALINO**

Tesis que presenta

Eloísa Hernández Lucero

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

En la opción de

Biología Molecular

Director de la tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

San Luis Potosí, S.L.P, Enero de 2009



CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS

La tesis “IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) INDUCIDOS POR ESTRÉS SALINO” presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias en la opción de Biología Molecular, fue elaborada por **Eloísa Hernández Lucero** y aprobada el 06 de enero de 2009 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. Angel Gabriel Alpuche Solís
Asesor de la Tesis

Dr. Juan Gabriel Ramirez Pimentel
Asesor de la Tesis

Dra. Margarita Rodriguez y Dominguez-Kessler
Asesor de la Tesis



CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis fue elaborada en 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 (No. de registro 172353)

Una parte de esta tesis, lo relacionado con el trabajo de las líneas mutantes insercionales de *Arabidopsis thaliana*, se desarrolló en el Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en Madrid, España, en el laboratorio de Biología Molecular de Plantas, bajo la asesoría del Dr. Julio Salinas Muñoz (Abril a Septiembre 2008)



IPICYT

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 020 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 12 días del mes de enero del año 2009, 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. Juan Gabriel Ramírez Pimentel	Presidente	ITA
Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler	Secretario	UNAM
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Sinodal	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT

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

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Eloísa Hernández Lucero

sobre la Tesis intitulada:

Identificación y caracterización de genes de frijol (Phaseolus vulgaris L.) inducidos por estrés salino

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

El Jurado, después de deliberar, determinó

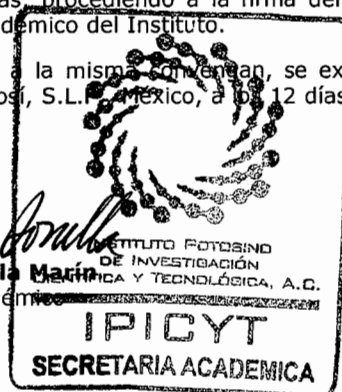
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma conciernan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 12 días del mes de enero de 2009.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Martín
Secretario Académico



DEDICATORIA

Con todo mi amor...

A mis padres

A mis hermanas

A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Juan Gabriel Ramírez Pimentel, Ángel Gabriel Alpuche Solís y Margarita Rodríguez y Domínguez-Kessler por sus valiosas aportaciones a mi trabajo y por su tiempo para realizar la revisión de mi tesis.

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, por haberme permitido trabajar en su grupo de investigación durante todo este periodo del doctorado.

Al Dr. Oscar Ruiz, por permitirme aprender y convivir en su laboratorio en el IIB-INTECH, Argentina. Agosto a Noviembre de 2004.

Al Dr. Julio Salinas Muñoz, por permitirme realizar una estancia de investigación en su laboratorio en el CIB/CSIC de España, de la cual me llevé un gran aprendizaje. Abril a Septiembre 2008.

Al grupo de investigación del Dr. Ruiz que me apoyaron siempre y por su disponibilidad para resolver mis dudas.

A todo el grupo de investigación del Dr. Salinas en el CIB que me brindaron todo su apoyo, su tiempo y paciencia para la realización de mi trabajo de investigación.

A la M. en C. Alicia Becerra Flora por todo su apoyo técnico en la determinación de parámetros en plantas como prolina y algunos iones mediante tecnología de absorción atómica.

Al Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT-Gobierno del Estado de Guanajuato. Proyecto FOMIXGTO-04-CO2-41

A la Agencia Española de Cooperación Internacional por beneficiarme con el otorgamiento de una Beca MAEC para llevar a cabo la estancia de investigación en Madrid, España.

A mis amigos, quienes me brindaron todo su apoyo y su cariño en esos momentos más difíciles.

CONTENIDO

CONTENIDO	vii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xv
1. <u>INTRODUCCION</u>	1
2. <u>ANTECEDENTES</u>	5
2.1 El estrés en plantas	5
2.2 El estrés abiótico	6
2.2.1 Efecto del estrés abiótico sobre las plantas	6
2.2.2 Salinidad	6
2.2.2.1 Salinidad en suelos mexicanos	7
2.2.2.2 Efecto de la salinidad en las plantas	8
2.2.2.3 Respuestas fisiológicas de las plantas a la salinidad	9
2.2.2.4 Respuestas moleculares de las plantas a la salinidad	11
2.2.3 Ácido abscísico y estrés abiótico	12
2.2.4 Genes de respuesta a estrés abiótico	14
2.3 Poliaminas	20
2.3.1 Función de las poliaminas en plantas	22
2.3.2 Función de las poliaminas durante el estrés	22
2.3.3 Poliaminas y ácido abscísico	27
3. <u>MODELOS DE ESTUDIO</u>	29
3.1 FRIJOL (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	29
3.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
4. <u>OBJETIVOS</u>	33
5. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	34
5.1 Material vegetal	34
5.1.1 Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	34
5.1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
5.2 Condiciones de crecimiento	34
5.2.1 Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	34
5.2.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	35

5.3 Tratamientos de estrés	36
5.3.1 Aplicación exógena de NaCl, poliaminas y prolina: tratamiento a largo plazo	36
5.3.2 Tratamientos salinos con NaCl	36
5.3.3 Tratamientos con PAs, ABA, NaCl y estrés por frío a corto plazo	37
5.3.4 Tratamientos de estrés salino para la construcción de la biblioteca sustractiva	38
5.4 Análisis bioquímicos y fisiológicos	38
5.4.1 Determinación de poliaminas	38
5.4.2 Determinación de prolina	39
5.4.3 Determinación de clorofila	39
5.4.4 Determinación de potencial hídrico	39
5.5 Experimentos para el análisis de fenotipo en <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
5.6 Técnicas moleculares	40
5.6.1 Extracción de RNA total de <i>P. vulgaris</i>	40
5.6.2 Extracción de DNA genómico de <i>A. thaliana</i>	41
5.6.3 Extracción de RNA total de <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
5.6.4 Construcción de una biblioteca sustractiva de <i>P. vulgaris</i> bajo estrés salino	42
5.6.5 Clonación de un nuevo gen S-adenosilmetionina descarboxilasa (<i>Pvsamdc1</i>)	43
5.6.6 Ensayos de transcripción reversa (RT-PCR)	44
5.6.7 Amplificación de los genes biosintéticos de poliaminas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	44
5.6.8 Amplificación por PCR de genes aislados en la SSH de <i>P. vulgaris</i>	45
6. RESULTADOS	49
6.1 Acumulación de prolina en dos variedades de frijol bajo estrés salino y el efecto de poliaminas y ornitina exógenas	49
6.2 Efecto del estrés salino en el metabolismo de poliaminas en dos variedades de frijol	54
6.3 Respuesta diferencial de los genes biosintéticos de poliaminas a estrés abiótico y la aplicación de ácido abscísico en dos variedades de frijol	63
6.4 Aislamiento e identificación de genes inducidos por estrés salino	88
7. DISCUSION GENERAL	120
8. BIBLIOGRAFIA	126
9. APENDICE	146

LISTA DE TABLAS

1. **Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes biosintéticos de poliaminas 45
2. **Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes aislados en la biblioteca sustractiva, que fueron seleccionados para los análisis de RT-PCR 46
3. **Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de interés en las líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* 47

LISTA DE FIGURAS

- | | |
|---|----|
| 1. Figura 1. Metabolismo general de las poliaminas | 21 |
| 2. Figura 2. Gráfica representativa de la superficie total sembrada y la participación del promedio anual de los cuatro cultivos principales en México | 30 |
| 3. Figura 3. Protocolo general para la construcción de la biblioteca sustractiva | 43 |

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ABRE	Elemento de respuesta a ABA
ADC	Arginina descarboxilasa
Col. 0	Ecotipo Columbia 0 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Conductividad eléctrica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica
EST	Etiqueta de secuencia expresada
GRMP	Proteína con un motivo rico en glicina
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HSP	Proteína de choque térmico
LEA	Proteínas abundante en la embriogénesis tardía
ORF	Marco de lectura abierto
PAs	Poliaminas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Put	Putrescina
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa
SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
sHSP	Proteína de choque térmico de bajo peso molecular
Spd	Espermidina
SPDS	Espermidina sintasa
Spm	Espermina
SSH	Hibridación sustractiva por supresión
TAIR	Base de datos genéticos y moleculares de <i>Arabidopsis</i>
uORF	Marco de lectura abierto localizado en la región UTR
UTR	Región no traducida

RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación fue aislar e identificar genes inducidos por estrés salino en una variedad de frijol reportada como tolerante a estrés hídrico. Por lo tanto los pasos preliminares para alcanzar dicho objetivo fueron llevar a cabo un análisis comparativo entre la variedad Pinto Villa, tolerante a sequía, y la variedad Canario 60, sensible a sequía. Para iniciar este estudio, se analizaron parámetros bioquímicos y fisiológicos como el contenido de poliaminas, prolina, clorofila, así como el potencial hídrico de las hojas (Ψ_w) para caracterizar la respuesta de estas variedades de frijol bajo el tratamiento con NaCl; obteniendo que la variedad Pinto Villa fue la más tolerante a estrés salino en comparación con la variedad Canario 60.

En base a los resultados anteriores se decidió continuar el estudio construyendo una biblioteca sustractiva en la variedad tolerante de frijol Pinto Villa bajo estrés salino, a partir de la cual se identificaron 71 unigenes potencialmente inducidos bajo esta condición. Los genes identificados fueron clasificados en 8 categorías funcionales: genes relacionados a estrés (41 %), mantenimiento celular y desarrollo (22 %), transporte (10 %), fotosíntesis y cloroplasto (7 %), factores transcripcionales (6 %), señalización (4 %), fotorespiración (4 %) y otros (6 %). La expresión de ocho de estos genes aislados en la biblioteca sustractiva: el factor transcripcional ATHB-12, una proteína DNAJ de choque térmico, una LEA-18, la subunidad E de una ATPasa vacuolar, una dehidrina, una metalotioneína tipo 2, una S-adenosilmetionina sintasa y una acuaporina, fue analizada mediante ensayos de RT-PCR semicuantitativa tanto en la variedad tolerante de frijol Pinto Villa, a partir de la cual fueron aislados, como en la variedad sensible Canario 60, y de esta manera se confirmó su expresión diferencial. Los genes más sobreexpresados en Pinto Villa fueron el factor ATHB-12 y los que codifican a las proteínas ATPasa vacuolar, LEA-18 y S-adenosilmetionina sintasa.

En la biblioteca sustractiva de frijol bajo estrés salino, el unigen 31 corresponde a un fragmento de cDNA del gen S-adenosilmetionina descarboxilasa 1 (*samdc1*), el cual es parálogo al gen *Pvsamdc2* de frijol descrito anteriormente por nuestro grupo de investigación. Posteriormente, nos dimos a la tarea de obtener el marco de lectura abierto del nuevo gen de *samdc*, utilizando oligonucleótidos diseñados en el unigen 31 (que incluye parte del UTR-5' y 305 nt del marco de lectura abierta) y un oligonucleótido diseñado al final del marco de lectura abierta del gen *Pvsamdc2*. De esta manera, logramos aislar 1230 nt del cDNA del gen *Pvsamdc1* con número de acceso GenBank EF580132. Dicho gen (*Pvsamdc1*), junto a otros genes de la biosíntesis de poliaminas (*Pvadc*, *Pvsamdc2*, *Pvspds*), aislados previamente por nuestro grupo, fueron analizados transcripcionalmente bajo estrés salino así como con otros tratamientos tales como frío, ácido abscísico y poliaminas exógenas. Con este experimento se pudo observar que la variedad Pinto Villa responde más activamente a la adición exógena de poliaminas respecto a Canario 60, y además que *Pvadc*, *Pvsamdc1*, *Pvsamdc2* y *Pvspds* son genes que responden a ácido abscísico en las condiciones analizadas en el cultivar tolerante Pinto Villa.

Consecutivamente, con el propósito de realizar una caracterización funcional de algunos de estos genes identificados en la SSH de frijol bajo estrés salino, seleccionamos cinco de ellos: el unigen-29 ATJ3 (homólogo de DNAJ), el unigen-67 MTN3 de función desconocida, el unigen-52 que es una proteína con un motivo rico en glicinas (GRMP), el unigen-21 una ribonucleoproteína de cloroplasto de 31 KDa y el unigen-61, un transportador de oligopéptidos dependiente de protones (POT). De estos 5 genes seleccionados aislados en la SSH de frijol, nos dimos a la tarea de buscar los genes ortólogos en la planta modelo de *Arabidopsis thaliana*. De esta manera, nuestro siguiente objetivo fue la realización de estudios de pérdida de función, por lo que seleccionamos y adquirimos líneas mutantes insercionales del banco ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center) de Arabidopsis correspondientes a los cinco genes seleccionados. Se tipificaron molecularmente líneas homocigotas de los cinco genes, las cuales fueron analizadas por RT-PCR para demostrar la ausencia del transcrito. De las líneas mutantes para los genes

ATJ3, MTN3 y GRMP obtuvimos plantas donde no amplificamos dichos transcritos logrando así líneas Knock-out (KO). Estas tres líneas mutantes insercionales de T-DNA que no expresan los genes ATJ3, MTN3 y GRMP se sometieron a diversos agobios abióticos como estrés hídrico, salino y osmótico, en donde encontramos un fenotipo de sensibilidad en la mutante correspondiente al gen GRMP bajo estrés salino. Con estos datos se puede inferir la importancia que tiene el gen AtGRMP en respuesta al estrés salino.

ABSTRACT

The main goal of the present investigation was the isolation and identification of salt induced genes in a drought tolerant bean cultivar. The first step to achieve such objective was to conduct a comparative analysis in two bean cultivars, Pinto Villa and Canario 60, tolerant and sensitive to water stress respectively. Biochemical and physiological parameters like polyamine content, proline, chlorophyll, as well as leaf water potential (Ψ_w), were analyzed in order to characterize the response of both bean cultivars to NaCl treatment. The results demonstrated that the Pinto Villa cultivar has a major salt tolerance respect to Canario 60.

Based on the above results we decided to continue the study with a Suppression Subtractive Hybridization (SSH) in the tolerant cultivar Pinto Villa under salt stress, from which 71 unigenes potentially induced by this condition were isolated. The identified genes were classified into 8 functional categories: genes related to stress (41 %), cell maintenance and development (22 %), transport (10 %), photosynthesis and chloroplast (7 %), transcriptional factors (6 %), signaling (4 %), photorespiration (4 %) and other (6 %). Eight of these genes isolated, the transcription factor ATHB-12, the heat shock protein DNAJ, the LEA-18, the E subunit of vacuolar ATPase, the dehydrin, the type 2 metallothionein, the S-adenosylmethionine-synthase and the aquaporin, were selected for expression assays by RT-PCR in both cultivars, the tolerant Pinto Villa, from which they were isolated, and the sensitive Canario 60 and thus confirmed their differential expression. The most induced genes in Pinto Villa were the factor ATHB-12 and those coding the vacuolar ATPase, LEA-18 and S-adenosylmethionine synthase proteins.

In the bean SSH under salt stress, the unigene 31 corresponds to a cDNA fragment of the S-adenosylmethionine decarboxylase 1 (*samdc1*), which is a paralogous of the bean *Pvsamdc2* reported previously by our group. Subsequently, we found the task of getting the open reading frame of the new *samdc* gene by using a forward primer designed on the unigene 31 (which includes part of the

UTR-5' and 305 bases of the open reading frame) and a reverse primer at the end of the open reading frame of the gene *Pvsamdc2*. In this way we amplified a 1230 bases long cDNA fragment of the *Pvsamdc1* gene, which was registered with the GenBank access number EF580132. The new *Pvsamdc1*, along with others genes of the polyamine biosynthesis (*Pvadc*, *Pvsamdc2* and *Pvspds*) previously reported by our group, were analyzed transcriptionally under salt stress as well as with other treatments such as cold, abscisic acid and exogenous polyamines. With this experimented it was noted that the cultivar Pinto Villa responds more actively to the addition of exogenous polyamines respect to Canario 60, and further that *Pvadc*, *Pvsamdc1*, *Pvsamdc2* and *Pvspds* are abscisic acid responsive genes in the Pinto Villa cultivar under the tested conditions.

Consecutively, in order to perform a functional characterization of some of these genes identified by the salt stressed bean SSH, we selected five of them: the unigene-29 a ATJ3 (DNAJ homologue), the unigene-67 a MTN3 of unknown function, the unigene-52 which is glycine rich motif protein (GRMP), the unigene-21 a 31 KDa chloroplast ribonucleoprotein and the unigene-61 a proton dependent oligopeptide transporter (POT). From these five unigenes selected in the bean SSH, we looked for their orthologous in the model plant *Arabidopsis thaliana*. In this way, our next goal was the study of lost of function, for which we selected and acquired *Arabidopsis* insertional mutant lines from the ABRC bank (Arabidopsis Biological Resource Center) corresponding to these five genes. These lines were molecularly typified for homozygous and then were analyzed by RT-PCR to confirm the transcript absence. From mutant lines for ATJ3, MTN3 and GRMP, we obtained knock out (KO) plants which were subjected to several abiotic stresses like drought, salt and osmotic stress, where we found a sensitive phenotype in the GRMP mutant line for salt stress. With these data, it could be inferred the importance of the AtGRMP gene in response to salt stress.

1. INTRODUCCIÓN

El detrimento más evidente relacionado con el estrés abiótico se observa en la agricultura. Se ha estimado que el estrés abiótico causa las pérdidas más importantes de los cultivos que cualquier otro factor, reduciendo su potencial de rendimiento en más del 50 % (Wang et al., 2007). También se ha contemplado que esta reducción en el rendimiento empeorará debido a los cambios climáticos que está sufriendo el planeta hoy en día (Lane y Jarvis, 2007). La importancia de la salinidad del suelo para el rendimiento de la producción agrícola es enorme. Las tierras de riego se encuentran particularmente en riesgo con aproximadamente un tercio afectado por salinidad. A pesar de su relativamente pequeña área, se estima que las tierras bajo riego producen un tercio de la alimentación mundial (Munns, 2002), siendo la salinización de este recurso particularmente crítica. El estrés salino provocado por el NaCl puede dañar o reducir casi todas las funciones de las plantas. Interfiere con la absorción de agua y aumenta la acumulación de Na⁺, lo cual da lugar a un desequilibrio de los elementos minerales y perturba las reacciones bioquímicas celulares. El metabolismo celular, fisiológico y bioquímico, así como las actividades fotosintéticas son afectadas de manera adversa por el estrés salino (Sairam y Tyagi, 2004).

La respuesta de las plantas a la salinidad consiste en numerosos procesos que deben funcionar coordinadamente para aliviar tanto la hiperosmolaridad celular como el desequilibrio iónico (Yokoi et al., 2002). Además, las plantas de cultivo deben ser capaces de producir una biomasa satisfactoria aún en un ambiente adverso. Se ha reportado que algunas plantas toleran mejor que otras una alta salinidad en suelo, por lo tanto el rendimiento en su producción no se ve muy reducido. Esta variabilidad se presenta inclusive en especies de plantas estrechamente relacionadas, entre diferentes variedades o aún en individuos dentro de una línea de varietales (Hasegawa et al., 2000). Estas diferencias entre plantas estrechamente relacionadas son de particular interés, ya que gracias a eso

es posible identificar un pequeño número de factores involucrados en la tolerancia a la salinidad.

Los posibles enfoques para mejorar la productividad de los cultivos bajo condiciones ambientales adversas requieren una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la respuesta al estrés abiótico. Los recientes avances en el esclarecimiento de las vías de señalización activadas por el estrés salino y de los efectores que medían la homeostasis, han abierto la posibilidad de desarrollar estrategias biotecnológicas potenciales para obtener plantas de cultivo tolerantes a la salinidad. Las herramientas moleculares disponibles en la actualidad, nos ayudarán a mejorar nuestra comprensión de la genética de la tolerancia al estrés abiótico lo que nos permitirá abordar la complejidad de las respuestas de estrés en una escala más amplia. El entendimiento del patrón de activación de la expresión de genes durante el estrés abiótico, permitirá conocer las interrelaciones de los múltiples sistemas de señalización que controlan la respuesta adaptativa.

Las leguminosas, debido a su capacidad para fijar nitrógeno, son candidatos interesantes para el mejoramiento de la fertilidad del suelo y para ayudar a reintroducir la agricultura a estas tierras (Crespi y Gálvez, 2000). Las leguminosas son muy importantes tanto económicamente en la agroindustria como ecológicamente debido a su habilidad para fijar nitrógeno en los nódulos de sus raíces gracias a la simbiosis con bacterias; sin embargo, como la mayoría de las plantas, son muy sensibles a altos niveles de sal y el estado de deshidratación del suelo, experimentando déficit hídrico debido al estrés osmótico acoplado a perturbaciones bioquímicas inducidas por el flujo de iones Na^+ . Las consecuencias fisiológicas causadas por el estrés en leguminosas dependen de las características específicas de estas plantas, por ejemplo, la reducción en la producción de fotosintato debido a un estrés ambiental influye rápidamente en la función del nódulo de la raíz, en el crecimiento del brote y la raíz así como los procesos de llenado del grano (Crespi, 2007).

A pesar de su importancia como cultivos alimentarios, la investigación en leguminosas de grano como el frijol, siempre ha estado un poco detrás del sector económicamente más importante, el de los cereales, pero recientemente se ha comenzado a dar un gran paso, en donde varias iniciativas internacionales han surgido con el objetivo de llevar a cabo investigación en el ámbito de la genómica y transcriptómica de las leguminosas. Estas acciones son de gran relevancia ya que desafortunadamente no se cuenta en la actualidad con las herramientas suficientes para la manipulación genética de esta familia; por ejemplo, en el caso particular del frijol, el genoma de éste aún no está secuenciado y tampoco existe un método de transformación eficiente, aunque actualmente se está trabajando en la generación de raíces transgénicas en plantas compuestas (hairy roots) mediante la bacteria *Agrobacterium rhizogenes*. De ahí la importancia de trabajos como el presente, que contribuyen al conocimiento sobre este sistema y que aporta datos interesantes sobre el mecanismo de defensa de estas plantas ante una situación de agobio.

Para estudiar los efectos de la salinidad y establecer las potenciales bases moleculares de la tolerancia de frijol a estrés salino, se llevó a cabo un análisis comparativo entre la variedad Pinto Villa, previamente reportada como tolerante a sequia y la variedad Canario 60, como sensible (Acosta-Gallegos et al., 1995; Terán y Singh, 2002; Rosales-Serna et al., 2004; Acosta-Gallegos, comunicación personal). Para empezar, se llevó a cabo un estudio bioquímico y fisiológico comparando las dos variedades; se analizaron las diferencias en el contenido de poliaminas (PAs), prolina, clorofila, así como el potencial hídrico (Ψ_w) de las hojas en condiciones normales y bajo estrés salino. Los parámetros anteriores fueron la base para continuar el estudio construyendo una genoteca sustractiva en la variedad de frijol tolerante Pinto Villa, bajo condiciones de estrés salino utilizando 200mM de NaCl a 2 y 5 días, a partir de la cual se aislaron 71 unigenes potencialmente inducidos bajo dicha condición de estrés. De estos genes fueron seleccionados ocho para confirmar su sobreexpresión mediante RT-PCR, y se

desarrolló este estudio tanto en la variedad tolerante Pinto Villa con en la sensible Canario 60, identificando diferencias importantes en la expresión génica.

Con la finalidad de caracterizar funcionalmente algunos de los genes identificados en la genoteca sustractiva de frijol, se seleccionaron cinco de ellos cuyos ortólogos fueron estudiados en líneas mutantes de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Los genes seleccionados fueron ATJ3 (un homólogo de DNAJ), MTN3, una proteína con un motivo rico en glicina (GRMP), una ribonucleo-proteína de cloroplasto de 31 KDa y un transportador de oligopéptidos dependiente de protones (POT). De los tres primeros se obtuvieron plantas homocigotas mutantes insercionales de T-DNA por lo que se sometieron a diversas condiciones de estrés abiótico, tales como estrés hídrico, salino y osmótico, de esta manera se encontró que la proteína con un motivo rico en glicina presentaba un fenotipo de sensibilidad ante el estrés salino, con lo cual se infiere que este gen GRMP puede jugar un papel importante en la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés salino.

Entre los ESTs (Expressed Sequence Tag) obtenidos en la biblioteca sustractiva, se encontraron dos secuencias idénticas pertenecientes a la región UTR-5' de un gen de la *samdc*, conteniendo el característico marco de lectura abierto localizado en la región 5'UTR (uORF) que ha sido reportado en la mayoría de los transcritos de las *samdc*'s de plantas. Al comparar las secuencias de estos EST's con el uORF del gen *Pvsamdc2* aislado previamente por nuestro grupo de investigación (Jiménez-Bremont et al. 2006), resultó ser diferente, por lo cual se procedió a amplificar, clonar y secuenciar el nuevo gen, reportado en este trabajo como *Pvsamdc1*.

Por último, se estudió el efecto del estrés salino en hojas de frijol analizando la expresión de los principales genes involucrados en la biosíntesis de PAs, *Pvadc*, *Pvsamdc2* y *Pvspds*, así como el nuevo gen aislado *Pvsamdc1*; y finalmente, se llevó a cabo un análisis a nivel transcripcional de estos mismos genes para observar el efecto de otros tratamientos, tales como frío, ABA y PAs exógenas.

2. ANTECEDENTES

2.1 El estrés en las plantas

El ser humano es reformador y destructor de sí mismo y de la sociedad. Con el adelanto de la civilización humana, y el consiguiente progreso en la industrialización, las tecnologías geológicas y geohidrológicas, la generación de energía térmica e hidroeléctrica, la gestión de tecnologías para la conservación del agua, y el creciente uso y demanda de energía nuclear y de combustibles fósiles, las condiciones ambientales están cambiando, y están surgiendo nuevos problemas para todos los seres vivos, incluyendo el reino vegetal.

Por otro lado, el crecimiento de la población mundial aunado a la reducción de las tierras cultivables disponibles para mantener una agricultura sustentable (Cassman, 2003), implica que la importancia relacionada al cultivo de plantas para incrementar el rendimiento de la cosecha y la capacidad de adaptación, es ahora mayor que en el pasado (Slafer et al., 1999; Araus et al., 2002).

De manera global, el estrés se produce como la consecuencia de una interrupción en la homeostasis de un organismo causado por un factor externo. Las plantas están sometidas a una amplia variedad de factores que les pueden inducir estrés, provocando un efecto negativo en su crecimiento y desarrollo. Estos factores pueden ser microorganismos como hongos, bacterias y virus, y también insectos, provocándole un estrés biótico. Los factores de estrés abiótico incluyen sequía, temperaturas extremas, salinidad del suelo, toxicidad química, estrés oxidativo, entre otros, y representan una grave amenaza para la agricultura y los recursos naturales.

2.2 El estrés abiótico

2.2.1 Efecto del estrés abiótico sobre las plantas

Como se mencionó anteriormente, el estrés abiótico es el impacto negativo de factores que no forman parte o no son producto de los seres vivos sobre las plantas. La variable abiótica debe influir en el medio ambiente por encima de su rango normal de variación para afectar negativamente el rendimiento de la población o la fisiología individual del organismo en una manera significativa (Vinebrooke et al., 2004).

Debido a su naturaleza sésil, las plantas están expuestas constantemente a una multitud de estreses ambientales, y la única manera de hacer frente a estas condiciones adversas es a través de cambios fisiológicos, morfológicos, bioquímicos y moleculares. Sin embargo, la capacidad de éstas para adaptarse a tales condiciones es usualmente limitada debido a la velocidad y severidad del estrés. El estrés abiótico afecta negativamente la supervivencia de la planta, la producción y la acumulación de biomasa, y el rendimiento del grano en la mayoría de los cultivos (Grover et al., 1998; Khanna-Chopra y Sinha, 1998; Khush y Baenziger, 1998).

2.2.2 Salinidad

La salinidad es uno de los estreses abióticos más importantes que afectan la productividad y el desarrollo de las plantas alrededor del mundo. En áreas agrícolas, la salinidad afecta el crecimiento, el desarrollo y la productividad de las plantas causando pérdidas de los cultivos completos; la mayoría de los cultivos de interés comercial son sensibles a concentraciones de sales relativamente bajas.

El término salinidad se refiere a la presencia en el suelo de una elevada concentración de sales que perjudican a la planta por su efecto tóxico y la disminución del potencial osmótico del suelo. Esta se presenta por procesos naturales o puede ser inducida por los humanos. La situación más frecuente de la salinidad es por la presencia de NaCl. Un suelo salino se define como aquel que

tiene una alta concentración de sales solubles, lo suficientemente alta para afectar el crecimiento de las plantas (Blaylock, 1994). La concentración de sal en suelo es medida en términos de su conductividad eléctrica (EC_e). El laboratorio de Salinidad del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) define como suelo salino el que presenta una EC_e igual o mayor a 4 dS/m, equivalente a 70 mM de NaCl.

De acuerdo a la FAO (Land and Plant Nutrition Management Service), alrededor del 6 % de la superficie mundial está afectada por salinidad, incluyendo más de 400 millones de hectáreas. De las tierras que se cultivan en el mundo, una significativa proporción están afectadas por salinidad en diversos grados. De las actuales 230 millones de hectáreas de tierras irrigadas, 45 millones son salinas (19.5 %) y de los 1500 millones de hectáreas que se cultivan en tierras con sequía, 32 millones están afectadas en diversos grados (2.1 %).

2.2.2.1 Salinidad en suelos mexicanos

La degradación del suelo en México debido a la salinidad está fuertemente asociada a los esquemas de irrigación así como a la mala gestión del agua en todas las áreas irrigadas del país. Toda la información concerniente al estado de salinidad del suelo en México corresponde a los distritos de irrigación, sin considerar las pequeñas y numerosas unidades de irrigación en donde la información usualmente es limitada. Las áreas salinas más extensas se encuentran en las tierras cultivadas. En promedio, el 25 % del área de los diez distritos de irrigación en México están afectados por salinidad y en algunos casos, esta zona alcanza hasta el 70 %, como en el caso del valle de Ciudad Juárez (FAO, AGL, 2000).

Se estima que aproximadamente del 20 al 30 % de los 5.5 millones de hectáreas de tierras irrigadas en México han sido afectadas por salinidad en algún grado, considerando una EC_e mayor de 4 dS/m como el indicador básico de exceso de sales solubles en el extracto de saturación del suelo. El riego en surco es

prácticamente el único sistema de riego utilizado en México y la falta de dispositivos adecuados para medir los volúmenes de agua depositados a los distintos campos, junto con la creencia errónea de que cuanto más agua se aplique es lo mejor para el cultivo, resulta en deficientes aplicaciones en todos los distritos de riego. Una mayor eficiencia en los sistemas de riego y una gestión adecuada del suelo (la configuración y nivelación de la tierra, y las prácticas de regeneración del suelo) son factores adicionales que deberían ser considerados con la finalidad de incrementar la eficiencia del sistema completo. La principal fuente de salinidad en la superficie mexicana es básicamente el pobre manejo del agua, que incluye una aplicación excesiva de agua a los cultivos, una baja calidad del agua e inapropiados o inexistentes sistemas de drenaje (FAO, AGL, 2000).

Para la agricultura en las zonas costeras, los sedimentos marinos son el problema más serio, ya que tanto el viento como las mareas promueven que la brisa salada pase hasta 10 km hacia el interior de la costa y una vez que el agua se evapora, las sales quedan depositadas en la superficie (FAO/AGL, 2000). Casos típicos en México son localizados en los distritos de Bajo Río Bravo y Bajo Río San Juan así como en las regiones de San Fernando y Soto La Marina, todos ellos localizados en el noreste de México. La intrusión salina se deriva de acuíferos descubiertos, principalmente de las llanuras costeras, en donde el agua salada de las capas profundas es cada vez más bombeada hacia el exterior. Este es uno de los principales problemas en los valles de Santo Domingo, Hermosillo y Guaymas al noroeste de México. La evaporación y la acumulación de sal en las capas superficiales son los principales procesos de acumulación de salinidad en cuencas cerradas. Tal es el caso del drenaje artificial en la cuenca de Texcoco, cerca de la ciudad de México y de la Laguna del Carmen en el sureste (FAO, AGL, 2000).

2.2.2.2 Efecto de la salinidad en las plantas

La salinidad tiene un efecto dual en el crecimiento de las plantas (Sheldon et al., 2004). El efecto general de la salinidad del suelo en las plantas se conoce como efecto osmótico, lo cual significa que las plantas deben incrementar la

energía que gastan para obtener el agua del suelo, que de otra manera, dicha energía sería utilizada para su crecimiento, desarrollo y/o en el desarrollo de flores y frutos. Conforme se incrementa la concentración de la sal, aumenta la dificultad para que la planta pueda absorber agua del suelo, por lo tanto la planta puede morir a causa del estrés hídrico si las concentraciones de sal son suficientemente altas. El segundo efecto de la sal en las plantas es la toxicidad de sales específicas y el desbalance nutricional. Algunos elementos tales como sodio, cloruro y boro tienen efectos tóxicos específicos en las plantas (Munns, 2002). Debido a que muchas sales son también nutrientes para las plantas, altos niveles de las mismas en el suelo pueden afectar el equilibrio nutricional en la planta o interferir con la absorción de algunos nutrientes (Blaylock, 1994).

La extensa diversidad genética de las plantas en su grado de tolerancia a la salinidad, está distribuida en numerosos géneros, exhibiendo dos grupos principales, las halófitas y las glicófitas. Las plantas halófitas son la flora nativa de los ambientes salinos; algunas halófitas tienen la capacidad de almacenar altas concentraciones de sales en sus tejidos sin afectar sus procesos celulares, debido a que presentan adaptaciones especiales tanto anatómicas como morfológicas, mientras que otras halófitas presentan otros mecanismos como el de evasión (Flowers et al., 1986). Por otro lado, están las plantas glicófitas, las cuales sintetizan solutos orgánicos para prevenir la absorción de sales ya que solo pueden tolerar concentraciones relativamente bajas de éstas en sus tejidos antes de que sus procesos se vean fuertemente afectados (Sheldon et al., 2004). La mayoría de estas plantas glicófitas tienden a ser sensibles o hipersensibles a sal, y dentro de este grupo se encuentran la mayoría de los cultivos de interés comercial (Orcutt y Nilsen, 2000).

2.2.2.3 Respuestas fisiológicas de las plantas a la salinidad

Las plantas varían en su tolerancia porque difieren en sus capacidades de percepción del estrés, señalización y respuesta. A nivel fisiológico, la multitud de efectos del estrés salino indica la importancia de proteger al organismo del daño por especies reactivas de oxígeno que aumentan inevitablemente por el déficit

hídrico y la creciente entrada de iones, lo cual conduce a un efecto adverso en la fotosíntesis (Noctor y Foyer, 1998; Dat et al., 2000).

Las especies halófitas poseen mecanismos fisiológicos tales como: la exclusión de sal, la traslocación de sal dentro de la planta (ej. de los brotes sensibles a las hojas maduras o a las raíces), el ajuste osmótico celular (ej. incrementan su absorción de agua para diluir la sal), la compartimentalización intracelular de la sal (ej. su acumulación en los espacios intercelulares) o la excreción de sal que les permite hacer frente a una alta concentración de sal en el ambiente. Las especies glicófitas no cuentan con estos mecanismos de adaptación y por tanto sucumben al marchitarse debido a una disminución en la absorción de agua, inhibición del crecimiento e incluso llegan hasta la muerte, dependiendo de los niveles de salinidad y de tolerancia particular de la especie (Tester y Davenport, 2003).

La inhibición del crecimiento debido a la salinidad es el resultado del efecto tanto iónico como osmótico, y diversas especies de plantas han desarrollado varios mecanismos para hacer frente a estos efectos (Munns, 2002). Al reducirse el potencial osmótico del suelo, el acceso del agua a la planta se ve disminuido debido a que el potencial hídrico total del suelo también decrece, por lo tanto para que la planta pueda continuar manteniendo la absorción de agua en dicho suelo salino, debe hacer un ajuste osmótico en su sistema, lo cual lleva a cabo tomando sales del suelo y compartimentalizándolas en sus tejidos (Sheldon et al., 2004) y/o sintetizando solutos orgánicos compatibles (carbohidratos solubles, aminoácidos, prolina, betaínas, etc.) que contribuyen al mantenimiento de la turgencia celular y a prevenir la deshidratación (Hasegawa et al., 2000). El ajuste osmótico en raíces y hojas, contribuye al mantenimiento de la absorción de agua y de la turgencia celular, permitiendo que continúen los procesos fisiológicos como la apertura de estomas, la fotosíntesis y la expansión celular (Serraj y Sinclair, 2002). Además de su papel en las relaciones hídricas de la célula, la acumulación de solutos orgánicos también contribuye al mantenimiento de la homeostasis iónica y de la relación C/N, eliminación de radicales libres y estabilización de

macromoléculas (proteínas, complejos de proteínas y membranas) y de organelos (Bohnert y Shen, 1999, Bray et al., 2000).

2.2.2.4 Respuestas moleculares de las plantas a la salinidad

Los estreses abióticos, como la sequía y la salinidad, están interconectados con el estrés osmótico, y el oxidativo como estrés secundario. En presencia de una condición de estrés las plantas responden incrementando la síntesis de una amplia variedad de proteínas (Bohnert y Jensen, 1996). Después de la señal inicial de estrés, los procesos río abajo involucran controles de transcripción activando mecanismos de respuesta a estrés o restableciendo la homeostasis iónica, facilitando la retención y/o adquisición de agua, protegiendo las funciones del cloroplasto y la integridad de las membranas. A nivel molecular, los mecanismos de señalización activados por el estrés salino incluyen ambas, las vías inducidas por deshidratación y las vías específicas de Na⁺ (Tester y Davenport, 2003).

Algunas de las proteínas sintetizadas durante el estrés salino son las osmotinas y las dehidrinas, que tienen propiedades similares a las chaperonas y se ha sugerido que están involucradas en el mantenimiento de la estructura de las proteínas al enfrentarse con una salinidad alta así como otras condiciones en las cuales las interacciones proteína-agua se ven perturbadas (Ingram y Bartels, 1996; Campbell y Close, 1997), y además estabilizan la estructura de las membranas. Las dehidrinas pertenecen al grupo II de una familia de proteínas conocidas como LEAs (proteínas abundantes en la embriogénesis tardía) y que brindan protección contra el efecto osmótico del NaCl pero no contra el componente iónico específico (Xu et al., 1996). Por otro lado, se ha sugerido que el osmoprotector glicina-betaína actúa como chaperona además de su acción en la reducción potencial de la peroxidación de lípidos y protección de las reacciones de transporte de electrones en la mitocondria (Chen y Murata, 2002). Otra de las respuestas a salinidad que se ha descrito es el incremento en la síntesis de poliaminas; se les ha asignado una función protectora a estos compuestos con un papel importante en la captura de radicales libres (Mansour, 2000).

El entendimiento del patrón de activación de la expresión de genes durante el estrés abiótico, permitirá mejorar el entendimiento de las interrelaciones de los múltiples sistemas de señalización que controlan la respuesta adaptativa. Los genes inducidos bajo éstas condiciones, son buenos candidatos que potencialmente estarían involucrados en la respuesta osmotolerante de las plantas, particularmente aquellos genes reguladores tales como receptores, factores de transcripción y proteínas cinasas como se ha visto en otros organismos (Zhu, 2001). Es más, se podría aumentar la tolerancia a estrés en las plantas reprogramando la expresión de genes reguladores endógenos. Los factores de transcripción inducibles por estrés, que regulan la expresión de muchos otros genes, ofrecen un panorama de la complejidad de las vías de transducción de señales involucradas en la adaptación de las plantas a condiciones de estrés (Chen y Zhu, 2004). Por otro lado, es conocido que existen algunas respuestas bioquímicas implicadas en la adaptación al estrés, tales como la síntesis de osmoprotectores y antioxidantes para controlar el daño celular debido al estrés salino (Bohnert et al., 1995). La vinculación de las respuestas transcripcionales y bioquímicas con los mecanismos de regulación de los QTLs (*Quantitative Trait Locus*; región del genoma con uno o más genes que afectan a un carácter cuantitativo) asociados a los cultivares tolerantes, puede ser crucial para determinar la relevancia que tienen estos genes para los rasgos tolerantes (Crespi, 2007).

2.2.3 Ácido abscísico y estrés abiótico

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona de gran importancia en las plantas ya que se ha visto que participa en muchos procesos de su desarrollo tales como la latencia de las semillas, la germinación y la regulación de los estomas. También se ha reportado que los agobios del tipo abiótico y el déficit de agua en particular inducen la producción de esta hormona y, que a su vez induce la transcripción de una serie de genes participantes en la respuesta al estrés abiótico (Bray, 1997).

Durante los últimos años, se ha establecido que el ABA es una señal celular vital que media la expresión de un número de genes de respuesta a la salinidad y a la deshidratación (Bostock y Quatrano, 1992). Entre los genes que se ven inducidos por ABA se encuentran los que codifican para proteínas de almacenamiento en semillas (Bray y Beachy, 1985), proteínas LEA, RAB (proteínas de respuesta a ABA), dehidrinas (Dure et al., 1989). También se inducen proteínas como las de unión a RNA (Ludevid et al., 1992), aldosa reductasa (Bartels et al., 1991), gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (Velasco et al., 1994), L-isoaspartil metiltransferasa (Mudgett y Clarke, 1994), entre otras.

La señalización mediada por ABA juega un papel importante en la respuesta de las plantas a estreses ambientales y al ataque de patógenos (Zhu, 2002; Seo y Koshiba, 2002). En los tejidos vegetativos, la concentración de ABA aumenta más de 40 veces bajo estrés hídrico y salino (Zeevaart y Creelman, 1988). El ABA se sintetiza en todas las partes de las plantas, pero se ve acentuado cuando éste se encuentra en una situación de estrés, por ejemplo una disminución en el potencial hídrico del suelo provocado por una alta concentración de sales, o en otras situaciones en las cuales la planta se encuentre sometida a estrés. El ABA es traslocado a las hojas, en donde rápidamente altera el potencial osmótico de las células guarda de los estomas provocando que se cierren y de esta manera se reduce la transpiración, previniendo la pérdida de agua (Tardieu y Davies, 1992). Además del cierre de los estomas, el incremento en el nivel de ABA, también induce la acumulación de solutos compatibles como la prolina (Shen y Ho, 1997). Se ha reportado que mutantes afectadas en la biosíntesis o percepción de ABA son más sensibles a estrés, mientras que plantas transgénicas que producen altos niveles de esta fitohormona presentan una mayor tolerancia a estrés abiótico que las plantas control (Iuchi et al., 2001; Qin y Zeevaart, 2002).

2.2.4 Genes de respuesta a estrés abiótico

Como ya se ha venido mencionando en los apartados anteriores, al presentarse la señal de estrés en las plantas, se activa como respuesta la expresión de un cierto grupo de genes que codificarán proteínas que le confieran a la planta tolerancia para poder sobrellevar la condición de agobio y que pueda continuar con sus funciones vitales. Por otro lado, las especies de plantas sensibles al estrés también inducen dichos genes, pero la diferencia podría radicar en diversos aspectos como: el tiempo de respuesta, que sea más lento en plantas sensibles; o en que su nivel de expresión sea menor o en que se activan en diferentes tejidos de la planta, respecto a las especies tolerantes. Algunos de los genes expresados bajo condiciones de estrés abiótico son las siguientes:

LEAs: son proteínas abundantes en la embriogénesis tardía, en un principio fueron identificadas en los años 80s en plantas de algodón y de trigo (Dure et al., 1981; Grzelczak et al., 1982; Galau et al., 1986); sin embargo, su función aún no es del todo comprendida. Han sido aislados genes que codifican para proteínas LEA de diversas especies de plantas, y se han agrupado en al menos en seis clases en base a sus motivos, patrón de expresión y secuencia (Bray, 1993; Cuming, 1999; Bray et al., 2000). Aunque no se ha detectado una similitud significativa entre los miembros de las diferentes clases, una característica destacada es su alto grado de hidrofiliidad y su alto porcentaje de residuos de glicina (Baker et al., 1988; Dure, 1993). La expresión de estas proteínas está ligada a la adquisición de tolerancia a la desecación en semillas, en polen y en plantas anhidrobióticas, pero además muchas proteínas LEA son acumuladas por deshidratación, por frío, estrés osmótico, ácido abscísico exógeno, estrés salino y congelamiento (Weling et al., 1994; Imai et al., 1996; Ingram y Bartels, 1996; Xu et al., 1996; Close, 1997; Swire-Clark y Marcotte, 1999). Se ha propuesto que protegen las estructuras celulares de los efectos de la pérdida de agua actuando como un buffer de hidratación, secuestrando iones, protegiendo directamente a otras proteínas o membranas, o renaturalizando a proteínas no plegadas (Bray, 1993; Cuming,

1999). Uno de los subgrupos más importantes de las proteínas LEA son las dehidrinas (familia D-11), y representan el grupo de proteínas solubles más conspicuo inducido por deshidratación, aclimatación al frío, estrés salino, desarrollo del embrión y respuesta a ABA (Close, 1997). Estas proteínas presentan características estructurales particulares como el altamente conservado dominio rico en lisina, el cual se ha sugerido que está involucrado en la interacción hidrofóbica que permite la estabilización de la macromolécula (Close, 1996).

GRPs: Las proteínas ricas en glicina han sido identificadas en diferentes organismos. La característica de presentar péptidos con repetidos de glicina, es el componente principal de estas proteínas. Las regiones ricas en glicina, las cuales se propone que están involucrados en las interacciones proteína-proteína en al menos tres familias de proteínas de mamíferos: las queratinas y otras proteínas filamentosas intermediarias, las lorricinas, y una serie de proteínas de unión a RNA de cadena sencilla, algunas de las cuales están implicadas en la formación de complejos heterogéneos de ribonucleoproteínas con el pre-mRNA naciente, y se piensa que participan en su procesamiento, estabilización o transporte (Steinert et al., 1991). En plantas, un grupo de GRP fue caracterizado inicialmente hace 16 años (Keller, 1993; Showalter, 1993), y desde entonces un amplio número de estas proteínas se han identificado. Se han identificado más de 150 genes que codifican para GRPs en caña de azúcar, eucalipto y Arabidopsis (Fusaro et al., 2001; Bocca et al., 2005; Fusaro y Sachetto-Martins, 2007) pero a pesar de que existen muchos reportes que describen la presencia de estas proteínas, desafortunadamente hasta ahora no se conoce totalmente su función. En un principio se propuso que eran proteínas estructurales ya que las primeras GRPs descritas fueron localizadas en pared celular (Keller et al., 1989; Varner y Cassab, 1986), pero se ha visto que éstas pueden tener diferentes localizaciones y por ende diversas funciones; la única característica común entre todas las GRPs, es la presencia de dominios repetidos de glicina. Se ha demostrado que la expresión de los genes que codifican a las GRP, son regulados en respuesta a cierto número de estímulos externos, incluyendo frío, deshidratación, alta salinidad e infecciones

virales (Sachetto-Martins et al., 2000). El incremento en la expresión de estos genes en condiciones de estrés ha permitido plantear la hipótesis de un posible papel de las GRPs en la respuesta de las plantas a condiciones ambientales; sin embargo hasta el momento la información disponible acerca de la función biológica de las GRP bajo condiciones de estrés, es muy limitada. De acuerdo a su estructura primaria y dominios funcionales, las GRP pueden clasificarse en cuatro grupos principales. Las GRP de la clase I son conocidas como clásicas, y pueden contener un péptido señal seguido de la región rica en glicinas. A las proteínas de esta clase se les atribuye una función estructural debido a su localización en pared celular (Cassab, 1998). Las GRPs de la clase II contienen una región rica en glicina seguida de una región rica en cisteína en el C-terminal. En la clase III se agrupan proteínas con un contenido más bajo de glicina y que presentan una gran diversidad de estructuras; las proteínas más conocidas de este grupo son las oleosinas que juegan un papel estructural en la estabilización de triacilglicerol de los cuerpos grasos. Las proteínas de la clase IV son GRPs de unión a RNA, y pueden contener, además de su región rica en glicina, varios motivos que incluyen el motivo de reconocimiento a RNA (RRM), dominios de choque por frío (CSD), que funcionan como chaperonas de RNA y se han descrito en bacterias y recientemente en plantas (Jiang et al., 1996; Karlson et al., 2002).

Se calcula que en el genoma de *A. thaliana* existen aproximadamente 121 genes que codifican GRPs. Por otro parte, existe otro grupo de proteínas que no son consideradas como GRP, sino como proteínas con un motivo rico en glicinas (GRMP), debido a que solo presentan pequeñas regiones ricas en glicina (comunicación personal con el Dr. Sachetto-Martins). El equipo del Dr. Sachetto-Martins también realizó un análisis *in silico* en donde identificó alrededor de 57 genes codificantes para GRMPs en el genoma de *Arabidopsis* (comunicación personal con el Dr. Sachetto-Martins). De este grupo de proteínas GRMPs existe muy poca información, por lo que estudios que aporten información respecto a la caracterización funcional de estas proteínas serán muy valiosos.

DNAJ: A nivel molecular la respuesta al estrés involucra la reprogramación de las actividades celulares mediante la síntesis de proteínas de choque térmico (HSPs). Estas chaperonas moleculares participan en diversas funciones celulares tales como el apropiado plegamiento de las proteínas, su maduración, su transporte, la degradación de proteínas, entre otras, en condiciones normales y bajo condiciones de estrés (Vierling, 1991; Waters et al., 1996). Las HSPs comprenden varias familias de proteínas conservadas evolutivamente, las cuales han sido designadas de acuerdo a su peso molecular, como HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 y las sHSP (pequeñas) (Buchner, 1996). Las proteínas DnaJ pertenecen a la familia de las HSP40, también llamada proteínas de la familia J, las cuales regulan la actividad de las proteínas HSP70 (DnaK) permitiendo la unión a proteínas parcialmente o completamente desplegadas para ayudar a su correcto plegamiento o ensamble (Walsh et al., 2004). Las proteínas DnaJ presentan en la región N-terminal, el dominio J característico conformado de aproximadamente 75 aminoácidos conservados. Este dominio J contiene un tripéptido histidina-prolina-ácido aspártico (HPD) altamente conservado, el cual es esencial para la interacción con las proteínas HSP70 (DnaK) (Li et al., 2007). Además, incluyen otras regiones como la región rica en glicinas y fenilalaninas (G/F), adyacente al dominio J; seguido por una región rica en cisteínas la cual forma un dominio dedo de zinc, que contiene cuatro motivos repetidos (CXXCXGXG). Por último, una región C-terminal pobremente conservada y de tamaño variable (Yan y Craig, 1999). La clasificación de estas proteínas, se basa en la presencia de los dominios conservados, el primer grupo denominado tipo I o A, presenta todos los dominios: el dominio J, seguido de la región rica en G/F, después por el dominio rico en cisteínas (dedo de zinc) y por último la región C-terminal. En lo que respecta al grupo tipo II o B, este carece solamente del dominio dedo de zinc, y el grupo tipo III o C, estos carecen tanto de la región rica en G/F, como la del dominio dedo de zinc (Kelley, 1998). La localización de estas proteínas se ha reportado en diversos organelos como en el retículo endoplásmico, vacuolas, lisosomas, peroxisomas, plastidios, aparato de Golgi, mitocondria, citoplasma y núcleo (Miernyk, 2001).

La alta diversidad de HSP en plantas, refleja probablemente su adaptación molecular ante el amplio rango de estreses ambientales a que son sometidas, incluyendo calor, frío, deshidratación, salinidad y estrés oxidativo, y cada vez existe más información que sugiere una fuerte correlación entre la acumulación de las HSP y la tolerancia de las plantas a estrés (Wang et al., 2004).

Factores transcripcionales: Estos factores juegan un papel muy importante en la respuesta de la planta a estreses ambientales y en su desarrollo. Los factores de transcripción son proteínas de unión a secuencias específicas de DNA, capaces de activar o reprimir la transcripción. Las regiones promotoras de los genes de estrés contienen un arreglo específico de elementos que actúan en *cis* y que son reconocidos por factores de transcripción específicos, y que son importantes en la regulación de la expresión de diferentes genes en respuesta a varios tipos de estreses abióticos (Grover et al., 2001). Las principales familias de factores transcripcionales inducidos por estrés abiótico son: ERF/AP2, bZIP, NAC, MYB, bHLH, dedos de zinc Cys2Cys2, dedos de zinc Cys2His2, WRKY, HB y HSF; estos factores pueden activar la expresión de genes inducida por estrés aunque muchos de sus genes blanco aun no han sido identificados (Seki et al., 2007).

Transportadores iónicos: A nivel molecular, los mecanismos de señalización activados por estrés salino incluyen tanto los inducidos por deshidratación como las vías específicas de sodio. Los mecanismos para minimizar el daño causado por una alta salinidad varía entre las plantas, y algunos mecanismos deben operar de manera coordinada para manejar el Na⁺. Por ejemplo, las plantas pueden (a) minimizar la entrada inicial, (b) maximizar la salida, (c) minimizar la carga al xilema o maximizar su captura antes de que alcance el brote, (d) maximizar la recirculación fuera del brote en el floema, (e) maximizar la compartimentalización intracelular o traslocación a algunas secciones particulares del brote (por ejemplo hojas viejas), o mejor aún (f) secretar la sal hacia la superficie de la hoja (Tester y Davenport, 2003). La manera más directa de mantener bajas las concentraciones de Na⁺ citoplásmicas es secuestrarlo en las vacuolas de cada célula vegetal. El

bombeo de Na^+ a la vacuola es catalizado por un transportador vacuolar Na^+/H^+ , siendo establecida inicialmente la diferencia de H^+ por una H^+ -ATPasa y una pirofosfatasa (Blumwald et al., 2000). Paralelo a este mecanismo, el Na^+ también puede regresar al citoplasma probablemente a través de canales iónicos. Los canales selectivos de cationes, tales como los llamados SV y FV son abundantes en las membranas vacuolares y basados en su selectividad, estos canales son clasificados como canales catiónicos no selectivos (Demidchik et al., 2002) y se cree que son muy permeables al Na^+ así como a otros cationes tales como K^+ . Sin embargo, dada su relativamente alta permeabilidad a cationes citotóxicos como Na^+ y Ca^{2+} se presume que su actividad debe ser baja. Aunque los mecanismos para la percepción de la señal no se conocen del todo, algunas de las proteínas involucradas podrían ser canales y receptores ion específicos, y es claro que una respuesta temprana de un rápido aumento de Na^+ extracelular es un aumento transitorio de Ca^{2+} (Knight et al., 1997). Otro de los mecanismos involucrados en la regulación del transporte de Na^+ en la planta completa es la vía de señalización SOS. SOS3 es una proteína de unión a Ca^{2+} que responde al incremento de este ion inducido por la sal (Liu y Zhu, 1997; Ishitani et al., 2000). SOS3 interactúa directamente con SOS2 que es una serina/treonina proteína cinasa (Halfter et al., 2000) y uno de los blancos de esta vía es SOS1, un transportador Na^+/H^+ localizado en la membrana plasmática (Shi et al., 2002). Además de su papel como transportador de Na^+ , SOS1 tiene un amplio dominio, probablemente citosólico, el cual se ha sugerido que comprende un sensor de Na^+ , planteando la posibilidad de una retroalimentación de la vía SOS por medio de SOS1 (Zhu, 2002). A la par del mantenimiento de los niveles bajos de Na^+ , también se debe conservar un alto contenido de K^+ , es decir debe haber una alta relación $\text{Na}^+:\text{K}^+$, ya que la principal base para la toxicidad del Na^+ es debido a la competencia con K^+ por los sitios de unión a K^+ (Tester y Davenport, 2003).

2.3 Poliaminas

Las poliaminas (PAs) son moléculas catiónicas alifáticas de bajo peso molecular que se encuentran presentes en todos los organismos. Su propiedad de tener carga positiva, les permite unirse a macromoléculas celulares como el DNA, RNA, cromatina y proteínas mediante puentes electrostáticos que pueden causarles tanto estabilización como desestabilización (Kusano et al., 2008).

De esta manera, las PAs han sido involucradas en una multitud de procesos celulares fundamentales, incluyendo la regulación de la expresión génica, traducción, proliferación celular, modulación de la señalización celular y estabilización de membranas (Tabor y Tabor, 1984; Cohen, 1998; Igarashi y Kashiwagi, 2000). Por otro lado, las PAs también pueden regular la muerte celular, particularmente la apoptosis (Thomas y Thomas, 2001; Seiler y Raul, 2005).

En bacterias, las PAs son componentes de la membrana externa en las gram-negativas, están involucradas en la biosíntesis de sideróforas, además, son importantes en la resistencia contra ácidos, protegen contra la toxicidad por oxígeno, juegan un papel importante en la señalización en la diferenciación celular y son esenciales para la formación de biopelículas (Wortham et al., 2007). En mamíferos, como en bacterias, las PAs son reguladores esenciales de crecimiento, transcripción génica, traducción, etc (Thomas y Thomas, 2003; Childs et al., 2003; Umekage y Ueda, 2006). Contribuyen al mantenimiento de la función intestinal normal, la maduración de la mucosa intestinal y su reparación después de una lesión (Seiler y Raul 2007). Además la vía metabólica de PAs es un objetivo importante para el desarrollo de drogas para la prevención del cáncer, ya que existe una fuerte correlación positiva entre el contenido de PAs y el crecimiento celular anormal (Saunders y Wallace, 2007; Casero y Marton, 2007).

La ruta biosintética de PAs es conservada en bacterias, hongos, plantas y animales (Tabor y Tabor, 1984); sin embargo, presenta algunas variantes. La síntesis esencialmente comienza a partir de dos moléculas de los aminoácidos

precursores, por una parte la L-arginina o la L-ornitina, y por la otra la L-metionina (ver figura 1). La producción de putrescina (Put) puede ser llevada a cabo por dos descarboxilasas: la ornitina descarboxilasa (ODC; EC 4.1.1.17) y la arginina descarboxilasa (ADC; EC 4.1.1.19). Las PAs superiores, la espermidina (Spd) y la espermina (Spm), son sintetizadas mediante la espermidina y espermina sintasa (SPDS; EC 2.5.1.16 y SPMS; EC 2.5.1.22) respectivamente por la adición sucesiva de grupos aminopropilo a la Put. Dichos grupos son derivados de la metionina, la cual es primero convertida en S-adenosilmetionina (SAM) y luego descarboxilada por medio de la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC; EC 4.1.1.50).

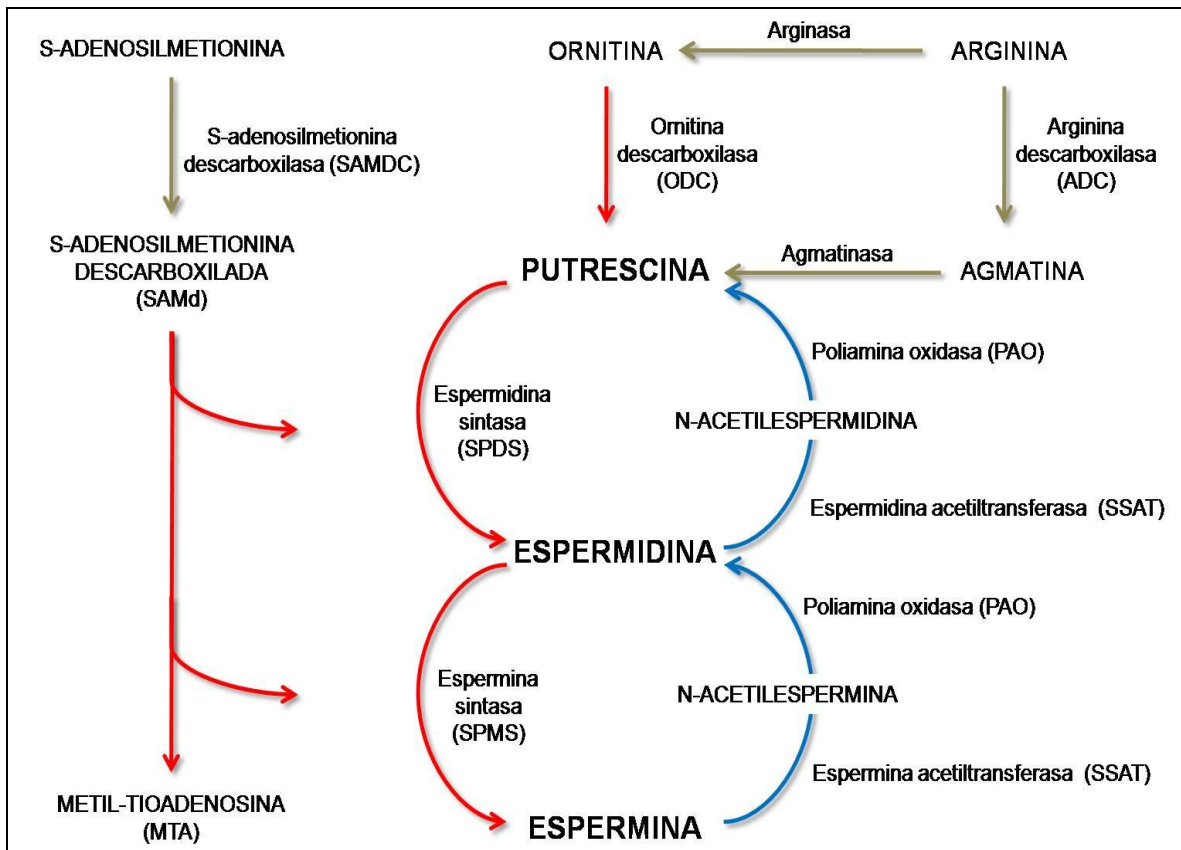


Figura 1. Metabolismo general de las poliaminas

2.3.1 Función de las poliaminas en plantas

Estos poliaminas que muestran una alta actividad biológica, están presentes en todos los compartimentos de la célula vegetal incluyendo el núcleo, lo cual indica su participación en diversos procesos fundamentales de la célula (Bouchereau et al., 1999). Están implicadas en los procesos de replicación, transcripción, traducción, estabilización de la membrana y modulación de la actividad enzimática; a su vez regulan la actividad génica, la división y expansión celular, y el crecimiento y desarrollo de la planta (Bouchereau et al., 1999; Kaur-Sawhney et al., 2003; Alcázar et al., 2006).

En plantas, las PAs han sido frecuentemente consideradas como reguladores de crecimiento y están involucradas en la división celular y diferenciación (Galston y Sawhney, 1990). Las PAs, ya sean en forma libre o conjugada, se han relacionado específicamente a diversos procesos, incluyendo la respuesta a estrés biótico y abiótico (Kumar et al. 1997; Walden et al. 1997; Malmberg et al. 1998; Bouchereau et al. 1999; Liu et al. 2000; Alcázar et al. 2006; Groppa y Benavides 2007; Kusano et al. 2007), rizogénesis (Jarvis et al., 1983; Kakkar et al., 2000), desarrollo de la raíz, función meristemática, embriogénesis somática, organogénesis (Feirer et al., 1984), desarrollo de flores y frutos (Tiburcio et al. 1990, Kumar et al. 1997, Malmberg et al. 1998), formación del polen y latencia (Kakkar y Nagar, 1997), respuesta de crecimiento inducido por luz (Yoshida et al., 1999) y senescencia (Muchitch et al., 1983).

2.3.2 Función de las poliaminas durante el estrés

Las PAs están involucradas en un amplio rango de procesos fisiológicos en plantas (Kaur-Sawhney et al., 2003), pero los mayores cambios en su metabolismo ocurren en respuesta a diversas condiciones de estrés (Liu y Moriguchi, 2007; Pang et al., 2007), incluyendo el estrés osmótico y el salino (Aziz et al., 1997; Benavides et al., 1997; Maiale et al., 2004; Jiménez-Bremont et al., 2007). La biosíntesis de estos reguladores universales multifuncionales incrementa ampliamente en respuesta a estrés, y se les atribuye una función

protectora que se manifiesta, entre muchas otras acciones, en su capacidad de neutralizar la acción de especies reactivas de oxígeno que se acumulan por efecto de varios tipos de estrés tanto biótico como abiótico, y que son perjudiciales para las estructuras celulares (Bors et al., 1989; Shevyakova et al., 2004; Hasegawa et al., 2000). Debido a su naturaleza policatiónica a un pH fisiológico, las PAs se pueden unir fuertemente a las cargas negativas de los componentes celulares tales como ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos (Smith, 1985). Las interacciones entre PAs y los fosfolípidos de las membranas pueden estabilizarlas durante condiciones de estrés (Roberts et al., 1986). Existen algunos trabajos relacionados al estudio de los efectos de las PAs y los canales iónicos en plantas, en donde se ha visto que las PAs intracelulares pueden bloquear canales catiónicos vacuolares de activación rápida en cebada (Brüggemann et al., 1998, 1999). Las PAs citoplásmicas bloquean el flujo de K^+ a través de la membrana plasmática hacia el interior de las células guarda (Liu et al., 2000). Los canales catiónicos no selectivos son otro de los objetivos de las PAs y este bloqueo conduce a la prevención de la pérdida de K^+ de las células de mesófilo en el guisante (Shabala et al., 2007). Además del efecto directo de las PAs en los canales iónicos, también se ha reportado que éstas, particularmente la Spm, incrementa la actividad de una H^+ -ATPasa de membrana plasmática, a través de un aumento en las asociaciones de ésta con la proteína 14-3-3 (Garufi et al., 2007). Uno de los enfoques actuales más importantes en el área de PAs, es el análisis más detallado del modo de acción de éstas en los canales iónicos en plantas, con lo que se podría descubrir la manera en que estas moléculas policatiónicas modulan las redes iónicas entrecruzadas en las células vegetales.

i. Estrés salino y poliaminas

El estrés salino por NaCl en plantas, causa tanto un desequilibrio iónico como un estrés hídrico creando un daño en la membrana celular (Tiburcio et al., 1994). Se ha visto que las PAs previenen la toma de iones Na^+ , y la pérdida de K^+ , de aminoácidos y de electrolitos de los tejidos vegetales (Chattopadhyay et al., 2002). Se sabe que la Spd y la Spm retardan el envejecimiento celular, que es acelerado bajo la condición de estrés debido a la supresión de enzimas que

degradan biopolímeros (DNAsas, RNAsas y proteasas) y también previenen la degradación de la clorofila (Legocka y Zaichert, 1999).

Una variedad de arroz tolerante a salinidad presenta una elevada actividad de ADC así como una acumulación de su transcrito bajo estrés salino, mientras que en la variedad sensible éste es reprimido (Chattopadhyay et al., 1997). En mostaza, el transcrito de *adc* fue inducido en respuesta a algunos tipos de estrés como frío, salino y osmótico (Mo y Pua, 2002). En la variedad tolerante Pokkali de arroz, se observó una inducción del gen *samdc2* bajo estrés salino a corto plazo (Kawasaki et al., 2001). También se ha reportado una inducción en la expresión del gen *Zmspds2* en maíz bajo estrés salino, en donde los autores identificaron dos variantes de *splicing* alternativo del gen *Zmspds2* inducidas bajo el estrés salino (Rodríguez-Kessler et al., 2006).

Se ha reportado que cultivares tolerantes a estrés incrementan su nivel endógeno de PAs en un grado mucho mayor que los sensibles (Lee, 1997). Por ejemplo, se ha visto que variedades de arroz y tomate tolerantes a estrés salino incrementan sus niveles de Spd y Spm, lo cual no ocurre en los genotipos sensibles (Krishnamurthy y Bhagwat, 1989; Santa-Cruz et al., 1997). En *Lotus glaber* bajo estrés salino a largo plazo, se observó una disminución de Spd y un incremento de Spm (Sánchez et al., 2005). La variedad de arroz, Pokkali, tolerante a sal, acumula Spd y Spm en respuesta a estrés salino, mientras que la variedad sensible M-1-48, es incapaz de mantener los niveles de estas PAs en las mismas condiciones (Chattopadhyay et al., 2002). Yang et al. (2007), investigaron los cambios en el contenido de PAs en plantas de arroz sujetas a estrés hídrico utilizando variedades que diferían en su tolerancia a la sequía, y encontraron que los contenidos de Spd y Spm en las hojas correlacionaban con su resistencia. Existe una considerable controversia actualmente acerca de cuáles son las PAs que ofrecen la tolerancia a estrés en plantas; algunos autores afirman que la Put es crucial para la defensa, ya que han observado su acumulación por ejemplo en estrés por deficiencia de potasio (Murty et al., 1971; Tachimoto et al., 1992) en

donde aparentemente la Put reemplaza al potasio como catión orgánico; sin embargo, esta hipótesis no puede explicar el papel de la Put en plantas privadas de fosfato puesto que éste es un anión inorgánico. Sin embargo, la mayoría de los reportes coinciden en que son las PAs superiores (Spd y Spm) las que están implicadas en la respuesta a diversos estreses. La función de las PAs durante el estrés salino parece complicada por el hecho de que, dependiendo de las condiciones de crecimiento y la exposición a corto o largo plazo, su contenido aumenta o disminuye durante el estrés salino. Kasinathan y Wingler (2004) demostraron que la acumulación de PAs depende de la aclimatación a la salinidad y que la baja producción de PAs conduce a una disminución en su tolerancia.

Aunque la correlación entre el estrés y los niveles de PAs ha sido establecida en diversas plantas, el papel de las PAs en relación a la tolerancia al estrés en plantas aún no es muy clara. Se han reportado algunas estrategias por las cuales, las PAs podrían conferir tolerancia a salinidad: estabilizando proteínas y membranas, atrapando radicales libres, afectando la absorción de iones o inhibiendo la apertura de los estomas (Tiburcio et al., 1994; Drolet et al., 1986; Yamaguchi et al., 2007). En particular la Spm, debido a su cadena más larga y más cargas positivas, podría proporcionar una mayor efectividad neutralizando y estabilizando las membranas.

Se ha observado inconsistencia en la expresión de los genes biosintéticos de PAs y los contenidos de éstas en varios reportes (Alcázar et al., 2006; Hummel et al., 2004; Liu y Moriguchi, 2007), lo cual podría ser explicado por la existencia de otros genes de biosíntesis en los genomas vegetales, por la regulación de PAs a nivel traduccional y/o post-traduccional, y por su conjugación y/u oxidación.

ii. Plantas mutantes en genes de biosíntesis de poliaminas

Las PAs han sido consideradas esenciales para la vida, ya que la inhibición de su biosíntesis bloquea el crecimiento (Cohen, 1998; Igarashi y Kashiwagi, 2000; Thomas y Thomas, 2001; Hanfrey et al., 2001). Suficientes datos genéticos

actuales sustentan este punto. Por ejemplo en el caso de mamíferos, líneas con deleción en el gen *odc* ó *samdc*, en donde esta interrumpida la síntesis de Spd muestran un fenotipo letal en estadios embrionarios muy tempranos en ratón (Wang et al., 2004), con lo que se confirma que la Spd es esencial para la viabilidad en células eucarióticas. En lo que se refiere a investigación en plantas, la gran mayoría han sido realizadas en *Arabidopsis thaliana*. La generación de una doble mutante por cruzamiento de mutantes sencillas *adc1* y *adc2*, en *Arabidopsis* resultó en un defecto letal en el desarrollo del embrión (Urano et al., 2005). Otra doble mutante en los dos genes que codifican para espermidina sintasa *spds1* y *spds2* produce un efecto similar en el desarrollo del embrión (Imai et al., 2004). Además una mutación dual de los genes *samdc1* y *samdc4* es también letal para el embrión (Ge et al., 2006).

Un reporte reciente en una doble mutante de *Arabidopsis* imposibilitada para producir Spm (*spms1* y *acl5*), presentó hipersensibilidad a alta salinidad, y este fenotipo fue revertido por aplicación exógena de Spm; además ésta mutante exhibía un síntoma de deficiencia de Ca^{2+} , evidenciando el rol protector de la Spm en el contexto de la respuesta al estrés iónico (Yamaguchi et al., 2006). Las mutantes *spe1-1* y *spe2-1* en *Arabidopsis* con una actividad de ADC reducida, disminuyen su tolerancia a sal, comparadas con las plantas silvestres (Kasinathan y Wingler, 2004). Estos resultados aunados a los mencionados anteriormente en donde se observó una sobreexpresión del transcrito de *adc* bajo estrés salino, demuestran que los genes de *adc* también juegan un papel importante en la respuesta de la planta al estrés ambiental.

iii. Plantas transgénicas que sobreexpresan genes biosintéticos de poliaminas

Las PAs en plantas frecuentemente se acumulan en respuesta a estrés tanto biótico como abiótico (Bouchereau et al., 1999; Urano et al., 2003; Walters et al., 2003a, b). En un principio se observó que la adición exógena de PAs protegía a las plantas de estrés abiótico (Chattopadhyay et al., 2002).

Se ha reportado que las plantas transgénicas que sobreexpresan los genes de biosíntesis de PAs poseen una mayor tolerancia a estrés (Kasukabe et al., 2004; Roy y Wu, 2002; Waie y Rajam, 2003; Wi et al., 2006). Aún en arboles para obtención de madera, el incremento en la síntesis de PAs mediante producción de transgénicas, les confiere tolerancia a múltiples estreses (Wen et al., 2007). Plantas de arroz que sobreexpresan el gen *adc* de *Datura stramonium*, son tolerantes a deshidratación (Capell et al., 2004). En plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresaban un gen de *samdc* de clavel, se observó un elevado índice de fotosíntesis y la atenuación del daño inducido por el estrés, como el amarillamiento de las hojas y la degradación de la clorofila bajo condiciones de salinidad, frío y tratamiento ácido (Wi et al., 2006). Algunos trabajos han demostrado una mayor tolerancia a salinidad en plantas transgénicas de arroz y tabaco sobreexpresando *adc*, *odc* ó *samdc* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor ó de promotores inducibles por ABA (Roy y Wu, 2001; Kumria y Rajam, 2002; Waie y Rajam, 2003). La sobreexpresión de una *spds* de *Cucurbita ficifolia* en plantas de *A. thaliana* y papa, incrementó su tolerancia a varios tipos de estrés ambiental como el frío y la salinidad proponiendo a la Spd como un regulador en las vías de señalización de estrés (Kasukube et al., 2004, 2006).

2.3.3 Poliaminas y Acido abscísico

A pesar de los recientes reportes involucrando a las PAs en la respuesta a diversos estreses abióticos, se sabe muy poco acerca de las vías de señalización de estrés que regulan el metabolismo de PAs; la escasa información que se cuenta hasta el momento es en relación a la respuesta de los genes biosintéticos de PAs con la aplicación de diferentes fitohormonas. Los resultados derivados de experimentos del transcriptoma y las determinaciones de los niveles de PAs indican que el ácido abscísico (ABA) modula muchos cambios significativos en el metabolismo de las PAs en plantas de *Arabidopsis* sujetas a estrés hídrico (Alcázar et al., 2006). ABA, el cual es un importante regulador del crecimiento

durante el desarrollo de las plantas muestra un aumento en sus niveles en respuesta a estrés abiótico, y es conocido como un mediador en la activación de las respuestas de las plantas y en la inducción de la expresión de múltiples genes de defensa contra estreses ambientales (Chandler y Robertson, 1994; Zhao et al., 1995; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Estudios previos en maíz han revelado que la acumulación endógena de ABA provocada por el estrés salino, actúa como una señal para la acumulación de PAs durante el estrés (Liu et al., 2005). La expresión de los genes biosintéticos de PAs (*adc2*, *spms* y *samdc2*) también se ha visto inducida por ABA (Urano et al., 2003). Li y Chen (2000) encontraron que el transcrito de la *samdc1* fue diferencialmente acumulado en plántulas de arroz en respuesta a salinidad, sequía y ABA exógeno. Aunado a lo anterior, Alcázar et al. (2006) observaron que el gen *samdc1* de *Arabidopsis* es afectado por ABA sugiriendo la activación de este gen mediante la vía dependiente de ABA. Estos autores, así como Pérez-Amador et al. (2002), observaron también una expresión inducida por deshidratación en los genes *adc2*, *spds1* y *spms*, la cual es una respuesta dependiente de ABA ya que esta inducción no se observó en mutantes deficientes de ABA. Aunado a lo anterior, Alcázar et al. (2006) identificaron elementos de respuesta ABRE, de la vía de señalización dependiente de ABA, al realizar un análisis *in silico* de las regiones promotoras de los genes de la biosíntesis de PAs en *A. thaliana*.

3. MODELOS DE ESTUDIO

3.1 Frijol (*Phaseolus vulgaris*)

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa más cultivada en el mundo y es uno de los principales elementos nutricionales en México. Su producción alcanza el 8.3% de las cosechas mundiales; sin embargo se ha visto disminuido como resultado de problemas ambientales en los últimos años (SAGAR, 2000). *Phaseolus* es un género Americano de aproximadamente 40 especies, encontrados principalmente en las zonas tropicales y subtropicales (Debouck, 1999). En México, la mayoría de las especies de *Phaseolus* están distribuidas del nivel del mar a 2900 m de altitud, bajo un amplio rango de condiciones climáticas, variando desde caluroso, semi-caluroso o temperatura sub-húmeda a caluroso semi-seco moderadamente perturbada por la vegetación natural y la amplia distribución de poblaciones silvestres y su adaptación a diversos ambientes contribuye a su variabilidad fenotípica y genotípica (Delgado-Salinas, 1985).

Para México, el frijol es un producto estratégico en el desarrollo rural del país, debido a que conjuntamente con el maíz (Figura 2), representa toda una tradición productiva y de consumo, cumpliendo diversas funciones de carácter alimentario y socioeconómico que le han permitido trascender hasta la actualidad. El frijol se cultiva en prácticamente todas las regiones del país, bajo todas las condiciones de suelo y clima. A nivel nacional existen alrededor de 500 mil agricultores dedicados a la producción del cultivo de estudio. Es una importante fuente generadora de empleo dentro de la economía del sector rural, pues se ha estimado (mediante un modelo de costo de producción promedio) que demanda 35 jornales por hectárea, generando, sólo en la etapa de producción agrícola, un total de 78,316,105 jornales. Lo anterior equivale a 382,029 empleos permanentes en el sector rural.

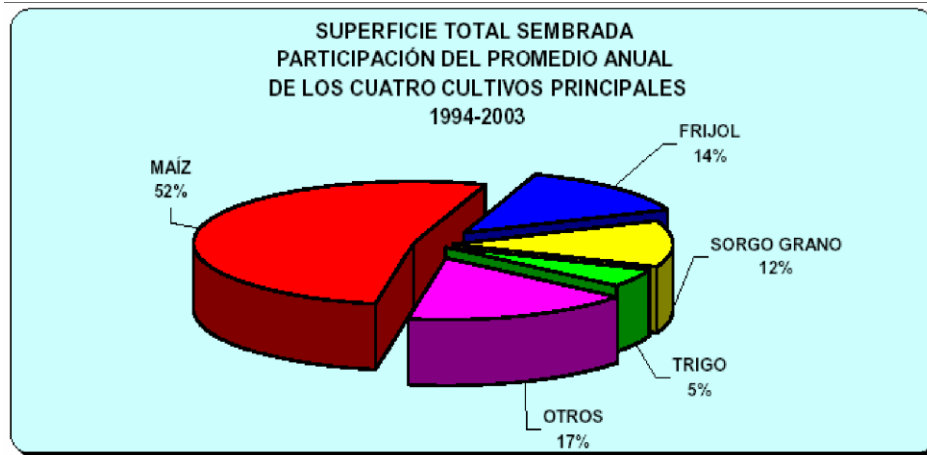


Figura 2. Gráfica representativa de la superficie total sembrada y la participación del promedio anual de los cuatro cultivos principales en México. FUENTE: Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera SIAP

La salinidad del suelo es una limitación importante para la producción de cultivos en todo el mundo, aunque algunos de ellos son moderadamente tolerantes a condiciones salinas, la mayoría se ven afectados de manera adversa aún por bajos niveles de sal. Entre las consecuencias fisiológicas de la salinidad en las leguminosas está la dificultad de germinación de la semilla, la reducción en la formación de nódulos fijadores de nitrógeno, el retraso en su desarrollo y la reducción en el rendimiento de los cultivos (Greenway y Munns, 1980). Una manera de reducir los efectos adversos de la salinidad del suelo en la producción, es el desarrollo de cultivares tolerantes a estrés salino. En algunas especies, esto se puede lograr mediante la explotación de la variabilidad intraespecífica; sin embargo, cuando dicha variabilidad es limitada, como ocurre en muchas especies, pueden transferirse genes de especies estrechamente relacionadas, adaptadas a una alta salinidad a especies más sensibles. La familia de las leguminosas se considera relativamente sensible a sal (Maas y Hoffman, 1977), dentro de la cual se ha detectado una variabilidad limitada para la tolerancia a la salinidad (Garg y Gupta, 1997; Johansen et al., 1990). Esta variabilidad genética entre las especies de leguminosas tanto silvestres como cultivadas, podría proporcionar genes útiles para el mejoramiento de la tolerancia a estrés salino.

3.2 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una planta pequeña empleada como organismo modelo para el estudio de la biología molecular, la fisiología y la genética de plantas, y se ha convertido, para esta área, en lo que son *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* para la biología animal.

Arabidopsis es una angiosperma nativa de Europa, Asia y el noroeste de África, una dicotiledónea de la familia *Brassicaceae* (USDA, ARS, National Genetic Resources Program, 2010). Esta planta puede completar su ciclo entero de vida en seis semanas; su tallo central que produce flores, generalmente crece en tres semanas y sus flores se autopolinizan naturalmente; en el laboratorio, *Arabidopsis* puede crecer en placas de petri o macetas, bajo luces fluorescentes o en condiciones de invernadero (Meinke et al., 1998).

Aunque *Arabidopsis* no posee un valor agronómico, presenta varias ventajas muy importantes para la investigación básica en plantas. *Arabidopsis* tiene uno de los genomas más pequeños entre las plantas, 27,379 genes codificantes para proteínas (de los cuales aproximadamente el 70 % tiene ya una función asignada), 4827 pseudogenes o elementos transposables y 1312 RNAs no codificantes. *Arabidopsis* fue la primera planta en ser secuenciada, lo cual se logró en el año 2000 por la Iniciativa Genoma de *Arabidopsis* y cuya versión más actualizada del genoma lo mantiene el Centro de Información de *Arabidopsis* (TAIR). Su genoma está distribuido en cinco cromosomas de los cuales se ha hecho un mapeo genético y físico exhaustivos. Cada planta individual es capaz de producir algunos miles de semillas (TAIR, TAIR9 Genome Release, 2009).

La transformación genética de la planta de *A. thaliana* es de rutina, y se lleva a cabo utilizando *Agrobacterium tumefaciens* para transferir el DNA al genoma de la planta. El protocolo para ello, llamado “buzamiento floral”, consiste simplemente en la inmersión de la flor en una solución conteniendo *Agrobacterium*, el DNA de

interés y un detergente (Zhang et al., 2006), éste método evita la necesidad del cultivo de tejidos o la regeneración de la planta. Finalmente, la planta es muy adecuada para análisis de microscopía; las plántulas pequeñas completas, y sus raíces en particular, son relativamente traslúcidas. Esto junto con su pequeño tamaño, facilita la observación de células vivas, utilizando microscopía de fluorescencia y microscopía de escaneo láser confocal (Moreno et al. 2006). Las plantas pueden ser observadas de manera no invasiva mediante el montaje húmedo de las plántulas en agua o en medio de cultivo sin necesidad de fijación o sección permitiendo de esta manera las mediciones por lapso de tiempo (Shaw, 2006). Se puede inferir también el estado de desarrollo de la célula mediante la localización de marcadores de proteína fluorescente, introducido mediante transformación, permitiendo así un análisis de desarrollo más detallado.

Diferentes tipos de datos como DNA, RNA, proteína y fenotipos, han sido depositados en los centros de información de diferentes escalas, incluyendo grandes fuentes públicas (por ejemplo, GenBank), bases de datos específicas de la comunidad (por ejemplo, TAIR), y bases de datos específicas de proyectos (por ejemplo, el Sistema de Gestión de Información Pardue Ionomics). Finalmente, una de las más importantes ventajas que tiene *Arabidopsis* como modelo es la creación de una colección de mutantes por inserción de T-DNA de *Agrobacterium*, indexadas por secuencia, en todo el genoma de la planta (Alonso et al., 2003). De esta manera, *Arabidopsis* aporta una herramienta esencial para el análisis funcional de un gran número de genes en una multitud de organismos, para los cuales su función aún es desconocida.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

IDENTIFICAR Y CARACTERIZAR LOS GENES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) INDUCIDOS BAJO ESTRÉS SALINO EN LA VARIEDAD TOLERANTE PINTO VILLA.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Caracterizar fisiológicamente dos variedades de frijol, Pinto Villa y Canario 60, bajo condiciones de salinidad.

4.2.1.1 Determinar el potencial hídrico en las hojas de las plantas estresadas.

4.2.2 Caracterizar bioquímicamente las mismas variedades de frijol.

4.2.2.1 Determinar el contenido endógeno de prolina, clorofila y poliaminas en las plantas sometidas a estrés.

4.2.3 Analizar transcripcionalmente los genes biosintéticos de poliaminas en las dos variedades de frijol.

4.2.3.1 Analizar la expresión de los genes *Pvadc*, *Pvsamdc* y *Pvspds* bajo estrés por NaCl.

4.2.3.2 Analizar la expresión de los mismos genes en plantas tratadas con ABA y estrés por frío a diferentes periodos de tiempo.

4.2.4 Construir una genoteca sustractiva en la variedad de frijol tolerante Pinto Villa a 200 mM de NaCl

4.2.4.1 Aislar e identificar genes de frijol inducidos bajo condiciones de estrés salino.

4.2.4.2 Caracterizar genes de *Arabidopsis thaliana* ortólogos de algunos ESTs identificados en la genoteca sustractiva de frijol, utilizando líneas mutantes insercionales de *A. thaliana* para estudiar la pérdida de función.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal

5.1.1 Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

El modelo de estudio del presente trabajo fue el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y las dos variedades utilizadas fueron Pinto Villa y Canario 60, descritas previamente como tolerante y sensible a estrés hídrico, respectivamente (Acosta-Gallegos et al., 1995; Terán y Singh, 2002; Rosales-Serna et al., 2004; Acosta-Gallegos, comunicación personal).

5.1.2 *Arabidopsis thaliana*

Se utilizaron semillas de líneas mutantes Salk por inserción de T-DNA de *Arabidopsis thaliana* (Alonso et al., 2003) adquiridas en el Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC), de la Universidad del Estado de Ohio. Las líneas fueron: Salk_132923 para el gen ATJ3, ortólogo de la DNAJ de frijol; Salk_044047 para el transportador de oligopéptidos dependiente de protones (POT), ortólogo del transportador de nitritos; Salk_003830 para la ATPasa vacuolar subunidad E1, ortólogo del mismo nombre; Salk_051237 y WiscDSLox383H9 para la ribonucleoproteína de cloroplasto de 31 KDa, ortólogo de la ribonucleoproteína de cloroplasto de 33 KDa; Salk_022515 para el factor eucariótico de inicio de la traducción 5A, Salk_077789 para MTN3; Salk_078266 para MTN19; y finalmente Sail_303_G11 y Sail_387_D04 para la proteína con un motivo rico en glicina, estas últimas cinco líneas para sus ortólogos homónimos en frijol.

5.2 Condiciones de crecimiento

5.2.1 *Phaseolus vulgaris*

Las semillas de frijol de ambas variedades fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio comercial al 50 % durante 10 min y enjuagadas 3 veces con agua destilada; se germinaron en placas de Petri durante 3 días en oscuridad y se sembraron posteriormente en macetas conteniendo el sustrato utilizado

dependiendo de cada experimento: una mezcla de arena y perlita (3:1) para los ensayos en semi-hidroponía sub-irrigando las macetas con la solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) ó bien un sustrato grado hortícola (Cosmocel, Monterrey, México) sub-irrigado con agua. Para todos los experimentos realizados, excepto la construcción de la genoteca sustractiva, las plantas fueron crecidas durante 10 días antes de iniciar cada tratamiento en una cámara bioclimática con un fotoperiodo de 16/8 h a 25 ± 2 °C y 55/75 + 5 % HR (día/noche) con una intensidad de luz ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) proporcionada por lámparas fluorescentes gro-lux® de luz de día (F 40 W). La elaboración de la genoteca sustractiva se llevó a cabo en un sistema semi-hidropónico entre los meses de septiembre y octubre del año 2005 en donde las plantas fueron crecidas durante 30 días en condiciones de invernadero en macetas de 7 litros de capacidad en donde se estandarizó el peso del sustrato que adicionó en cada maceta.

5.2.2 *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de *A. thaliana* fueron esterilizadas durante 10 min en solución de esterilización la cual consta de: hipoclorito de sodio: (60 ml), tritón (400 μl) y agua destilada hasta un volumen final de 200 ml. De esta solución se agregaron 500 μl a un tubo eppendorf que contenía una cantidad de semillas suficiente para cubrir apenas el fondo, y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril 5 veces para eliminar los residuos de cloro teniendo cuidado de no rebasar los 10 min de esterilización para evitar que el embrión absorba cloro y muera. La preparación de medio de crecimiento GM para las semillas (1L) consistió en: agua destilada, 0.8 L; preparado de MS, 4.7 g; sacarosa, 10 g; MES, 0.5 g; se ajustó el pH a 5.7 con KOH 1M; agar 8 g; la mezcla se esterilizó por autoclave y una vez frío se añadió kanamicina (1 mL Kan 1000X/ 1 L de medio). Las placas con medio GM y Kan se dividieron en 3 partes y se sembraron con ayuda de una pipeta Pasteur, 5 semillas de Columbia 0 (control negativo), 5 de una variedad tolerante al antibiótico conocida (control positivo) y 5 de la mutante de interés, todo en condiciones de esterilidad. Se cubrieron con papel aluminio e incubaron a 4 °C por dos días para estratificar. Luego se llevaron a la cámara de cultivo in vitro

(fotoperiodo de 16/8 h, intensidad de luz de 6000 luxes, 20-22 °C) y se monitorearon por 3 semanas. Se pasaron las plantas sobrevivientes de 2 semanas a macetas con tierra estéril y para su crecimiento en la cámara bioclimática (fotoperiodo 16/8 h, intensidad de luz 6000 luxes, 20-22 °C).

5.3 Tratamientos de estrés

5.3.1 Aplicación exógena de NaCl, poliaminas y prolina: tratamiento a largo plazo

Plantas de 10 días de edad de las dos variedades de frijol Pinto Villa y Canario 60, crecidas en las condiciones descritas previamente fueron sometidas a diversos tratamientos de manera exógena. Durante un periodo de 30 días, fueron adicionados 3 mL de cada solución para hacer 12 tratamientos en total, como se describe a continuación y al término del periodo de tratamiento las plantas fueron cosechadas, separadas en hojas, tallos y raíces y congeladas para la posterior determinación de prolina. Cada tratamiento incluyó seis réplicas.

1. Agua destilada (control)
2. NaCl 25 mM
3. NaCl 150 mM
4. NaCl 400 mM
5. Mezcla de PAs (Put 1 mM, Spd 1 μ M, Spm 1 μ M)
6. Ornitina 5 mM
7. Prolina 1 mM
8. NaCl 150 mM / mezcla de PAs
9. NaCl 150 mM / ornitina 5 mM
10. NaCl 150 mM / prolina 1 mM
11. Mezcla de PAs / prolina 1 mM / ornitina 5 mM
12. Mezcla de PAs / prolina 1 mM / ornitina 5 mM / NaCl 150 mM

5.3.2 Tratamientos salinos con NaCl

Las plantas de 10 días de ambas variedades de frijol fueron sometidas a estrés salino por 1 y 7 días adicionando NaCl a la solución nutritiva a

concentraciones finales de 0, 25, 150 y 400 mM. Estas plantas fueron utilizadas para la estimación del potencial hídrico y algunas hojas fueron escindidas para las determinaciones de clorofila y de PAs, así como para los ensayos de RT-PCR. Inmediatamente después del tratamiento todas las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido. Todos los tratamientos fueron llevados a cabo por triplicado.

5.3.3 Tratamientos con PAs, ABA, NaCl y estrés por frío a corto plazo

Fueron cortadas las hojas de plantas de 10 días de ambas variedades de frijol colocadas en tubos eppendorf conteniendo 1.5 mL de diversas soluciones durante periodos de 6 y 12 h. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado y al término de ellos las hojas fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido. Los tratamientos aplicados fueron los siguientes:

1. Agua destilada (control)
2. PAs:
 - a. Put 10 μ M,
 - b. Spd 10 μ M
 - c. Spm 10 μ M
3. ABA:
 - a. 0.1 mM
 - b. 0.2 mM
4. NaCl:
 - a. 75 mM
 - b. 200 mM
 - c. 400 mM
5. Frío a 4 °C
6. NaCl 400 mM / frío a 4 °C
7. NaCl 400 mM / ABA 0.1 mM
8. Frío 4 °C / ABA 0.1 mM
9. NaCl 400 mM / ABA 0.1 mM / frío 4 °C

5.3.4 Tratamiento de estrés salino para la construcción de la biblioteca sustractiva

Plantas de 30 días de la variedad de frijol, Pinto Villa, crecidas en semi-hidroponia en condiciones de invernadero fueron sometidas a estrés salino con NaCl 200 mM durante 5 días, manteniendo su respectivo control sin tratamiento sub-irrigado únicamente con la solución nutritiva Hoagland. Para determinar el estado de estrés de las plantas diariamente fue monitoreado el potencial hídrico en las hojas tanto de las plantas tratadas como de los controles, a partir del segundo día de tratamiento. Al llegar las plantas casi al límite del potencial hídrico indicado para frijol como su punto de marchitez permanente (-1.5 MPa), al quinto día de estrés, fueron cosechadas y congeladas separando hojas, tallos y raíces para la posterior extracción de RNA total.

5.4 Análisis bioquímicos y fisiológicos

5.4.1 Determinación de poliaminas

Un extracto del material vegetal de las muestras tratadas con NaCl fue obtenido al agregar 1 ml de ácido perclórico al 5% a 0.3 g de tejido congelado en nitrógeno líquido y pulverizado, después de una noche en incubación a 4 °C, fue centrifugado y se añadieron 0.04 mL de diamino heptano 1-7 (ICN) 0.1 mM como estándar interno a 0.2 mL de extracto. Después, 0.2 mL de Na₂CO₃ y 0.4 mL de cloruro de dansilo (acetona de 10 mg mL⁻¹, ICN) fueron agregados a la mezcla que posteriormente fue incubada toda la noche en oscuridad a temperatura ambiente. Para detener la reacción fueron añadidos 0.1 mL de prolina (100 mg mL⁻¹). Las PAs dansiladas fueron extraídas en 0.4 mL de tolueno y la fase orgánica fue evaporada al vacío. Las PAs fueron disueltas en 0.1 mL de acetonitrilo y analizadas mediante HPLC de fase reversa como ha sido descrito por Marcé et al. (1995). Se realizó un análisis estadístico mediante el sistema ANOVA de una vía para evaluar las diferencias entre los tratamientos, utilizando el software GraphPad Prism 3.0. Los experimentos fueron repetidos dos veces.

5.4.2 Determinación de prolina

La prolina libre fue extraída al hervir 0.5 g de material vegetal en 2 mL de agua destilada durante 1 h. Después fueron añadidos a 0.5 mL del extracto vegetal, 0.5 mL de citrato de sodio (0.2 mM pH 4.6) y 2 mL de ninhidrina al 1% (ácido acético-agua; 60:40). La mezcla fue hervida otra hora, posteriormente fueron adicionados 2 mL de tolueno para la extracción y finalmente fue centrifugada la muestra para separar la prolina. El contenido de prolina fue determinado espectrofotométricamente (Beckman Du-530, Fullerton, USA) a 520 nm basados en el método de la ninhidrina descrito por Magne y Larher (1992). Como estándar fue utilizada prolina pura (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

5.4.3 Determinación de clorofila

La clorofila fue extraída basándonos en el método de Arnon (1949), a partir de las hojas de plantas tratadas con NaCl descritas previamente. Acetona al 80% (0.75 ml) recién preparada fue añadida a 0.1 g de material vegetal y machacado, los tubos con el extracto fueron protegidos de la luz para evitar la degradación de la clorofila. Las muestras fueron centrifugadas 5 min a 2000 rpm y el sobrenadante fue removido cuidadosamente. La clorofila a y b fueron determinadas espectrofotométricamente a 645 y 663 nm respectivamente y después la clorofila total fue calculada. La acetona al 80% fue utilizada como estándar.

5.4.4 Determinación de potencial hídrico

Los potenciales hídricos fueron determinados en discos de hoja obtenidos a partir de las hojas totalmente abiertas más jóvenes de cada planta en todos los tratamientos (0, 25, 150 y 400 mM de NaCl). Cada disco, de 6 mm de diámetro, fue colocado inmediatamente después de la escisión en cámaras psicrométricas Wescor C-52-SF y cerradas herméticamente. El potencial hídrico se determinó después de un periodo de equilibrio de 1h, usando un microvoltímetro Wescor (Wescor HT-33T, Wescor Inc. USA). Estos experimentos se hicieron por triplicado.

5.5 Experimentos para el análisis de fenotipo en *A. thaliana*

Se esterilizaron las semillas mutantes de las líneas Salk_132923, Sail_387_D04, Salk_077789, Salk_044047, y se incubaron 2 días a 4 °C para estratificar. Posteriormente se crecieron en placas con 50 mL de medio GM en una cámara de cultivo in vitro (fotoperiodo de 16/8 h, intensidad de luz de 6000 luxes, 20-22 °C) durante una semana. Se trasplantaron a placas nuevas cuadradas divididas por la mitad, colocando 10 plantas de la línea mutante a lado de otras 10 plantas control, Columbia 0. Los tratamientos utilizados fueron 150 mM de NaCl para estrés salino y 200 mM de manitol para estrés osmótico. Se dejaron crecer 20 días en posición vertical hasta observar algún fenotipo diferencial. Para el estrés hídrico las plantas fueron sembradas en tierra y regadas durante 3 semanas, después se retiró el riego y se monitorearon durante 10 días para observar fenotipo.

5.6 Técnicas moleculares

5.6.1 Extracción de RNA total de *P. vulgaris*

Se partió de 0.1 g de tejido congelado y pulverizado. Se agregaron 0.5 mL del reactivo Plant RNA (Invitrogen) frío (4 °C). Se mezcló brevemente por vórtex hasta la que mezcla quedó totalmente resuspendida. Se incubaron los tubos 5 min a temperatura ambiente de manera horizontal para maximizar la superficie durante la extracción de RNA. Se clarificó la solución centrifugando 2 min a 12,000 $\times g$ en una microcentrífuga a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a un tubo libre de RNAsa. Se agregaron 0.1 mL de NaCl 5 M al extracto purificado y se tapó el tubo para mezclar por inversión. Se agregaron 0.3 mL de cloroformo y se mezcló nuevamente por inversión. Se centrifugaron las muestras a 4 °C por 10 min a 12,000 $\times g$ para separar las fases y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y libre de RNAsa. Se adicionó a la fase acuosa, un volumen igual de isopropanol, se mezcló y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min. A continuación se centrifugaron las muestras a 4 °C por 10 min a 12,000 $\times g$ y se decantó el sobrenadante teniendo cuidado de no perder la pastilla. Después se

agregó 1 mL de etanol al 75 % a la pastilla para lavarla (nota: la pastilla puede ser difícil de ver). Se centrifugó a temperatura ambiente por 1 min a 12,000 xg y se decantó el líquido con cuidado para no perder la pastilla. Se centrifugó brevemente otra vez para coleccionar todo el líquido y poder retirarlo con una micropipeta. Finalmente, se agregaron de 10 a 30 μL de agua libre de RNAsa, mezclando arriba y abajo para disolver el RNA. Se almacenó el RNA a $-70\text{ }^{\circ}C$ hasta su uso.

5.6.2 Extracción de DNA genómico de *A. thaliana*

Se congelaron 7 mg del material vegetal (1-2 hojas aproximadamente) en tubos Eppendorf y se pulverizaron en el politrón, posteriormente se agregaron 300 μl del buffer de homogenización (Tris HCl pH8 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM y SDS 0.5 %), se añadieron 150 μL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y se mezcló por vórtex. El tubo se llevó a $-20\text{ }^{\circ}C$ por 10 min y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. Se pasó el sobrenadante a otro Eppendorf y se añadió el mismo volumen de isopropanol. Se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 min y luego se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min y se desechó el sobrenadante. El pellet se lavó con etanol al 70 %, se centrifugó 5 min y se dejó secar. Posteriormente se resuspendió en 50 μL de agua con RNAsa y se mantuvo a $4\text{ }^{\circ}C$ durante su uso (almacenado a $-20\text{ }^{\circ}C$).

5.6.3 Extracción de RNA total de *A. thaliana* (Método de Z6)

Se congelaron y trituraron las plantas de *A. thaliana* con nitrógeno líquido. Posteriormente el tejido molido se pasó a un tubo eppendorf de 2 ml hasta la marca de 0.5 mL sin permitir que se descongelara, y se añadieron 0.5 mL de la solución Z6 (75 mL de agua destilada; 152.8 mL de guanidium HCl 8 M; 0.78 mg de MES 20 mM; se disolvió con calor aproximado de $60\text{ }^{\circ}C$ y agitación aproximadamente 20 min; sin retirar del calor, se ajustó a pH 7 con NaOH 4-10 M y se aforó a 200 mL con agua DEPC), homogenizando en vórtex y se mantuvo en hielo. Después se agregaron 0.5 mL de PCIA (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1) y se centrifugó 10 min a 11,000 rpm a $4\text{ }^{\circ}C$. Se recogió el sobrenadante y

se pasó a un tubo limpio, y sin retirar del hielo se adicionaron 0.5 mL de CIA (cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1) y se centrifugó 5 min a 11000 rpm. Se recogió nuevamente el sobrenadante y se depositó en un tubo limpio permaneciendo en hielo. Para precipitar se añadieron 1/20 volúmenes de acetato de sodio y 0.6 volúmenes de isopropanol mezclando por inversión y se dejó 10 min en hielo. Se centrifugó 10 min a 12,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se lavó una vez con 1 mL de etanol frío al 70% y se centrifugó 5 min a 12,000 rpm eliminando sobrenadante. Finalmente se secó la pastilla 4 min al aire y se resuspendió en 30 µL de agua DEPC.

5.6.4 Construcción de una biblioteca sustractiva de *P. vulgaris* bajo estrés salino

A partir de las plantas de 30 días de edad de la variedad Pinto Villa tratadas con 200 mM de NaCl en un sistema semi-hidropónico por un periodo de 5 días, se seleccionaron los días 2 y 5 de estrés para purificar el RNA total y obtención del cDNA de cadena doble mediante el Super SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) y posteriormente para obtener la amplificación selectiva de los genes expresados diferencialmente fue utilizado el PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech Laboratories Inc.) (Figura 3), siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de amplificación obtenido en la PCR final fue clonado en el vector pCR 4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA) y transformado por choque térmico a 42 °C en células químicamente competentes Select96™ Competent Cells (Promega, Madison, WI, USA). Fueron secuenciadas 380 clonas que fueron sometidas a un análisis bioinformático utilizando el programa SeqMan II (DNASTAR Inc.) a partir del cual se obtuvieron 71 unigenes que fueron identificados en el software Blastx del NCBI. Los unigenes aislados fueron clasificados en 8 categorías de acuerdo a su posible función asignada por el programa Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>).

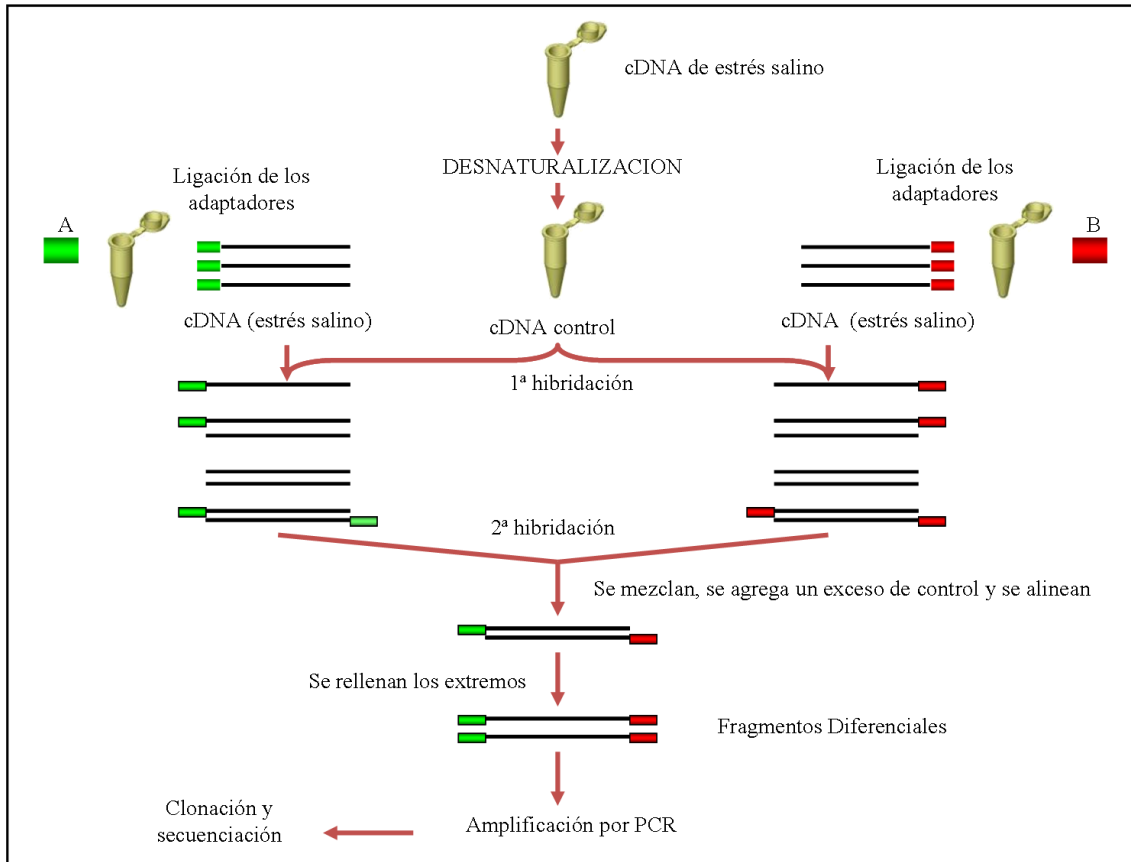


Figura 3. Protocolo general para la construcción de una Biblioteca Sustractiva

5.6.5 Clonación de un nuevo gen S-adenosilmetionina descarboxilasa (*Pvsamdc1*)

A partir de la genoteca sustractiva de frijol fueron identificados dos EST de 853 pb que forman parte de la región 5'-UTR del gen *samdc* que contiene el característico marco de lectura abierto río arriba (uORF) reportado en las SAMDC's de plantas. Estos ESTs resultaron ser diferentes del gen *Pvsamdc* que había sido aislado previamente por nuestro grupo (Jiménez-Bremont et al. 2006). Por lo tanto, para obtener la secuencia de cDNA de este nuevo gen, se diseñó el oligonucleótido UTR5SSH (ver tabla 1) en sentido y localizado al final del uORF en la región 5'-UTR, que fue utilizado en combinación con el oligonucleótido antisentido 2299 (diseñado al final del ORF). El fragmento del nuevo gen de

samdc amplificado, de 1118 pb y llamado *Pvsamdc1*, fue clonado en el vector pCR 4-TOPO y secuenciado; la secuencia obtenida fue registrada en el GenBank bajo en número de acceso EF580132.

5.6.6 Ensayos de transcripción reversa (RT-PCR)

El RNA total (5 µg) de las muestras tratadas con NaCl y purificado mediante el Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) fue tratado con 2 µL de DNAsa I (Invitrogen) e incubado 20 min a temperatura ambiente. La síntesis de la primera cadena de cDNA fue realizada mediante el kit SuperScript™ First Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, USA) y la mezcla de reacción final fue incubada a 42 °C por 50 min, después a 70 °C por 15 min y finalmente a 37 °C por 20 min con 0.5 µL de RNAsa H para remover el molde de RNA de las moléculas híbridas de cDNA:RNA. Se llevó a cabo también un control de la reacción sin transcripción reversa para confirmar el buen funcionamiento de la DNAsa.

5.6.7 Amplificación de los genes biosintéticos de poliaminas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El cDNA obtenido de la transcripción reversa fue utilizado como molde para amplificar los genes biosintéticos de las PAs, arginina descarboxilasa (*Pvadc*, GenBank AY671973), S-adenosilmetionina descarboxilasa (*Pvsamdc1*, GenBank EF580132 y *Pvsamdc2*, GenBank AY327898) y espermidina sintasa (*Pvspds*, GenBank AY674166) y como control de carga se amplificó el gen de *actina* de frijol. Las condiciones de amplificación fueron de manera general: 5 min a 94 °C para la primer desnaturalización, 50 s a 94 °C, 45 s para cada temperatura de alineamiento (56 °C para *Pvadc* y *Pvsamdc1*, 50 °C para *Pvsamdc2*, 58 °C para *Pvspds* y 55 °C para *actina*), 80 s a 72 °C, y finalmente 8 min a 72 °C para la última polimerización. Las amplificaciones fueron realizadas por duplicado con un diferente número de ciclos para asegurar una respuesta lineal en la reacción de PCR, pero presentamos sólo el ensayo de 25 ciclos. Las muestras fueron

analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 1% y documentadas utilizando el programa Doc-It[®] LS Image Analysis Software. Los fragmentos amplificados fueron confirmados por secuenciación para cada variedad de frijol.

Los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones de cada gen se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes biosintéticos de poliaminas.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia
Pvadc	38 sentido	5' CTCATTACCAAGGTGTTTATCCGGTGAA 3'
	42 antisentido	5' GGCTTCTCGTCCAAACGGTGAAT 3'
Pvsamdc1	UTR5SSH sentido	5' CTGGTTGTGTGACATAGCCCCCGTCTTCA 3'
	2299 antisentido	5' CCACCCATTCCAAGC 3'
Pvsamdc2	2274 sentido	5' GAAAAGAGGTTGGAAATATCCT 3'
	2299 antisentido	5' CCACCCATTCCAAGC 3'
Pvspds	Spe-3-5 sentido	5' CCTGGATGGTTCTCTGAAATTAGCC 3'
	Spe-3-3 antisentido	5' CTCTTCGCAAAGATGGCAAACAGAA 3'
Actina	5-Act sentido	5' ATGGGGCAGAAGGATGCGTATG 3'
	3-Act antisentido	5' AGCCTTCATAGATGGGGACCGT 3'

5.6.8 Amplificación por PCR de genes aislados en la SSH de *P. vulgaris*

Del RNA total extraído de las plantas tratadas para la genoteca sustractiva a 0 y 200 mM de NaCl, tanto de la variedad tolerante Pinto Villa como de la sensible Canario 60, fue sintetizado el cDNA mediante transcripción reversa y posteriormente se llevaron a cabo las amplificaciones por PCR de algunos genes aislados en la genoteca sustractiva para confirmar su expresión diferencial. Las condiciones de PCR fueron 5 min a 94 °C para la primera desnaturalización, 25

ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 55 °C y 1 min a 72 °C, y por último 8 min a 72 °C para la polimerización final. Los genes amplificados así como los oligonucleótidos utilizados se presentan a continuación:

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes aislados en la biblioteca sustractiva, que fueron seleccionados para los análisis de RT-PCR

Gen	Oligonucleótido	Secuencia
Proteína de 22 KDa del fotosistema II (PSII)	sentido	5' ATGCTTGGTTTTGCGGCATCA 3'
	antisentido	5' TCACCTAAACCTCCAATGGCT 3'
NADH- plastoquinona oxidoreductasa sub. K	sentido	5' GCAGGTACTGTATCCAACATG 3'
	antisentido	3' GCGTAGATAGGCTAATTCCTGT 3'
Histona H 3.2	sentido	5' ATCCGCCAAGCTTCCCTT 3'
	antisentido	5' GGCATGATGGTAACCCTCTT 3'
ATP sintasa vacuolar subunidad E	sentido	5' CATGAGCATTGTGATGACTGG 3'
	antisentido	5' ACCCTCACTAAAGGGACTAG 3'
Factor transcripcional ATHB-12	sentido	5' CATTGAGGACCAGAAGTCC 3'
	antisentido	3' TCTGTCTGATGATGACGCTAG 3'
Dehidrina (SK2)	sentido	5' AGTATGAGACCGCAGAGAG 3'
	antisentido	3' AGGCTGTGCTTCTTCTCTC 3'
Proteína de choque térmico, DNAJ	sentido	5' ATGTCATATGCTCCAAGTGCAC 3'
	antisentido	5' GGCAGCGATCTCTATCATTG 3'
LEA 18	sentido	5' TAGTGGCACCAGTTGCAGT 3'
	antisentido	5' ACCTTGAAGGGCTTCCAAC 3'
Metalotioneina tipo 2	sentido	5' GCAGAGACTGATAATTCTGATTAGC 3'
	antisentido	5' AGACTTGAGCTACACGGAGC 3'
Rubisco subunidad grande	sentido	5' CGTTGCGAACAACGGTGGAA 3'
	antisentido	5'TGCACAACACAACACAACAGCTTAT 3'
Rubisco activasa	sentido	5' ACGAGACTGAATTTGCAACTCAA 3'
	antisentido	5'AAGGCACCAAATTCATTAAGTGCAA 3'
S-adenosilmetionina sintasa	sentido	5' TTGATGAGAAGACAATTTTCCACTT 3'
	antisentido	5' GGAAGAAGGGCATAACATTAAGT 3'

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de interés en las líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana*

Gen	Oligo A. thaliana	Oligo T-DNA
ATJ3	Salk_132923 5 5' CTTGAAGGTATCTCTTGAGGATGTGTACC 3'	175LB 5' GGCAATCAGC TGTTGCCCGTCT
	Salk_132923 3 5' GACGATGCATCTGAATACGTACCAGG 3'	CACTGGTG 3'
Transportador de oligopéptidos dependiente de protones	Salk-0440475 5' AGGAAGGCCATACGTCCGTGC 3'	175LB
	Salk_044047 3 5' GGTAACGACCGAGAAATGCGTCG 3'	
ATP sintasa vacuolar, subunidad E1	Salk_003830 5 5' GGCCTAGTACATAGCTAGATCTTGTA ACTC 3'	175LB
	Salk_003830 3 5' CACATCTTCTTGCGAACATCAGCTTGC 3'	914 LB 5' TTTGGGTGA TGGTTCACGTA GTGG 3'
Ribonucleo- proteína de cloroplasto de 31 KDa	Salk_051237 5 5' AGGTGGTGGGAAGTGTGTGTGATTTAAC 3'	175LB
	Salk_051237 3 5' ACTATCAACATCGTACGGCAAGTTTCCG 3'	
	WiscdsLox383H9 5 5' GCCTATTGGGTCAAGTAAGGCCCAATAATA 3'	1031LB
	WiscdsLox383H9 3 5' CACTATCCACATCCCATGGCAGGTT 3'	5' AACGTCCGC AATGTGTTATTA AGTTGTC 3'
Factor eucariótico iniciador de la traducción 5A	Salk_022515C 5 5' TAGAGAATCTCAGAGGCCGCGTAAGATT 3'	175LB
	Salk_022515C 3 5' CGATTCACATGTGGAACCTGTGCCAAT 3'	

Caseín-cinasa II cadena alfa	Salk_022432 5 5' TACCGTCAACATCTCCGGAATCAACAAC 3'	175LB
	Salk_022432 3 5' GACTGCTGATCTCTAACAATGTCGAGCAAT 3'	
MTN3	Salk_077789 5 5' GTCTTGCTCTTAAGGATATCTATGTTGCCG 3'	175LB
	Salk_077789 3 5' CTACAACGAACTAGTACACGTGGACAATG 3'	
MTN19	Salk_078266 5 5' GTCGTCGGTTGTCTAATATCCATCCATTCT 3'	175LB
	Salk_078266 3 5' GGATTTGCAACTGATCCTGGATTCATCAC 3'	
Proteína con un motivo rico en glicina	Sail_303_G11 5 5' CCGCTATAAATAGTGGCTGTTGAAGTCG 3'	410LB 5' TAGCATCTG AATTCATAACC AATCTCGATAC AC 3'
	Sail_303_G11 3 5' ATCTGCTGGCTCTGAGATTGCATTGG 3'	
	Sail_387_D04 5 5' CCGACTTACGATATTGATCTTATCTGGCAC 3'	
	Sail_387_D04 3 5' CCAGAAAGTGCCATCATACTCTGCC 3'	

6. RESULTADOS

6.1 *Acumulación de prolina en dos variedades de frijol bajo estrés salino, y el efecto de poliaminas y ornitina exógenas.*

El objetivo general de la presente investigación fue aislar e identificar genes de frijol inducidos bajo estrés salino. Primero realizamos una caracterización fisiológica y bioquímica bajo estrés salino de dos cultivares de frijol, el Pinto Villa y el Canario 60, tolerante y sensible a estrés hídrico, respectivamente. Como un primer acercamiento, nosotros realizamos la determinación del contenido de prolina en plantas de frijol bajo condiciones de salinidad.

Para esta primera parte de la investigación, se determinó la acumulación de prolina en las dos variedades de frijol, Pinto Villa y Canario 60, bajo diferentes concentraciones de NaCl, 25, 150 y 400 mM, así como su respectivo control sin sal. La primera observación fue que ambas variedades resistieron hasta 150 mM de NaCl, sin embargo en el caso del tratamiento de 400 mM de NaCl, la variedad sensible Canario 60, no sobrevivió. Para este experimento se analizaron tres partes de las plantas tratadas: hojas, tallos y raíces, en las cuales fue determinada la concentración de prolina. El cultivar tolerante Pinto Villa no presentó una acumulación de prolina sino hasta los 400 mM de NaCl, mientras que la variedad sensible incrementó su contenido de prolina endógeno desde los 25 mM de NaCl. La adición exógena de ornitina y poliaminas a plantas de Canario 60 tratadas con 150 mM de NaCl, presentó una disminución en el nivel de prolina. Nuestros resultados sugieren que la resistencia que presenta la variedad Pinto Villa al estrés salino, probablemente depende de un mecanismo no relacionado a la síntesis de prolina y que podría ser mediado por poliaminas

BRIEF COMMUNICATION

Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine

J.F. JIMÉNEZ-BREMONT^{*1}, A. BECERRA-FLORA*, E. HERNÁNDEZ-LUCERO*,
M. RODRÍGUEZ-KESSLER*, J.A. ACOSTA-GALLEGOS** and J.G. RAMÍREZ-PIMENTEL***

*División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica,
Camino a la Presa de San José 2055, 78210 Tangamanga, San Luis Potosí, SLP, México**
*Programa de Frijol, Campo Experimental Bajío-INIFAP, AP 312, 38000-Celaya, Guanajuato, México***
*Subdirección de Investigación y Graduados Agropecuarios, Instituto Tecnológico Agropecuario No. 33,
K8 Carretera Celaya - Juventino Rosas, AP 508, 38110-Celaya, Guanajuato, México****

Abstract

Proline accumulation in two different bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars, one drought-sensitive (Canario 60) and one drought-resistant (Pinto Villa) was investigated. Both tolerated salt concentrations up to 150 mM NaCl, but the sensitive Canario 60 did not survive at 400 mM NaCl. In response to salt stress, both cvs. accumulated proline in all the analyzed tissues, the lowest contents were detected in roots. Pinto Villa accumulated higher proline concentrations than Canario 60 only at 400 mM NaCl. The addition of polyamines or ornithine increased proline content in plant tissues without stress, while they decreased it under salt stress.

Additional key words: *Phaseolus vulgaris*, putrescine, salt tolerance, spermidine, spermine.

Salinity is one of the most important abiotic stresses affecting common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) development and productivity worldwide (Bayuelo-Jiménez *et al.* 2002, Wang *et al.* 2003). Inhibition of plant growth and even plant death by NaCl is due to a reduction in water availability, sodium ions accumulation and mineral imbalances. All of these factors manifest themselves by morphological, physiological and metabolic modifications in plants, such as decrease in seed germination, decrease in shoot and root length, alterations in the integrity of cell membranes, inhibition of different enzymatic activities and photosynthesis (Dash and Panda 2001, Sairam and Tyagi 2004). Complex molecular responses including the accumulation of compatible solutes, the production of stress proteins, and the expression of different sets of genes are part of the plant signalling and defence system against salinity (for reviews, see Hasegawa *et al.* 2000, Sairam and Tyagi

2004). It is well known, that one of the most common responses to water deficit and saline environments is the accumulation of proline (Pro) which acts as a compatible solute, an osmoprotectant, and a protective agent for cytosolic enzymes and cellular organelles (Delauney and Verma 1993, Bohnert *et al.* 1995, Taylor 1996, Demir and Oztürk 2003). Additionally, Pro is a nitrogen source available for recovery from stress and for restoration of growth (Trotel *et al.* 1996). Salt-induced Pro accumulation is often a late response, appearing only when cell injury is evident, and elevated levels of Pro are maintained long enough after stressed tissues return to normal osmotic conditions (Trotel *et al.* 1996).

Polyamines (PAs) have been involved in the regulation of many physiological processes in plants (rhizogenesis, somatic embryogenesis, pollen formation, flowering and initial fruitlet abscission, dormancy and senescence), and have been related to a number of

Received 10 February 2005, accepted 19 September 2005.

Abbreviations: Orn - ornithine; PAs - polyamines; Pro - proline; Put - putrescine; Spd - spermidine; Spm - spermine.

Acknowledgement: This work was supported by the Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT-Gobierno del Estado de Guanajuato (Project FOMIX GTO-04-C02-41).

¹ Corresponding author; fax (+52) 444 8 342010, e-mail: jbremont@ipicyt.edu.mx

6.2 Efecto del estrés salino en el metabolismo de poliaminas en dos variedades de frijol.

En esta segunda sección del trabajo, continuamos con la caracterización fisiológica y bioquímica de las dos variedades de frijol bajo estrés salino, enfocándonos principalmente al metabolismo de poliaminas, y a la determinación de parámetros fisiológicos como el contenido de clorofila y el potencial hídrico.

Estas determinaciones se llevaron a cabo en hojas de plantas de frijol de los cultivares Pinto Villa y Canario 60 sometidas a 0, 25, 150 y 400 mM de NaCl por 1 y 7 días crecidas en un sistema semi-hidropónico. El estrés salino provocó una disminución en el potencial hídrico en ambos cultivares de frijol, siendo el más afectado el cultivar Canario 60. Esta drástica caída en el potencial hídrico en la variedad sensible, indica un mayor grado de deshidratación de la planta durante el estrés, presentando un daño evidente respecto a la variedad Pinto Villa. Respecto al contenido de clorofila, en la variedad Pinto Villa hubo un pico de acumulación al primer día de estrés pero después disminuyó al séptimo, mientras que Canario 60, desde el comienzo del estrés mostró una caída en el contenido de clorofila. Con los experimentos anteriores se puede señalar que la variedad Pinto Villa presenta una mayor tolerancia al estrés salino, concordando con lo reportado por Rosales-Serna et al. (2004), en donde observaron una tolerancia bajo estrés hídrico.

Con respecto a las poliaminas, después del primer día del tratamiento, los niveles de putrescina, espermidina y espermina aumentaron en la variedad tolerante mientras que en la variedad sensible sólo hubo un incremento de espermidina y espermina a 400 mM de NaCl. Al séptimo día de estrés se observó una acumulación de espermina a 150 y 400 mM en Pinto Villa, mientras que en Canario 60 cayeron los niveles de todas las poliaminas. Lo anterior sugiere que la acumulación de espermina en Pinto Villa podría ser parte del mecanismo que le confiere tolerancia a la salinidad.

Además de estos estudios, se realizó un análisis transcripcional de los principales genes correspondientes a las enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas de frijol, como la arginina descarboxilasa (*adc*), la S-adenosilmetionina descarboxilasa (*samdc*) y la espermidina sintasa (*spds*), incluyendo un nuevo parálogo del gen *samdc* (*Pvsamdc1*) aislado e identificado en este manuscrito.

El manuscrito de esta investigación fue publicado en la revista *Plant Stress* (*Plant Stress* 2 (2), 96-102, 2008).

Effect of Salt Stress on Polyamine Metabolism in Two Bean Cultivars

Eloísa Hernández-Lucero¹ • Oscar A. Ruiz² • Juan Francisco Jiménez-Bremont^{1*}

¹ Laboratorio de Estudios Moleculares de Respuesta a Estrés en Plantas, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica AC, Camino a la Presa de San José 2055, C.P. 78216, AP 3-74 Tangamanga, San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

² Unidad de Biotecnología 1, Instituto Tecnológico de Chascomús – Universidad Nacional de General San Martín (IIB-INTECH/UNSAM-CONICET), Ruta circunvalación laguna, km 6 CC164 (7130) Chascomús, Buenos Aires, Argentina

Corresponding author: * jlbremont@ipicyt.edu.mx

ABSTRACT

In agricultural areas, salinity affects plant growth, development and productivity, causing loss of economically important crops. Nitrogen-derived compounds such as polyamines (PAs) are differentially accumulated in diverse plants species in response to salinity. PA and chlorophyll (Chl) contents, as well as water potential (Ψ_w), were assessed in leaves of two common bean cultivars subjected to salt stress for one and seven days; these bean cultivars, 'Pinto Villa' and 'Canario 60', differ in their drought tolerance phenotype. Salt stress induced a phenotypic behaviour similar to that of drought in which the sensitive 'Canario 60' showed a pronounced decrease in Ψ_w , in comparison to the tolerant 'Pinto Villa'. Regarding PAs, after the first day of treatment, the levels of all of them (putrescine (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm)) increased in tolerant cultivar ('Pinto Villa') while in the sensitive one ('Canario 60') the levels of Spd and Spm only increased at 400 mM NaCl. At the seventh day, the tolerant cultivar showed an accumulation of Spm at the higher concentrations of NaCl used (150 and 400 mM), whereas a decrease in PA content occurred in the sensitive cultivar at all concentrations assayed. Furthermore, the effect of salt stress on the expression of the main genes involved in PA biosynthesis, including a new *S*-adenosylmethionine decarboxylase (*SAMDC*) gene identified in this work, was analysed. It is suggested that Spm accumulation in 'Pinto Villa' might be part of the mechanism conferring salt tolerance.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, sensitive and tolerant cultivars, water potential

Abbreviations: *ADC*, arginine decarboxylase; *Chl*, chlorophyll; *PA*, polyamine; *Put*, putrescine; *SAMDC*, *S*-adenosylmethionine decarboxylase; *Spd*, spermidine; *SPDS*, spermidine synthase; *Spm*, spermine; Ψ_w , water potential

INTRODUCTION

Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most cultivated legume in the world and is one of the main nutritional elements in Mexico. Its production reached 8.3% of the worldwide harvest; however, it has decreased as a result of environmental problems in the last few years (SAGAR 2000). In agricultural areas, salinity affects plant growth, development and productivity causing loss of whole cultures; most of the commercial crops are sensitive to relatively low salt concentrations. Around 20% of the cultivated and irrigated areas in the world are affected by salinity (Zhu 2001). Plants vary in their stress tolerance because they differ in their capacities of stress perception, signalling and response.

Some nitrogen compounds are accumulated in plants as a response to stress, including amino acids like proline, amides, ammonium, quaternary ammonium and polyamines (PAs) (Rabe 1990). PAs, putrescine (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm) in plants are frequently considered as growth regulators, involved in cell division and differentiation (Galston and Sawhney 1990). Put biosynthesis in plants can be addressed by two decarboxylases: ornithine decarboxylase (ODC; EC 4.1.1.17) and arginine decarboxylase (ADC; EC 4.1.1.19). The higher PAs, Spd and Spm are synthesized by Spd and Spm synthase (SPDS; EC 2.5.1.16 and SPMS; EC 2.5.1.22) respectively 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; EC 4.1.1.50).

PA biosynthesis increases greatly in response to stresses

and its function is presumed to be protective with a role in scavenging free radicals (Mansour 2000). NaCl-salinity causes both ionic imbalance and water stress creating membrane damage (Tiburcio *et al.* 1994). PAs prevent uptake of Na^+ , loss of K^+ and leakage of amino acids and electrolytes from plant tissues (Chattopadhyay 2002). Furthermore, it has been suggested that PAs contribute to the maintenance of the cellular cation-anion balance as well as in the stabilization of the membrane integrity through their low molecular mass and polycationic nature (Smith 1985). Salt tolerant rice and tomato cultivars have shown increased Spd and Spm levels which did not occur in the sensitive genotypes (Krishnamurthy and Bhagwat 1989; Santa-Cruz *et al.* 1997). Although a correlation between stress and PA levels have been established in diverse plants, the role of PAs in relation to plant stress tolerance is still not well understood. In view of the fact that environmental stress problems are increasing progressively, the understanding of the mechanism leading to salinity tolerance in commercial crops such as bean is of growing interest.

In order to study the effects of salinity and establish the possible bases of salinity tolerance in bean, a comparative analysis was carried out between 'Pinto Villa', tolerant to drought, and 'Canario 60' considered as drought sensitive (Acosta-Gallegos *et al.* 1995; Terán and Singh 2002; Rosales-Serna *et al.* 2004; Acosta-Gallegos pers. comm.). We analyzed salt-induced changes in PAs and chlorophyll (Chl) contents, and water potentials (Ψ_w). Effects of salt stress on the expression of the main genes involved in PA biosynthesis, including a new SAMDC (*PvSamdc1*) isolated in this work, were also assessed.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and growth conditions

Phaseolus vulgaris L., cvs. 'Pinto Villa' and 'Canario 60' seeds, sterilized with 50% commercial sodium hypochlorite during 10 min and rinsed three times with distilled water, were germinated in Petri dishes and sown in pots with a mix of sand and perlite (2:1), sub-irrigated with the nutrient solution Hoagland (Hoagland and Arnon 1950), and grown for 10 d in a bioclimatic camera (RIELSA, Mexico, Mexico) with a 16/8 h photoperiod at 25/21°C and 55/75 + 5% RH (day/night). Light intensity (80 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) was provided by day-light and grolux[®] fluorescent lamps (F 40 W). Afterwards, plants were subjected to salt stress for 1 and 7 d by adding NaCl to the nutrient solution to final concentrations of 0, 25, 150 and 400 mM. Leaves were harvested and used for Chl and PAs determinations, as well as for the RT-PCR assays. After treatment, all samples were frozen in liquid nitrogen. All treatments were performed in triplicate.

Water potential determination

Water potentials (Ψ_w) were determined in leaf discs excised from the younger expanded leaves for each plant. Discs (6 mm in diameter) were sealed immediately after excision and placed in insulated psychrometer chambers (C-52-SF, Wescor). Ψ_w were determined after 1 h equilibration periods, using a dew point microvoltmeter (HT-33T, Wescor Inc. USA).

Chlorophyll determination

Chl was extracted from leaves of the NaCl treated plants described previously based on the Arnon (1949) method. Fresh prepared cold 80% acetone (0.75 mL) was added to 0.1 g of vegetal material and ground; tubes were protected from light entirely to avoid Chl degradation. The samples were centrifuged 5 min at 2000 rpm. Carefully, the supernatant was removed, and Chl *a* and *b* were determined spectrophotometrically at 645 and 663 nm, respectively, and then total Chl was calculated. The 80% acetone was used as a standard.

Free polyamines determination

An extract from the frozen and ground 10 d old plant material (0.3 g), obtained with 1 mL of 5% perchloric acid and incubated overnight at 4°C, was centrifuged and 0.04 mL of 0.1 mM 1-7 diamino heptane (Sigma-Aldrich Munich, Germany) was added as an internal standard to 0.2 mL of extract. Then, 0.2 mL of saturated Na_2CO_3 and 0.4 mL of dansylchloride (10 mg mL^{-1} acetone, (Sigma-Aldrich Munich, Germany) were added and the mixture was incubated overnight in the dark at room temperature; 0.1 mL proline (100 mg mL^{-1}) was added to stop the reaction. Dansylated PAs were extracted in 0.4 mL toluene and the organic phase was vacuum evaporated. PAs were dissolved in 0.1 mL acetonitrile and analyzed by reverse phase HPLC as described by Marcé *et al.* (1995). Two-way-ANOVA analysis was performed to assess statistical significance between treatments, by the GraphPad Prism 3.0 software. Experiments were repeated twice with similar results.

Cloning of S-adenosylmethionine decarboxylase gene (*PvSamdc1*)

A cDNA library was constructed from the leaves of common bean plants, cultivar Pinto Villa, by Suppression Subtractive Hybridization (SSH) under saline conditions (unpublished data). Two identical expressed sequence tags (ESTs) of 853 bp were identified from such library, as part of the 5'-UTR region of the *SAMDC* gene, which contained the characteristic upstream open reading frame (uORF) reported in many plant SAMDC's. When analyzed the new ESTs found, these turned out to be different from the *PvSamdc2* gene isolated previously by our group (Jiménez-Bremont *et al.* 2006). Hence, in order to obtain the cDNA sequence of this new *SAMDC* gene, we designed the UTR5SSH sense primer located at the end of the uORF in the 5'-UTR region (Fig. 5) of the new gene fragment, and it was used in combination with the

antisense 2299 primer (designed to the end of the ORF of the previously isolated *PvSamdc2* gene). The PCR amplifications were performed in a 0.05 mL reaction mixture containing 0.001 mL of the RT reaction product as template. Primers and PCR conditions are described in the next section. The new *SAMDC* amplified gene fragment of 1118 bp, referred in this work as *PvSamdc1*, was cloned in the pCR 4-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, USA) and sequenced. The sequence obtained was registered in the GenBank under the accession no. EF580132.

RT-PCR analyses of *PvAdc*, *PvSamdc1*, *PvSamdc2* and *PvSpds* transcripts

Total RNA (0.005 mg) from the NaCl treated bean samples was extracted using the Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA). First strand cDNA synthesis was performed with the SuperScript[™] First Strand Synthesis System for reverse-transcriptase polymerase chain reaction (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions. The PAs biosynthetic genes were amplified using the next sets of primers: for the *PvAdc* (GenBank AY671973) the 38 sense 5'-CTCATTACCAAGGTGTTATCCGGTGAA-3' and the 42 antisense 5'-GGCTTCTCGTCCAACCGGTGAAT-3', for the *PvSamdc1* (GenBank EF580132) the UTR5SSH sense 5'-CTGGTTGTGTGACATAGCCCCCGTCTTC A-3' and the 2299 antisense 5'-CCACCCATTCCAAGC-3', for the *PvSamdc2* (GenBank AY327898) the 2274 sense 5'-GAAAAGAG GTTGAAATATCCT-3' and the 2299, for the *PvSpds* (GenBank AY674166) the Spe-3-5 sense 5'-CCTGGATGGTTCTCTGAAAT TAGCC-3' and the Spe-3-3 antisense 5'-CTCTTCGCAAAAGATG GCAAAACAGAA-3'. The actin used as loading control was amplified by the 5-Act sense 5'-ATGGGGCAGAAGGATGCGTA TG-3' and 3-Act antisense 5'-AGCCTTCATAGATGGGGACCGT-3'. The PCR conditions were, in general, 5 min at 94°C for the first denaturalization, 50 s at 94°C, 45 s at each melting temperature (56°C for *PvAdc* and *PvSamdc1*, 50°C for *PvSamdc2*, 58°C for *PvSpds* and 55°C for actin), 80 s at 72°C, and finally 8 min at 72°C for the last polymerization. Amplification was performed in duplicate, with a different number of cycles to ensure a linear response in the PCR reaction, and we present in this work one of such assay at 25 cycles. Samples were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels, and were analyzed using Doc-It[®] LS Image Analysis Software. The gene fragments amplified in the RT-PCR were verified by sequencing for each cultivar.

RESULTS

Effect of salt stress on water potential and total chlorophyll content in bean leaves

The physiological status of the bean plants subjected to salt stress for 1 and 7 days was assessed considering two parameters, the water potential (Ψ_w) measurements as well as the total Chl content in stressed leaves. No visible damage was observed in either cultivar at the first day of salt treatment, however, at the seventh day, the sensitive plants ('Canario 60') showed much clearer dried and folded leaves than the tolerant plants ('Pinto Villa') at 150 and 400 mM NaCl (Fig. 1). During salinity treatments the leaves water potentials were reduced in both 'Pinto Villa' and 'Canario 60', but such decrease was more pronounced in latter than the former (Fig. 2). Since the first day of stress there was a difference among the Ψ_w of both cultivars, mainly at the higher NaCl concentrations tested (150 and 400 mM); for example at 400 mM NaCl, the sensitive cultivar decreased about -0.8 MPa, while the tolerant one just reached -0.7 MPa. Such difference in Ψ_w was even more noticeable at the seventh day of stress, at 25 and 150 mM NaCl, 'Pinto Villa' registered -0.6 and -0.85 MPa, in comparison with 'Canario 60' which descended to -1.0 and -1.45 MPa, respectively (Fig. 2). At 400 mM NaCl, 'Pinto Villa' showed a Ψ_w of -1.4 MPa; however the sensitive cultivar showed no registration of Ψ_w , since it was much damaged.

It is well established that the rate of photosynthesis diminishes with stress, so, in this sense, we determined the Chl content in the same samples described previously for

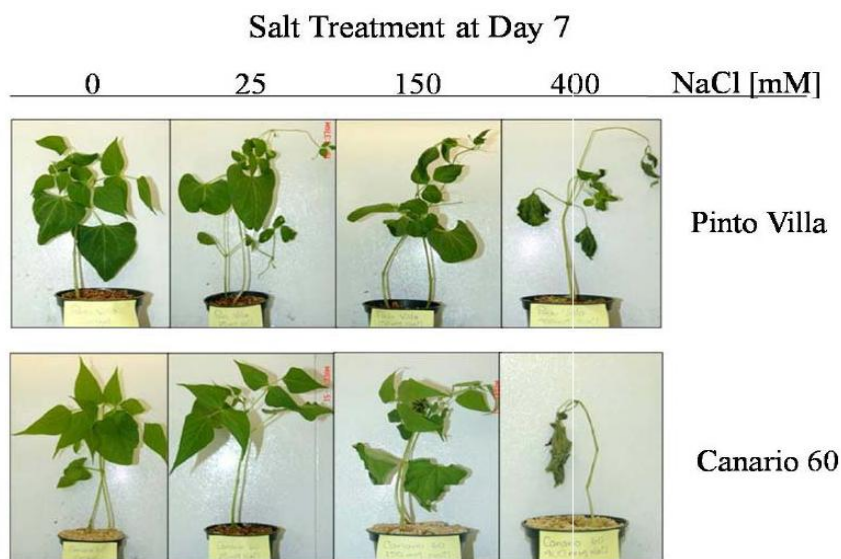


Fig. 1 Photographs of the two bean cultivars ('Pinto Villa' and 'Canario 60') at 7 days of treatment with 0, 25, 150 and 400 mM NaCl.

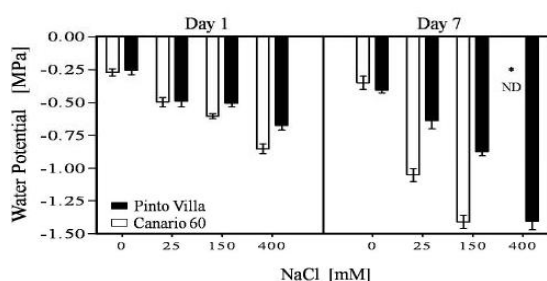


Fig. 2 Effect of NaCl on the leaf water potential of *Phaseolus vulgaris*. Leaves from two bean cultivars, 'Pinto Villa' (black bars) and 'Canario 60' (white bars), subjected to 0, 25, 150 and 400 mM NaCl for one day and seven days were used to determine the plant water potential (P_w), and reported in MPa. ND, not determined. Data are mean \pm SE (n=3).

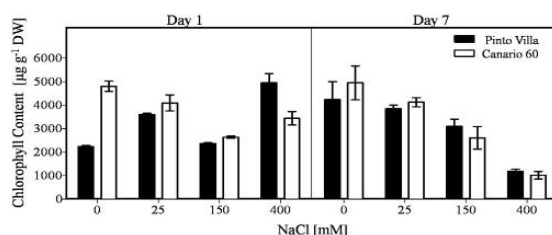


Fig. 3 Chlorophyll content in leaves of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. Leaves from two bean cultivars, 'Pinto Villa' (black bars) and 'Canario 60' (white bars), subjected to 0, 25, 150 and 400 mM NaCl for one day and seven days were detached and subjected to chlorophyll (Chl) extraction by the Arnon method. Chl content is expressed in dry weight. Data are mean \pm SE (n=3).

water potentials estimation. As shown in Fig. 3, 'Pinto Villa' presented an increased Chl content at 25 and 400 mM NaCl (1.6 and 2.2-fold, respectively) after the first day of stress, but at the seventh day the Chl level decreased 0.8-fold at 400 mM respective to the control. 'Canario 60' displayed a general decrease during both treatments periods.

Effect of salt stress on polyamine content

Free PAs (Put, Spd and Spm) were estimated as dansyl-derivatives by reversed phase HPLC (Fig. 4). After the first day of treatment, 'Pinto Villa' accumulated Put, Spd and Spm (4.7, 2.3 and 2.7-fold, respectively) at 400 mM. 'Canario 60' showed a decrease in the three PAs at 25 and 150 mM NaCl respect to control, while at 400 mM, an increase in Spd and Spm (1.3 and 3-fold, respectively) was observed. At the seventh day, the highest accumulation of PAs in 'Pinto Villa' was detected at 150 mM with Put (181.2 treated vs 94.9 control nmol g⁻¹ DW) and Spm 2-fold each. Furthermore, an increase in Spm content was also observed at 400 mM (1.5-fold). Conversely, the Spd content in this cul-

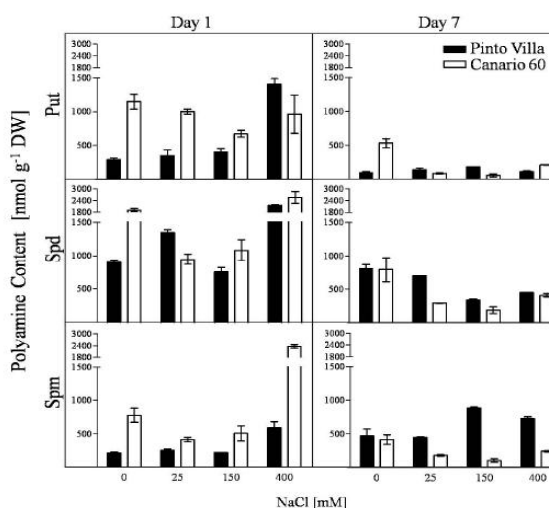


Fig. 4 Polyamine content in leaves of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. Leaves from two bean cultivars, 'Pinto Villa' and 'Canario 60', subjected to 0, 25, 150 and 400 mM NaCl for 1 d and 7 d were harvested and subjected to Put, Spd and Spm determination by reverse phase HPLC. PAs content is reported in dry weight. A Two-way-ANOVA analysis of the data was performed comparing both, treatment and cultivars, and the differences found were statistically significant with a value of P<0.05.

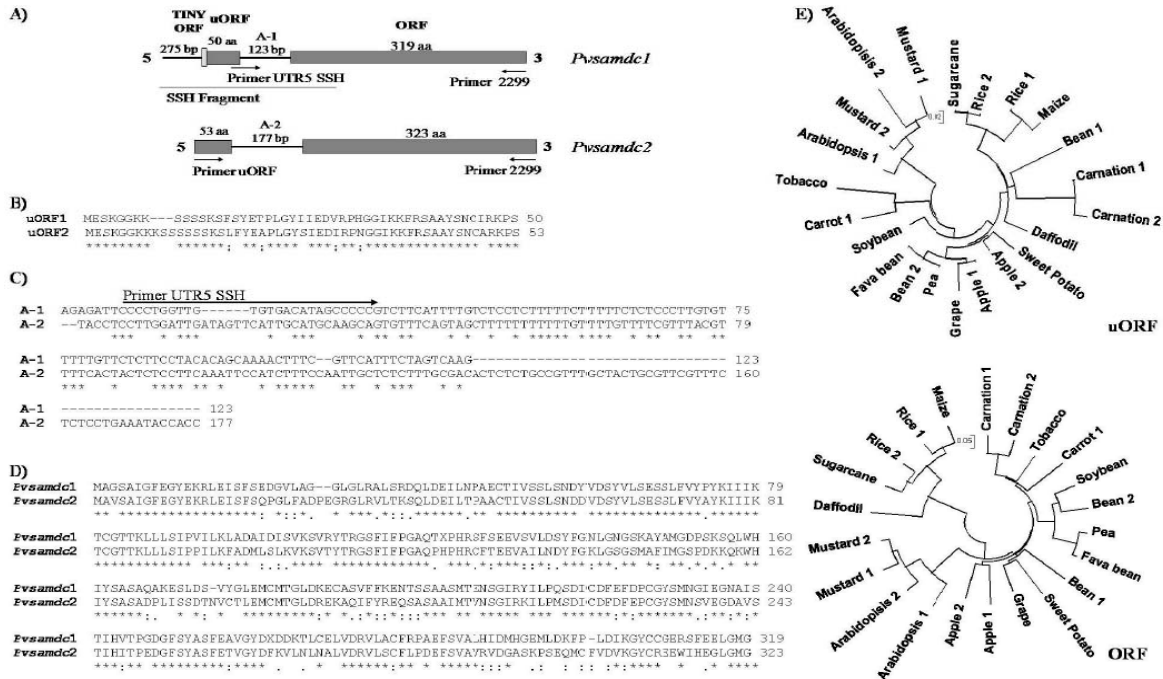


Fig. 5 Comparison among the two *Phaseolus vulgaris* SAMDC's sequences studied. A new SAMDC sequence isolated in this work was compared to the *PvSamdc2* reported previously by our group. Panel (A), shows a scheme representing the differences between both *PvSamdc*'s sequences, as well as the amplification strategy (see text for details). Panel (B), shows a comparison of the deduced amino acid sequences of the both small uORF harbored in the SAMDC mRNA 5' leader sequences. Panel (C) represents an alignment of the 5'UTR region corresponding between the uORF and the translation initial codon of the main ORF from both sequences represented as A-1 and A-2. In the panel (D) are compared the main ORFs of the sequences studied. All these comparisons were made by a ClustalW analyses; identical residues are marked by asterisks, and amino acid conserved substitutions are indicated as dots. The Panel (E) shows two phylogenetic trees generated from the two *PvSamdc* plus twenty SAMDC uORFs and ORFs from Arabidopsis (NM_001084624 and AJ251915), Mustard (X95729 and AY444341), Carrot (AY491510), Tobacco (AF033100), Carnation (U38526 and U38527), Rice (Y07766 and AJ251899), Maize (Y07767), Daffodil (AY232672), Apple (AB077441 and AB077442), Grape (AB240537), Fava bean (AJ250026), Sweet potato (AF188998), Soybean (AF488307), Pea (AB087841) and Sugarcane (EF520728).

tivar decreased 0.6-fold at 150 mM and 0.4-fold at 400 mM, respectively compared to the control. Such a decrease is inversely proportional to the increase observed in Spm at these NaCl concentrations, so it might be attributed to Spm biosynthesis. 'Canario 60' at seven days of stress showed an important decrease in all PA levels. A Two-way-ANOVA analysis of the data was performed comparing both, treatments and cultivars, and the differences found were statistically significant with a value of $P < 0.05$.

Cloning and sequence analysis of a new S-adenosylmethionine decarboxylase gene (*PvSamdc1*)

A new SAMDC sequence from an EST corresponding to the 5'-UTR region including the uORF SAMDC was isolated from a cDNA library in 'Pinto Villa' by Suppressive Subtractive Hybridization under salt stress (unpublished data). Recently, our group reported the *PvSamdc2* cDNA sequence from bean including ORF and uORF (Jiménez-Bremont *et al.* 2006), but when comparing the newly isolated sequence versus the uORF reported previously, it turned out to be different (Fig. 5A). In order to isolate the main ORF SAMDC gene, we designed the primer UTR5SSH at the end of the new uORF sequence, specific for this sequence but not for the previous 5'-UTR region of *PvSamdc2* gene; the second primer 2299, used to obtain the *PvSamdc2* gene, was designed based on the conserved regions of SAMDC enzymes from several plants. Comparisons between the 5'-UTR region as well as the main coding region (ORF) of

both bean SAMDC genes were performed as shown in Fig. 5B-D. The sequence of the new gene obtained was Registered in GenBank under the accession no. EF580132, and we refer to it as *PvSamdc1*, to differentiate it from *PvSamdc2*, as previously reported. The *PvSAMDC1* protein shares 66% identity with the bean *PvSAMDC2* (GenBank AAR00210) and the uORFSAMDC1 peptide shares 85% identity with the bean uORFSAMDC2, while the remaining 5'-UTR regions only share 19% identity. Phylogenetic trees of SAMDC proteins and uORF peptides from different plant species were constructed using MEGA 3.1 version (Kumar *et al.* 2004) (Fig. 5E). As observed in the SAMDC tree, the *PvSAMDC1* is grouped with sweet potato and grape proteins, while the *PvSAMDC2* protein is clustered in a separate group with the leguminous plants (soybean, pea and fava bean). Respect to the uORF2 (Bean2) is grouped with fava bean and pea uORFs, similar to *PvSAMDC2* protein, while a different pattern was observed in the uORF1 (Bean1), which is grouped with the uORFs 1 and 2 from carnation.

Effect of salt stress on the expression of genes involved in polyamine biosynthesis

In order to assess effects of salt treatments on expression, PAs biosynthetic genes were evaluated. The same samples as those described above for PA assays were used for RT-PCR analyses (Fig. 6). In 'Pinto Villa', *PvAdc* was down regulated by NaCl conditions during the first day of stress, contrasting to one week when the transcript increased. 'Ca-

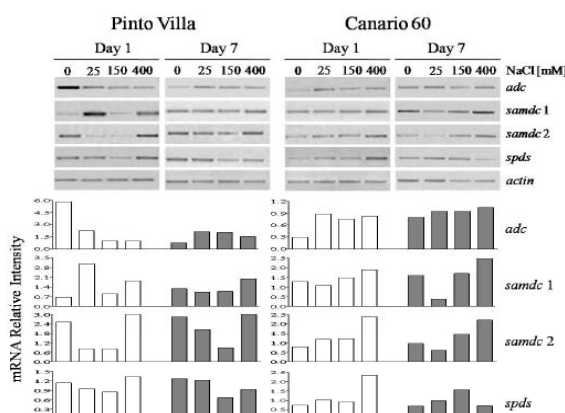


Fig. 6 Expression analyses of Arginine decarboxylase (*ADC*), *S*-adenosylmethionine decarboxylase (*SAMDC1* and *SAMDC2*) and Spermidine synthase (*SPDS*), in two bean cultivars 'Pinto Villa' and 'Canario 60' under salt stress. Ten day old bean plants were subjected to 0, 25, 150 and 400 mM NaCl and leaves were used for RT-PCR assays. Amplification was performed in duplicate, with a different number of cycles to ensure a linear response in the PCR reaction, and we present in this figure one of such assay at 25 cycles. The amplification products were loaded on each lane and separated by electrophoresis on 1% agarose gel. Actin was used as loading control.

nario 60' *PvAdc* gene showed an up regulation during both treatment periods, but was more remarkable at the first day in respect to the control condition. The new *PvSamdc1* gene showed a general up regulation in both cultivars as much to the first day as to seventh, mainly at 400 mM NaCl. In the case of *PvSamdc2* transcript, a down regulation in 'Pinto Villa' at 25 and 150 mM NaCl was observed, while 'Canario 60' maintained an expression pattern similar to *PvSamdc1* for both times. Finally, the *PvSpds* gene was repressed on the seventh day of treatment in 'Pinto Villa' under the highest salt concentrations, which correlated with the decrease observed in Spd content in this cultivar during this period. In 'Canario 60', the *PvSpds* was induced, presenting two peaks of the transcript at 400 and at 150 mM NaCl, during the first and seventh day, respectively.

DISCUSSION

Plant development and productivity are negatively affected by environmental stresses, and the cultivation of the common bean is not an exception, because more than 60% of the world production of this crop is obtained under abiotic stress conditions (Singh 1995). PAs are involved in a wide range of physiological processes in plants (Kaur-Sawhney *et al.* 2003), but the greater changes in their metabolism happen in response to several conditions of stress (Liu *et al.* 2007; Pang *et al.* 2007; Rodríguez-Kessler *et al.* 2008), including osmotic and saline (Aziz *et al.* 1997; Benavides *et al.* 1997; Maiale *et al.* 2004; Jiménez-Bremont *et al.* 2007) and have been considered like salt tolerance modulators and biochemical indicators of this stress (Sanchez *et al.* 2005). These universal multifunctional regulators of physiological processes manifest distinct anti-stress protective actions and their accumulation and protective function against various stresses are of special interest.

In this work, we studied the response to salt stress of two bean cultivars, at one day and seven days, and found a differential accumulation of PAs. These two periods were selected to investigate the effect since the beginning of the salt stress (one day) being mainly by osmotic stress, and salt (ionic) effects even more at long term at seven days. Although 'Canario 60' shows higher PA levels in the control (untreated plants) than the tolerant one, it presents an

important decrease in all PA levels under salt stress. Contrary, in 'Pinto Villa', the PA levels were generally maintained and/or increased at both 1 and 7 days, suggesting that the cultivar tend to carry on the pool of these amines under stress conditions. After the first day of treatment, at 400 mM NaCl the levels of all PAs increased in the tolerant cultivar and, in sensitive cultivar the content of Spd and Spm also increased, in comparison to control. At the seventh day, Spm increased in leaf of bean plants ('Pinto Villa') at 150 and 400 mM NaCl, while the levels of other PAs decreased or no significant changes occurred. Opposite, a decrease in PA content occurred in the sensitive 'Canario 60' at all concentrations assayed. In *Lotus glaber*, under long-term salt stress, a similar trend concerning higher polyamines content was shown, as salt induced a decrease of Spd and an increase of Spm (Sanchez *et al.* 2005). Salt tolerant Pokkali rice plants accumulate higher PAs such as Spd and Spm in response to salinity stress, while the sensitive cultivar M-1-48 is unable to maintain high levels of these PAs under similar conditions (Chattopadhyay *et al.* 2002). Yang *et al.* (2007) investigated the changes in contents of PAs in rice plants subject to water stress by using cultivars differing in drought resistance. They found that the contents of Spd and Spm in rice leaves correlated with drought resistance. Considerable controversy exists as far as which PA offers stress tolerance in plants, in which some authors affirm that Put is the crucial one for defence to stress since they have observed its accumulation. For example, in stress by potassium deficiency (Murty *et al.* 1971; Tachimoto *et al.* 1992) where apparently Put plays role replacing potassium like organic cations; however, this hypothesis cannot explain the role of Put in phosphate deprived plants, since phosphate is an inorganic anion. However, the majority of the reports agree that the higher PAs (Spd and Spm) are implied in response to diverse stresses. Again, for example, it has been reported that Spd and Spm represent an important role in stress tolerance of plants, through inhibiting the NADPH oxidation activity (Cuevas *et al.* 2004).

A sequence coding a new bean SAMDC was isolated, other than the previously reported by our group, *PvSamdc2* (Jiménez-Bremont *et al.* 2006). The bean SAMDC1 and SAMDC2 proteins shares 66% of identity between them, however, their own uORFs peptides show 86% identity. The presence of more than one *SAMDC* transcripts in plants is common; for example, it has been reported in carnation, Arabidopsis and mustard (Lee *et al.* 1997; Franceschetti *et al.* 2001; Hu *et al.* 2005). Several plant *SAMDC* mRNAs have been shown to possess a uORF of 50-54 amino acids in the 5'-UTR region (Franceschetti *et al.* 2001). These peptides have been shown to be highly conserved among different plant SAMDCs, with a variation towards the N-terminus, in serine residues, as we observed in both uORFs reported in the present work. Several reports have shown that the uORF plays important roles in translational regulation of the downstream cistron (Hanfrey *et al.* 2002). We reported an induction of *PvAdc* transcript in both cultivars studied, except for the first day of treatment in 'Pinto Villa' where a dramatic down regulation was observed. *PvSamdc1* and *PvSamdc2* were differentially regulated between the two bean cultivars, while 'Canario 60' showed a global induction in expression of both genes, apparently in a salt concentration dependent manner; 'Pinto Villa' manifested an induction peak of *PvSamdc1* at 25 and 400 mM NaCl at first and seventh days, respectively. Recently, a report in transgenic tobacco plants overexpressing a *SAMDC* gene from carnation showed an increased photosynthetic rate and attenuation of stress induced damage, like yellowing and chlorophyll degradation under salt, cold and acidic treatment (Wi *et al.* 2006). In tolerant rice (cv. 'Pokkali'), an up regulation of *Samdc2* at 3 h of salt stress was observed (Kawasaki *et al.* 2001). Some reports have shown a high tolerance to salinity in transgenic rice, tobacco, sweet potato, pear and Arabidopsis plants overexpressing *ADC*, *ODC*, *SAMDC* or *SPDS* under the control of cauliflower mosaic virus 35S or ABA-inducible promoters (Roy and Wu 2001;

Kumria and Rajam 2002; Waic and Rajam 2003; Kasukabe *et al.* 2004, 2006; Wen *et al.* 2008). In respect to *PvSpds*, the first day showed an induction in both cultivars at 400 mM NaCl and at the seventh day 'Canario 60' manifested an induction peak at 150 mM. *PvSpds* showed a down regulation in 'Pinto Villa' at the seventh day of stress which correlated with a decrease in free Spd observed to the seventh day of salinity in 'Pinto Villa'. Differential expression of *ZmSpds2* gene has been reported in maize cultivar under salt stress (Rodríguez-Kessler *et al.* 2006). Additionally, two *ZmSpds2* splicing variants (*ZmSpds2A* and *ZmSpds2B*) were up-regulated under these conditions. In this study, it seems that expression of these four bean genes involved in PA biosynthesis did not parallel the change with the free PA levels. Inconsistency in gene expression and PA contents has been reported in many studies (Alcázar *et al.* 2006; Hummel *et al.* 2004; Liu and Moriguchi 2007) which should be explained by the existence of other PA biosynthetic genes in the bean genome, the regulation of PAs at the post-transcriptional and/or translational levels, and PA conjugation and/or oxidation.

Salt stress decreases the availability of water to plant cells. This decreased availability of water is quantified as a decrease in water potential. Plants resist low water potential by modifying water uptake and loss to avoid low water potential, accumulating solutes and modifying the properties of cell walls to avoid the dehydration, and utilizing protective proteins and mechanisms to tolerate reduced water content by preventing or repairing cell damage (Verslues *et al.* 2006). The results showed a decrease in the leaves water potential in both cultivars under salt stress with a stronger decrease in 'Canario 60'. The lower decrease in the water potential of the leaves in 'Pinto Villa' showed that this cultivar contain mechanisms for counteracting the effect of stress. On the other hand, changes in leaf Chl content can be used as an indicator of maximum photosynthetic capacity, leaf developmental stage, productivity and stress. The growth decrease induced by salt stress is frequently associated to a diminution on its photosynthetic capacity and accompanied with the degradation of Chl and Chl protein complexes (Curran *et al.* 1990; Lichtenthaler *et al.* 1996; Zagolski *et al.* 1996). Accordingly, we observed a reduction in the total Chl content in both cultivars throughout the stress period; however, the tolerant cultivar at the beginning of stress (one day) raised its Chl content at 25 and 400 mM NaCl, compared to the control. Furthermore, in this cultivar the Chl content displayed a similar tendency to PA content, particularly Spd. In this sense, a possible correlation between the accumulation of PAs and the rise in Chl is suggested, with a protective role on the photosynthetic apparatus under various environmental stresses (Navakoudis *et al.* 2007). Tassoni *et al.* (2000) reported that exogenous application of Spd increased the amount of total Chl in *A. thaliana* seedlings at both the rosette and flowering plant stage.

Our results agree with the concept that PAs may be involved in salt stress protection. PA accumulation, specifically Spm, might be part of mechanism conferring salt tolerance to 'Pinto Villa' and not to 'Canario 60'. There are several ways in which PAs could confer salt tolerance; they could act by stabilizing proteins and membranes, by scavenging radicals, by affecting ion uptake or by inhibiting stomatal opening (Tiburcio *et al.* 1994; Drolet *et al.* 1986, Yamaguchi *et al.* 2007). In particular, Spm having a longer chain and more positive charges could provide more effective neutralizing and membrane stabilizing. A recent report in an *Arabidopsis* double knockout mutant plant which cannot produce Spm showed hypersensitivity to high salt, and this phenotype was abrogated by exogenously applied Spm. Furthermore, this mutant exhibited a symptom of Ca^{2+} deficiency, evidencing the protective role for Spm in the context of responses to ionic stress (Yamaguchi *et al.* 2006).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge Dr. Tulio Arredondo for a

microvoltmeter system. This work was supported by the Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT-Gobierno del Estado de Guanajuato (Project FOMIXGTO-04-C02-41).

REFERENCES

- Acosta Gallegos JA, Ochoa-Marquez R, Arrieta-Montiel MP, Ibarra-Pérez F, Pajarito Ravelero A, Sanchez-Valdez I (1995) Registration of "Pinto Villa" Common Bean. *Crop Science* 35, 1211-1212
- Alcázar R, Marco F, Cuevas JC, Patron M, Fernando A, Carrasco P, Tiburcio AF, Altabella T (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters* 28, 1867-1876
- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24, 1-15
- Aziz A, Martín-Tanguy J, Larher F (1997) Plasticity of polyamine metabolism associated with high osmotic stress in rape leaf discs and with ethylene treatment. *Plant Growth Regulation* 21, 153-163
- Benavides MP, Aizceang GI, Tomaro ML (1997) Polyamines in *Helianthus annuus* L. during germination under salt stress. *Plant Growth Regulation* 16, 205-211
- Chattopadhyay MK, Tiwari BS, Chattopadhyay G, Bose A, Sengupta DN, Ghosh B (2002) Protective role of exogenous polyamines on salinity-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* 116, 192-199
- Cuevas JC, Sanchez DH, Marina M, Ruiz OA (2004) Do polyamines modulate the *Lotus glaber* NADPH oxidation activity induced by the herbicide methyl viologen? *Functional Plant Biology* 31, 921-928
- Curran PJ, Dungan JL, Gholz HL (1990) Exploring the relationship between reflectance red-edge and chlorophyll content in slash pine. *Tree Physiology* 7, 33-48
- Drolet G, Dumbroff EB, Legge RL, Thompson JE (1986) Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry* 25, 367-371
- Franceschetti M, Hanfrey C, Scaramagli S, Torrigiani P, Bagni N, Burtin D, Michael AJ (2001) Characterization of monocot and dicot plant S-adenosyl-L-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, Kaur-Sawhney R (1990) Polyamines. *Plant Physiology* 94, 406-410
- Hanfrey C, Franceschetti M, Mayer M, Illingworth C, Michael AJ (2002) Abrogation of upstream open reading frame mediated translational control of a plant Sadenosylmethionine decarboxylase results in polyamine disruption and growth perturbations. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 44131-44139
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method of growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347
- Hu WW, Gong H, Pua EC (2005) Molecular cloning and characterization of S-adenosylmethionine decarboxylase genes from mustard (*Brassica juncea*). *Physiologia Plantarum* 124, 25-40
- Hummel I, Gouesbet G, Amrani AE, Ainouche A, Couée 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
- Jiménez-Bremont JF, Hernández-Lucero E, Alpuche-Solis AG, Casas-Flores S, Barba de la Rosa AP (2006) Differential distribution of transcripts from genes involved in polyamine biosynthesis in bean plants. *Biologia Plantarum* 50, 551-558
- Jiménez-Bremont JF, Ruiz O, Rodríguez-Kessler M (2007) Modulation of spermidine and spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 45, 812-821
- Kasukabe Y, He L, Nada K, Misawa S, Ihara I, Tachibana S (2004) 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 Physiology* 45, 712-722
- Kasukabe Y, He L, Watakabe Y, Otani M, Shimada T, Tachibana S (2006) Improvement of environmental stress tolerance of sweet potato by introduction of genes for spermidine synthase. *Plant Biotechnology* 23, 75-83
- Kaur-Sawhney R, Tiburcio AF, Altabella T, Galston AW (2003) Polyamines in plants: an overview. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2, 1-12
- Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazzile S, Kawai K, Galbraith D, Bohnert HJ (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant Cell* 13, 889-905
- Krishnamurthy R, Bhagwat KA (1989) Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars. *Plant Physiology* 91, 500-504
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150-163
- Kumria R, Rajam MV (2002) Ornithine decarboxylase transgene in tobacco affects polyamines, *in vitro* morphogenesis and response to salt stress. *Journal of Plant Physiology* 159, 983-990
- Lee MM, Lee SH, Park KY (1997) Effects of spermine on ethylene biosyn-

- thesis in cut carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers during senescence. *Journal of Plant Physiology* **151**, 68-73
- Lichtenthaler HK, Buschmann C, Rinderle U, Schmuck G (1996) Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. *Radiation and Environmental Biophysics* **25**, 297-308
- Liu JH, Moriguchi T (2007) Changes in free polyamines and gene expression during peach flower development. *Biologia Plantarum* **51**, 530-532
- Liu JH, Kitashiba H, Wang J, Ban Y, Moriguchi T (2007) Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnology* **24**, 117-26
- Maiale S, Sánchez DH, Guirado A, Vidal A, Ruiz OA (2004) Spermine accumulation under salt stress. *Journal of Plant Physiology* **161**, 35-42
- Mansour MMF (2000) Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biologia Plantarum* **43**, 491-500
- 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
- Murty KS, Smith TA, Rould C (1971) The relation between the putrescine content and potassium status of black currant leaves. *Annals of Botany* **35**, 687-695
- Navakoudis E, Vrentzou K, Kotzabasis K (2007) A polyamine-and LHCII protease activity based mechanism regulates the plasticity and adaptation status of the photosynthetic apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta* **1767**, 261-71
- Pang XM, Zhang ZY, Wen XP, Ban Y, Moriguchi T (2007) Polyamines, all-purpose players in response to environment stresses in plants. *Plant Stress* **1**, 173-188
- Rabe E (1990) Stress physiology: The functional significance of the accumulation of nitrogen containing compounds. *Journal of Horticultural Science* **65**, 231-243
- Rodríguez-Kessler M, Alpuche-Solis A, Ruiz O, Jiménez-Bremont JF (2006) Effect of salt stress on the regulation of maize (*Zea mays* L.) genes involved in polyamine biosynthesis. *Plant Growth Regulation* **48**, 175-185
- Rodríguez-Kessler M, Ruiz O, Maiale S, Ruiz-Herrera J, Jiménez-Bremont JF (2008) Polyamine metabolism in maize tumors induced by *Ustilago maydis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 805-814
- Rosales-Serna R, Kohashi-Shibata J, Acosta-Gallegos JA, Trejo-Lopez C, Ortiz-Cereceres J, Kelly JD (2004) Biomass distribution, maturity acceleration and yield in drought stressed common bean cultivars. *Field Crops Research* **85**, 203-211
- Roy M, Wu R (2001) Arginine decarboxylase transgene expression and analysis of environmental stress tolerance in transgenic rice. *Plant Science* **160**, 869-875
- SAGAR (Secretariat of Agriculture) (2000) Actual situation and perspective of bean production in Mexico: 1990-2000, CEA-SAGAR
- Sánchez DH, Cuevas JC, Chiesa MA, Ruiz OA (2005) Free spermidine and spermine content in *Lotus glaber* under long-term salt stress. *Plant Science* **168**, 541-546
- Santa-Cruz A, Acosta M, Pérez-Alfocea F, Bolarin MC (1997) Changes in free polyamine levels induced by salt stress in leaves of cultivated and wild tomato species. *Physiologia Plantarum* **101**, 341-346
- Singh SP (1995) Selection for water stress tolerance in interracial populations of common bean. *Crop Science* **35**, 118-124
- Smith TA (1985) Polyamines. *Annual Review of Plant Physiology* **36**, 117-143
- Tachimoto M, Fukutomi M, Matsushiro H, Kobayashi M, Takahashi E (1992) Role of putrescine in *Lemna* plants under potassium deficiency. *Soil Science and Plant Nutrition* **38**, 307-313
- Tassoni A, van Buuren M, Franceschetti ML, Fornalé S, Bagni N (2000) Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 383-393
- Terán H, Singh SP (2002) Comparison of sources and lines selected for drought resistance in common bean. *Crop Science* **42**, 64-70
- Tiburcio AF, Besford RT, Capell T, Borrell A, Testillano PS, Risueno MC (1994) Mechanism of polyamine action during senescence responses induced by osmotic stress. *Journal of Experimental Botany* **45**, 1789-1800
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal* **45**, 523-539
- Waite B, Rajam MV (2003) Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine gene. *Plant Science* **164**, 727-734
- Wen XP, Pang XM, Matsuda N, Kita M, Inoue H, Hao YJ, Honda C, Moriguchi T (2008) Over-expression of the apple spermidine synthase gene in pear confers multiple abiotic stress tolerance by altering polyamine titers. *Transgenic Research* **17**, 251-263
- Wi SJ, Kim WT, Park KY (2006) Overexpression of carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stress in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Reports* **25**, 1111-1121
- Yamaguchi K, Takahashi Y, Berberich T, Imai A, Miyazaki A, Takahashi T, Michael A, Kusano T (2006) The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **580**, 6783-6788
- Yamaguchi K, Takahashi Y, Berberich T, Imai A, Takahashi T, Michael AJ, Kusano Y (2007) A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **352**, 486-490
- Yang J, Zhang J, Liu K, Wang Z, Liu L (2007) Involvement of polyamines in the drought resistance of rice. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1545-1555
- Zagolski F, Pinel V, Romier J, Alcayde D, Gastellu-Etcheberry JP, Giordano G, Marty G, Mougín E, Joffre R (1996) Forest canopy chemistry with high spectral resolution remote sensing. *International Journal of Remote Sensing* **17**, 1107-1128
- Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* **6**, 66-71

6.3 **Respuesta diferencial de los genes biosintéticos de poliaminas a estrés abiótico y la aplicación de ácido abscísico en dos variedades de frijol.**

Nuestro siguiente objetivo fue la caracterización a nivel transcripcional de los principales genes correspondientes a las enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas de frijol, en un sistema de hoja cortada bajo diversas condiciones de estrés abiótico y la aplicación exógena de ácido abscísico (ABA) y poliaminas. Para alcanzar nuestro objetivo, estudiamos el efecto de la adición exógena de poliaminas (putrescina, espermidina y espermina a 10 μ M cada una) y ABA (0.1 y 0.2 mM) por 6 y 12 h, en la expresión de *adc*, *samdc 1* y *2*, y *spds* en las dos variedades de frijol. Los transcritos de estos genes mostraron un efecto poliamina y tiempo dependiente en Pinto Villa pero no en el cultivar Canario 60. Por otro lado, ABA indujo la expresión de todos los transcritos en la variedad tolerante Pinto Villa a 0.1 mM pero a 0.2 mM los transcritos fueron reprimidos, mientras que en Canario 60 no se observaron cambios significativos.

La segunda parte del experimento fue el estudio del efecto de ABA, NaCl y frío así como las combinaciones de estos tratamientos. Se observó que todos los tratamientos indujeron al gen de la *adc* a corto plazo pero lo mantuvieron o reprimieron a las 12 h en ambos cultivares. Los dos transcritos de *samdc* (1 y 2) fueron diferencialmente regulados; en la variedad tolerante, *samdc1* no presentó cambios a 6 h mientras que *samdc2* fue inducida en todos los tratamientos, pero a las 12 h ambos genes fueron sobreexpresados; en la variedad sensible el transcrito de *samdc1* siempre presentó una expresión más baja comparado con *samdc2*. El gen de la *spds* fue inducido en ambos cultivares por NaCl y NaCl/ABA, y en Pinto Villa también por NaCl/4°C. La salinidad y el frío son estreses abióticos de respuesta a ABA, y nuestros datos sugieren que en ambas variedades, pero más notablemente en la tolerante, ABA modula el metabolismo de poliaminas a nivel transcripcional en estas condiciones estudiadas.

Differential response of the polyamine biosynthetic genes to ABA, NaCl and cold stresses in two bean cultivars.

Eloísa Hernández-Lucero and Juan Francisco Jiménez-Bremont.

División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., Camino a la Presa de San José 2055, C.P. 78210, San Luis Potosí, SLP, México

Corresponding author;

Juan Francisco Jiménez Bremont

Tel. (+52) 444 8342000 ext. 2080

Fax (+52) 444 8 342010

Email: jbremont@ipicyt.edu.mx

KEYWORDS: Abscisic acid, *Phaseolus vulgaris*, polyamines, abiotic stress, sensitive and tolerant cultivars, salt and cold stress.

ABSTRACT

Polyamines (PAs) are known to contribute to increasing tolerance of plants under stress. Studying the regulation of the PA biosynthetic genes (*Pvadc*, *Pvsamdc1*, *Pvsamdc2* and *Pvspds*) in stress will allow us to elucidate the molecular basis of the PA biosynthesis under adverse conditions. To achieve our objective, we studied the effect of exogenous PAs and ABA at 6 and 12 h, in the expression of such genes in two bean cultivars Pinto Villa and Canario 60, tolerant and sensitive to drought respectively. PAs showed a time- and polyamine-dependent effect in all transcripts in Pinto Villa but not in Canario 60. ABA induced the expression in Pinto Villa at 0.1 mM while 0.2 mM down-regulated the transcripts and Canario 60 remained without significant changes. We also analyzed the effect of ABA, salt, and cold treatments and their combinations and observed that all treatments induced the *Pvadc* at short term but maintained or repressed it at longer periods in both cultivars; *Pvsamdc*'s were differentially regulated, in the tolerant cultivar, the *Pvsamdc1* did not change at 6 h while *Pvsamdc2* was induced in all treatments, but at 12 h both genes were up regulated; in the sensitive, the *Pvsamdc1* always presented a lower expression than *Pvsamdc2*. *Pvspds* was upregulated in both cultivars by salt and NaCl/ABA and in Pinto Villa also by NaCl/4°C. Salinity and chilling are abiotic stress responding by ABA, our data suggest that in both cultivars, but more noticeably in the tolerant, ABA modulates PAs metabolism at the transcriptional level.

INTRODUCTION

Plants respond to abiotic and biotic stresses by inducing the expression of a set of genes whose products are thought to help overcome these adverse conditions. Different plant growth regulators, such as abscisic acid (ABA) and polyamines (PAs) are involved in regulating these changes in gene expression (Slocum and Flores, 1991; Kasukabe *et al.*, 2004; Urano *et al.*, 2004; Alcázar *et al.*, 2006; Hare *et al.*, 1999).

The PAs putrescine (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm) are essential for cell growth and viability, and contribute in regulation of diverse vital processes under both normal and stress conditions. These polycations displaying a high biological activity are present in all compartments of the plant cell, including nucleus, which indicates their participation in diverse fundamental processes in the cell (Bouchereau *et al.*, 1999). They are involved in the processes of replication, transcription, translation, membrane stabilization and enzyme activity modulation; they could regulate genome activity, cell division and expansion, and plant growth and development (Bouchereau *et al.*, 1999; Kaur-Sawhney *et al.*, 2003; Alcazar *et al.*, 2006). The PA metabolic pathway is regulated by a limited number of key enzymes (Tiburcio *et al.*, 1997). In plants, Put is not only produced directly from ornithine by ODC (EC 4.1.1.17) but also produced indirectly from arginine by arginine decarboxylase (ADC; EC 4.1.1.19) via agmatine (Agm). Put is then converted into Spd and Spm by Spd synthase (SPDS; EC 2.5.1.16) and Spm synthase (SPMS; EC 2.5.1.22), respectively, which add aminopropyl groups generated from S-adenosylmethionine (SAM) by S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC; EC 4.1.1.50).

Stress-induced PA accumulation and their protective function against stress are of special interest. PAs protective role is manifested in their capability of neutralizing the action of reactive oxygen species dangerous for the cell structures and accumulated under the effect of various abiotic and biotic stresses (Bors *et al.*, 1989; Shevyakova *et al.*, 2004; Hasegawa *et al.*, 2000). PA binding to proteins or nucleic acids not only protects them from degradation but also provides to the

molecule the most stable conformation under stress conditions. Thus, Spd and Spm retard cell aging, which is accelerated under stress conditions, due to the suppression of the enzymes degrading biopolymers (DNases, RNases and proteases) and preventing chlorophyll breakdown (Legocka and Zaichert, 1999). Stress-tolerant plants increase their endogenous PA levels to a much greater extent than the sensitive ones (Lee, 1997). Moreover, transgenic plants overproducing PA have been indicated to possess greater stress tolerance (Kasukabe *et al.*, 2004, Roy and Wu, 2002; Capell *et al.*, 2004; Waie and Rajam, 2003; Wi *et al.*, 2006).

ABA, an important growth regulator during plant growth and development, has been demonstrated to be involved in many plant developmental processes, especially seed development including maturation and germination, and plant response to environmental factors. The plant hormone ABA, which endogenously increases when tissues become dehydrated, is an important signal for the physiological and molecular responses to stress, such as desiccation, salt stress, and cold (Zeevaart and Creelman, 1988; Hetherington and Quatrano, 1991) and further induced the expressions of the related genes to improve the resistance of plants. Results derived from transcriptome profiling experiments and PA levels determinations indicate that abscisic acid (ABA) modulates most significant changes of PA metabolism in *A. thaliana* plants subjected to water stress (Alcázar *et al.*, 2006).

As part of the interest in our group to elucidate the regulatory mechanism of PAs in plant response to stress, in this work we studied the effect of exogenous PAs and ABA at 6 and 12 h, on the expression of PA biosynthetic genes in two bean cultivars Pinto Villa and Canario 60, tolerant and sensitive to drought respectively. Finally the effect of salt, cold and combination of these with ABA was also analyzed in leaves of the two bean cultivars.

MATERIAL AND METHODS

Plant Material and Growth Conditions

Phaseolus vulgaris L., cv. Pinto Villa and Canario 60 seeds, sterilized with 50% commercial sodium hypochlorite during 10 min and rinsed three times with distilled water, were germinated in Petri dishes and sown in pots with a mix of sand and perlite (3:1), sub-irrigated with the nutrient solution Hoagland (1950), and grown for 10 d in a bioclimatic camera with a 16/8 h photoperiod at 25/21 °C and 55/75 + 5% RH (day/night). Light intensity ($80 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) was provided by day-light and grolux® fluorescent lamps (F40W).

Polyamines Treatment

Detached leaves from 10 days old plants from the two bean cultivars studied Pinto Villa and Canario 60, were subjected to exogenous application of polyamines for 6 and 12 h in Eppendorf tubes containing 1.5 mL of each solution. PAs were used separately at 10 μM each, Put, Spd and Spm, as well as distilled water as the control condition. Leaves with the treatments were kept in the same growing camera under light conditions. All treatments were made by triplicate. After PAs treatment, samples were frozen in liquid nitrogen for their total RNA isolation.

ABA Treatment

Leaves from the 10 d old plants from the two bean cultivars, were detached and subjected to exogenous application of ABA during 6 and 12 h in Eppendorf tubes containing 1.5 mL of each solution by triplicate. Two ABA concentrations were used, 0.1 and 0.2 mM, distilled water was used as control. Treatments were applied under light conditions in the same growing camera. All treatments were performed by triplicate. After treatments, all samples were frozen in liquid nitrogen for subsequent total RNA isolation.

Stress Treatments

Leaves from the 10 d old plants from each cultivar were detached and submitted to nine stress treatments in triplicate: 75, 200 and 400 mM NaCl, 4 °C (cold), 400 mM NaCl/4 °C, 400 mM NaCl/0.1 mM ABA, 4 °C/0.1 mM ABA, 400 mM NaCl/0.1 mM ABA/4 °C and distilled water was used as control. During the stress treatments, the leaves remain in the same bioclimatic growing camera. All treatments were performed by triplicate and after all samples were frozen in liquid nitrogen for subsequent total RNA isolation.

RT-PCR Analyses of *Pvadc*, *Pvsamdc1*, *Pvsamdc2* and *Pvspds* Transcripts

Total RNA (0.005 mg) from each treated samples was extracted using the Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen). First strand cDNA synthesis was performed with SuperScript™ First Strand Synthesis System for reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR; Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The PAs biosynthetic genes *Pvadc*, *Pvsamdc2*, and *Pvspds* were amplified using the primers already reported in Jimenez-Bremont et al. (2006). For the *Pvsamdc1* (GenBank accession no. [EF580132](#)) the UTR5SSH sense 5' CTGGTTGTGTGACATAGCCCCGTCTTCA 3' and the 2299 antisense 5'-CCACCCATTCCAAGC-3'. The PCR conditions were, in general, 5 min at 94 °C for the first denaturalization, 50 s at 94 °C, 45 s at each melting temperature (56 °C for *Pvadc* and *Pvsamdc1*, 50 °C for *Pvsamdc2*, 58 °C for *Pvspds* and 55 °C for *actin*), 80 s at 72 °C, and finally 8 min at 72 °C for the last polymerization. Amplification was performed in duplicate, with a different number of cycles to ensure a linear response in the PCR reaction, and we present in this work one of such assay at 25 cycles. Samples were separated by electrophoresis on 1% agarose gels, and analyzed using the Doc-It® LS Image Analysis Software. The gene fragments amplified in the RT-PCR were verified by sequencing for each cultivar.

RESULTS

Effect of PA Treatment on Expression of Polyamine Biosynthetic Genes

To examine whether *Pvadc*, *Pvsamdc1*, *Pvsamdc2* and *Pvspds* expression was altered in response to PAs, RT-PCR analyses were carried out using the detached leaves of 10-day-old plants from two bean cultivars, Pinto Villa and Canario 60, which differ in their drought (Rosales-Serna *et al.*, 2004) and salt tolerance (Hernández-Lucero *et al.*, 2008). Each cultivar was subjected to the exogenous application of Put, Spd and Spm (10 μ M each), and distilled water (control), for 6 and 12 h (**Fig.1**). The application of exogenous PAs had a time- and polyamine-dependent effect on *Pvadc*, *Pvsamdc1*, *Pvsamdc2* and *Pvspds* gene expression. In Pinto Villa cultivar, at 6 h of treatment *Pvadc* was up-regulated by Spm while addition of Put and Spd produced a global down regulation; at 12 h, the *Pvadc* was induced by all treatments and the rest of the transcripts were accumulated by treatment with Put and Spm. In Canario 60 cultivar, the *Pvadc* was accumulated at both periods by Spm, whereas at 12 h, both *samdc* genes (isoform 1 and 2) were repressed by Put, and *Pvsamdc1* also by Spd; the *Pvspds* transcript did not show significant changes.

Effect of ABA Treatment on Expression of Polyamine Biosynthetic Genes

In order to assess effects of ABA treatments on expression, PAs biosynthetic genes in both cultivars were evaluated. The same detached leaf system as described above for PA assays were used for RT-PCR analyses (**Fig.1**). ABA treatments were performed by the exogenous application of 0.1 and 0.2 mM of this hormone for 6 and 12 h. Our results revealed significant induction in the expression levels by 0.1 mM ABA of these gene transcripts in the tolerant cultivar. Nevertheless, the opposite effect we observed with higher ABA concentration (0.2 mM). Canario 60 cultivar showed an overexpression only in *Pvadc* at 6 h by 0.2 mM ABA and a down-regulation of the *Pvsamdc1* at 12 h at both ABA concentrations; the rest of the transcripts remained without significant changes.

Effect of Salt and Cold Stresses on the Expression of the PAs Biosynthetic Genes

Based on the data of the PA and ABA treatments, we were interested in knowing whether salt and cold stresses induced the response of these genes. Using the same detached leaf system in both cultivars, the effect of different NaCl concentrations (75, 200 and 400 mM), low temperature (4 °C), and diverse combinations as: 400 mM NaCl/4 °C, 400 mM NaCl/0.1 mM ABA, 4 °C/0.1 mM ABA and 400 mM NaCl/0.1 mM ABA/4°C on the expression of the PAs biosynthetic genes was assessed.

Pvadc

As shown in Fig. 2, at 6 h in Pinto Villa cultivar, the *Pvadc* transcript was notably induced by effect of all the treatments in respect to the control condition, being the combination of 400 mM NaCl/4°C which prompted the maximum expression. Our data showed a time- and NaCl- dependent regulation of the *Pvadc* in this cultivar. At 12 h, the *Pvadc* transcript showed a tendency to be maintained or repressed respect to the control (distilled water), with the exception of 4 °C and 4 °C/0.1 mM ABA treatments. Similar results were observed in Canario 60 cultivar, at 6 h most of the treatments induced an up regulation of the *Pvadc*, being enhanced with 400 mM NaCl/4 °C, whereas 400 mM NaCl/0.1 mM ABA treatment showed a repression. On the contrary, at 12 h only 4 °C/0.1 mM ABA favored the *Pvadc* accumulation and the rest of the treatments repressed or maintained the gene expression.

Pvsamdc1* and *Pvsamdc2

In the case of the S-adenosylmethionine decarboxylase genes, it was observed a differential expression between the two cultivars during both periods (**Fig. 2**). In the Pinto Villa cultivar at 6 h, while the *Pvsamdc1* expression suffered no alterations, except for the 400 mM NaCl/0.1 mM ABA treatment, the *Pvsamdc2* transcript was up-regulated in all treatments. A tendency to increase in both transcripts was detected at 12 h in this same cultivar, where the *Pvsamdc1* reached the higher expression level at 400 mM NaCl/0.1 mM ABA.

In Canario 60 cultivar at 6 h, the highest accumulation of the *Pvsamdc1* transcript was in 75 mM NaCl, followed by 4 °C, and 400 mM NaCl/ABA treatments; on the other hand the *Pvsamdc2* gene was induced by 400 mM NaCl and NaCl/ABA. At 12 h in this sensitive cultivar, the *Pvsamdc1* gene showed a down regulated pattern of expression in the 400 mM NaCl, 4 °C, 4 °C/ABA and 400 mM NaCl/4 °C/ABA of analyzed samples. In the *Pvsamdc2* there was not observed significant effect by salt stress, only at 400 mM; the double combinations of treatments were which caused the more notable effect, mainly the 4 °C/ABA, respect to control.

Pvspds

We also measured the expression of the *spds* gene, responsible for Spd biosynthesis. We observed in Pinto Villa cultivar that transcript levels were up-regulated at 400 mM NaCl/0.1 mM ABA at both 6 and 12 h of stress (**Fig. 2**); additionally at 12 h, *Pvspds* gene showed a pronounced up-regulation under 400 mM NaCl and 4 °C/400 mM NaCl treatments. As loading control, the bean actin gene was used. In the Canario 60 cultivar, salt treatment (75, 200 and 400 mM) was the main inductor of the *Pvspds* accumulation at 6 h, as well as by the combination of the three treatments NaCl/ABA/4 °C. On the other hand, at 12 h the transcript was induced by NaCl/ABA, while the chilling stress totally repressed its expression.

DISCUSSION

Environmental stresses such as salinity and low temperature are important factors which limit plant distribution and productivity. PAs are involved in a wide range of physiological processes in plants (Kaur-Sawhney *et al.*, 2003), but the greater changes in their metabolism happens in response to several stress conditions (Bouchereau *et al.*, 1999). During the last decade, special attention has been given to the regulation of plant PA biosynthesis under stress and many genes involved in their biosynthesis have been cloned (Kakkar and Sawhney, 2002; Rodriguez-Kessler *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007). Several genes involved in polyamine biosynthesis are strongly induced by abiotic stress and also inducible by ABA (Urano *et al.*, 2003).

Effect of Exogenous Polyamines

Our results suggest that PA biosynthetic genes in Pinto Villa respond more actively to PA application than the sensitive cultivar Canario 60. Exogenous application of PAs have shown to protect plant tissues from the detrimental effect of several types of stresses, such as salinity (Sun *et al.*, 2002), copper-induced oxidative (Groppa *et al.*, 2001), and atrazine (Zheleva *et al.*, 1994) stresses. It has been proposed that PAs act as free radical scavengers (Drolet *et al.*, 1986), as cations that balance pH (Preibe and Jager, 1978), stabilize membranes via ionic interactions (Ballas *et al.*, 1993) and that restore tonoplast integrity and thus enhance plant performance under environmental stresses (Zhao and Qin, 2004).

Some studies have noted that PAs absorbed by plant tissues could be transported over long distances (Pistocchi *et al.*, 1988) and it is interesting that stress factors, such as potassium deficiency, acidic pH and salinity enhanced PAs inter-organ transport (Friedman *et al.*, 1989).

Effect of ABA treatment

Our data demonstrated that, in the tolerant cultivar, all PA biosynthetic genes are ABA responsive, and regulated in a concentration-and time-dependent

way. ABA has long been known to be a mediator in triggering plant responses and induces the expression of multiple defense genes against the effect of various environmental stresses (Chandler and Robertson, 1994; Zhao *et al.*, 1995; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997). The main enzymes of PA biosynthesis are under a complex metabolic and developmental control and affected by stresses; such a control is a necessary condition for the efficient regulation of cell metabolism. Alcázar *et al.*, (2006) shown that dehydration-inducible expression of *adc2*, *spds1* and *spms* is an ABA-dependent response, since up-regulation is not observed in ABA deficient (*aba2*) and insensitive (*abi1*) mutants.

Previous studies in maize have revealed that the endogenous accumulation of ABA provoked by salt stress acts as a signal for PA accumulation under stress (Liu *et al.*, 2005).

In this sense, ABA modulates PAs metabolism at the transcriptional and metabolite level in response to water stress in *Arabidopsis* (Alcázar *et al.*, 2006). In such study also were found stress- (DRE, LTR) and ABA-responsive elements (ABRE and/or ABRE-related motifs) present in the promoters of the PAs biosynthetic genes. However, no data revealing a connection between ABA and the transcriptional regulation of bean PA biosynthetic genes exists. Our data suggest that in both cultivars, Pinto Villa and Canario 60, but noticeably in the tolerant, ABA modulates PAs metabolism at the transcriptional level. We suggest that the *Pvadc*, *Pvsamdc*'s and *Pvspds* genes in Pinto Villa might contain ABA-responsive elements in their promoters like was observed in *Arabidopsis* (Alcázar *et al.*, 2006).

Effect of salt, cold and ABA treatments on the PAs biosynthetic genes expression

In recent years, a protective role against stress has been attributed to PAs, during mineral nutrient deficiency, and osmotic, salt, drought, heat, chilling and oxidative stress (Bouchereau *et al.* 1999; Capell *et al.*, 2004; Kasukabe *et al.*, 2004; Perez-Amador *et al.*, 2002). Because of their polycationic nature at a

physiological pH, PAs can bind strongly to the negative charges in cellular components such as nucleic acids, proteins, and phospholipids (Smith, 1985) and stabilize them under the stress.

Arginine decarboxylase

Our results showed that for the Pinto Villa cultivar, at 6 h, the *Pvadc* transcript was up regulated by all treatments respect to the control while at the longer time, 12 h, it was maintained or repressed. Similar results were observed in the sensitive cultivar Canario 60.

In mustard, *adc* transcripts are up-regulated in response to some stresses such as chilling, salt, and mannitol (Mo and Pua, 2002). More recently, Urano *et al.* (2004) used a *Ds* insertion mutant of the *Atadc2* gene (*adc2-1*) to prove that the *Arabidopsis adc* gene (*Atadc2*) plays an important role in salt tolerance. In apple, the expression levels of *Mdadc* were positively or negatively induced by environmental stresses, including extreme temperatures, high salinity, and dehydration, so *Mdadc* might also be involved in the response to stress in addition to cell growth (Hao *et al.*, 2005). Northern blot analysis revealed increased *OsADC1* mRNA levels in rice seedling leaves subjected to chilling stress. Interestingly, this treatment induced a concomitant increase in free Put levels in these samples, coincident with the observed elevated *OsADC1* mRNA levels (Akiyama and Jin, 2007). These findings demonstrated that *adc* genes play important roles in plant responses to stress in the environment.

S-adenosylmethionine decarboxylase

The *samdc*'s genes were differentially regulated in the tolerant Pinto Villa at 6 h, while the *Pvsamdc2* was induced by all treatments; the expression of *Pvsamdc1* was constant. On the other hand, at 12 h all treatments induced both transcripts. In the Canario 60 cultivar at 6 h the *Pvsamdc1* was accumulated in almost all the treatments excepting the combinations of NaCl/4°C and 4°C/ABA whereas the *Pvsamdc2* did not changed significantly excepting the higher NaCl treatment as well as NaCl/ABA. At the longer period, the *Pvsamdc1* was mostly

repressed or maintained, otherwise to the *Pvsamdc2* which was up regulated by almost all treatments.

In rice, a Northern assay showed that the *samdc1* transcript was differentially accumulated in response to salinity, drought and exogenous ABA; furthermore, comparison between levels of the *samdc1* of a salt-tolerant and a salt-sensitive japonica cultivars revealed an earlier induction of the *samdc1* transcript in the tolerant when both were affected by salinity (Li and Chen, 2000). The *samdc2* has also been observed to be induced in the tolerant rice Pokkali cultivar after 3 h of salt stress (Kawasaki *et al.*, 2001). Regulation of the *samdc* gene by cold stress have also been studied, Pillai and Akiyama (2004) reported that a cold-tolerant rice (*Oryza sativa*) cultivar exposed to cold stress showed increased *samdc* expression up to 72 h. Cold-induced gene expression also has been observed in mustard plants showed the up-regulated levels of *Bjsamdc2* transcript and enzyme activity in leaves after cold treatment (Hu *et al.*, 2005). This evidence suggests that *samdc* genes might be differentially regulated between its isoforms as well as between the plants studied.

Spermidine synthase

In the Pinto Villa cultivar at 6 h the highest accumulation of the *Pvspds* was induced by NaCl/ABA while at 12 h, the transcript was up regulated by all the treatments containing NaCl. The sensitive, Canario 60, presented an overexpression 6 h with the NaCl treatments, followed by the NaCl/ABA/4°C. At 12 h, only the lower NaCl solutions as well as the NaCl/4°C induced the transcript but in a minimal way compared to the NaCl/ABA which induced the main effect.

The overexpression of *Cucurbita ficifolia* SPDS in *A. thaliana* enhanced the tolerance of plants to various types of environmental stresses, such chilling and salt stress, suggesting a possible role of Spd as regulator in stress signaling pathways (Kasukube *et al.*, 2004). Differential expression of *Zmspds2* gene has also been reported in maize under salt stress (Rodriguez-Kessler *et al.*, 2006). Rice seedlings grown at 25 °C were subjected to chilling stress at 12 °C, induction of OsSPDS2 gene was detected in roots after 1 day of stress and steadily

increasing until day 10. When seedlings were returned to 25 °C, the transcript rapidly decreased (Imai *et al.*, 2004).

The function of PAs during salt stress seems complicated by the fact that, depending on growth conditions and on short or long-term exposure, PAs contents increase or decrease during salt stress. In fact, Kasinathan and Wingler (2004) analyzed PAs content and salt stress tolerance in two *A. thaliana* mutants, *spe1-1* and *spe2-1* with reduced ADC activity, demonstrating that PA accumulation depends on acclimation to salinity and that low PAs formation leads to reduced salt tolerance. Moreover, exogenous applications of Put and Spd were used to overcome some harmful effects of salinity on rice seedlings (Chattopadhyay *et al.*, 2002; Prakash and Prathapasenan, 1988; Roy *et al.*, 2005). With respect to salt stress and PAs, many reports have suggested that exogenous application of PAs can improve the performance of plants of varying species and salt sensitivities under saline environments (Mansour and Al-Mutawa, 1999; Ali, 2000; Ndayiragije and Lutts, 2006).

On the other hand, respect to chilling, damage might be prevented by PAs accumulation, and also if PAs levels were high prior to chilling exposure and remain high during the whole stress treatment (Gropa and Benavides, 2007). It has been found that chilling-tolerant plants increase endogenous PA levels under chilling stress to a much greater extent than chilling-sensitive ones (Kramer and Wang, 1989, 1990; Lee, 1997). These findings suggest the involvement of PAs in chilling tolerance of plants (Bouchereau *et al.*, 1999). However, the mode of PA functions in enhancing the chilling tolerance of plants is not known. All of these results seem to indicate that polyamines are an important component in a plant's response to stress and that they play a significant role in counteracting stress.

It remains unclear why the genes in the PA biosynthetic gene family responded differentially to stress. Alcázar *et al.* (2006) noted that, in most cases, increases in gene expression during stress treatment do not correlate with accumulation of all PAs. An accumulation of Put has been detected in response to different kinds of abiotic stress in parallel to *adc2* or *adc1* up-regulation. However,

the Put accumulation and induction of genes involved in Spd and Spm biosynthesis (*samdc2*, *spds1*, *spms*) do not affect the content of both PAs. This could be due to the translational or posttranslational regulation of SAM decarboxylase, a key enzyme in polyamine biosynthesis. There are several reports where it was observed an inconsistency among the transcriptional regulation of the PAs biosynthetic genes and the accumulation of these (Alcázar *et al.*, 2006; Hummel *et al.*, 2004; Liu y Moriguchi, 2007) it might be explained by the presence of other genes in the genome, or a translational and/or posttranslational regulation, conjugation and/or oxidation.

REFERENCES

- Akiyama T, Jin S** (2007) Molecular cloning and characterization of an *arginine decarboxylase* gene up-regulated by chilling stress in rice seedlings. *Journal of Plant Physiology* **164**, 645–654
- Alcázar R, Cuevas JC, Patron M, Altabella T, Tiburcio AF** (2006) Abscisic acid modulates polyamine metabolism under water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **128**, 448-455
- Alcázar R, Marco F, Cuevas JC, Patron M, Ferrando A, Carrasco P, Tiburcio AF, Altabella T** (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters* **28**, 1867-1876
- Ali RM** (2000) Role of putrescine in salt tolerance of *Atropa belladonna* plant. *Plant Science* **152**, 173-179
- Ballas SK, Mohandas N, Marton LJ, Shohet SB** (1993) Stabilization of erythrocyte membranes by polyamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80**, 1942-1946
- Bors W, Langebartels C, Michel C, Sandermann, H** (1989) Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochemistry* **28**, 1589-1595
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J** (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* **140**, 103-125
- Capell T, Bassie L, Christou P** (2004) Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 9909-9914
- Chandler PM, Robertson M** (1994) Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**, 113-141
- Chattopadhyay MK, Tiwari BS, Chattopadhyay G, Bose A, Sengupta DN, Ghosh B** (2002) Protective role of exogenous polyamines on salinity-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* **116**, 192-199

- Drolet G, Dumbroff EB, Legge RL, Thompson JE** (1986) Radical scavenging of polyamines. *Phytochemistry* **25**, 367-371
- Friedman R, Altman A, Levin N** (1989) The effect of salt stress on polyamine biosynthesis and content in mung bean plants and halophytes. *Physiology Plantarum* **76**, 295–302
- Groppa MD, Benavides MP** (2007) Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* **34**, 35-45
- Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP** (2001) Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Science* **161**, 481-488
- 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. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1105-1115
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ** (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 463-499
- Hetherington AM, Quatrano RS** (1991) Mechanisms of action of abscisic acid at the cellular level. *New Phytologist* **119**, 9-32
- Hoagland DR, Arnon DI** (1950) The water culture method of growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* **347**, 1-32
- Hu W, Gong H, Pua EC** (2005) The pivotal roles of the plant S-adenosylmethionine decarboxylase 5'untranslated leader sequence in regulation of gene expression at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Plant Physiology* **138**, 276-286
- Imai R, Ali A, Pramanik MdHR, 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
- Kakkar RK, Sawhney VK** (2002) Polyamine research in plants - a changing perspective. *Physiologia Plantarum* **116**, 281-292

- Kasinathan V, Wingler, A** (2004) Effect of reduced arginine decarboxylase activity on salt tolerance and on polyamine formation during salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **121**, 101-107
- 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 and Cell Physiology* **45**, 712-722
- Kaur-Sawhney R, Tiburcio AF, Altabella T, Galston AW** (2003) Polyamines in plants: an overview. *Journal of Cell and Molecular Biology* **2**, 1-12
- Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, Bohnert HJ** (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* **13**, 889-905
- Kramer GF, Wang CY** (1989) Correlation of reduced chilling injury with increased spermine and spermidine levels in zucchini squash. *Physiologia Plantarum* **76**, 479-484
- Kramer GF, Wang CY** (1990) Effects of chilling and temperature preconditioning on the activity of polyamine biosynthetic enzymes in zucchini. *Journal of Plant Physiology* **136**, 115-119
- Lee TM** (1997) Polyamine regulation of growth and chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) roots cultured in vitro. *Plant Science (Limerick)* **122**, 111-117
- Legocka J., Zaichert J** (1999) Role of Spermidine in the Stabilization of apoprotein of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex of photosystem II during leaf senescence process. *Acta Physiologiae Plantarum* **21**, 127-137
- Li ZY, Chen SY** (2000) Differential accumulation of the S-adenosylmethionine decarboxylase transcript in rice seedlings in response to salt and drought stresses. *Theoretical and Applied Genetics* **100**, 782-788
- Liu J, Jiang MY, Zhou YF, Liu YL** (2005) Production of polyamines is enhanced by endogenous abscisic acid in maize seedlings subjected to salt stress. *Journal of Integrative Plant Biology (Formerly Acta Botanica Sinica)* **47**, 1326-1334

- Liu JH, Moriguchi T** (2007) Changes in free polyamines and gene expression during peach flower development. *Biologia Plantarum* **51**, 530-532
- Mansour MMF, Al-Mutawa MM** (1999) Stabilization of plasma membrane by polyamines against salt stress. *Cytobios* **100**, 7-17
- Mo H, Pua EC** (2002) Up-regulation of arginine decarboxylase gene expression and accumulation of polyamines in mustard (*Brassica juncea*) in response to stress. *Physiologia Plantarum* **114**, 439–449
- Ndayiragije A, Lutts S** (2006) Exogenous Putrescine Reduces Sodium and Chloride Accumulation in NaCl-Treated Calli of the Salt-Sensitive Rice Cultivar I Kong Pao. *Plant Growth Regulation* **48**, 51-63
- 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 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
- Pistocchi R, Keller F, Bagni N, Matile P** (1988) Transport and subcellular localization of polyamines in carrot protoplasts and vacuoles. *Plant Physiology* **87**, 514-518
- Prakash L, Prathapasanan G** (1988) Putrescine reduces NaCl-induced inhibition of germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Australian Journal of Plant Physiology* **15**:761–767
- Preibe A, Jager HJ** (1978) Effect of NaCl on the level of putrescine and related polyamines in plants differing salt tolerance. *Plant Science Letters* **12**, 365-369
- Rodriguez-Kessler M, Alpuche-Solís A, Ruiz O, Jiménez-Bremont J** (2006) Effect of salt stress on the regulation of maize (*Zea mays* L.) genes involved in polyamine biosynthesis. - *Plant Growth Regulation* **48**, 175-185
- Rosales-Serna R, Kohashi-Shibata J, Acosta-Gallegos JA, Trejo-Lopez C, Ortiz-Cereceres J, Kelly JD** (2004) Biomass distribution, maturity acceleration

- and yield in drought stressed common bean cultivars. *Field Crops Research* **85**, 203-211
- Roy P, Niyogi K, SenGupta DN, Ghosh B** (2005) Spermidine treatment to rice seedlings recovers salinity stress-induced damage of plasma membrane and PM-bound H⁺-ATPase in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *Plant Science* **168**, 583-591
- Roy M, Wu R** (2002) Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. *Plant Science* **163**, 987–992
- Shevyakova NI, Shorina MV, Rakitin VYu, Stetsenko LA, Kuznetsov VIV** (2004) Ethylene-induced production of cadaverine is mediated by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Doklady Biological Sciences* **395**, 127-129
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki Y** (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology* **115**, 327-334
- Slocum RD, Flores HE, eds.** (1991) *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. CRC Press, Boca Ratón, FL
- Smith TA** (1985) Polyamines. *Annual Review of Plant Physiology* **36**, 117-143
- Sun C, Liu YL, Zhang WH** (2002) Mechanism of the effect of polyamines on the activity of tonoplast of barley roots under salt stress. *Acta Botanica Sinica* **44**, 1167-1172
- Tiburcio AF, Altabella T, Borrell A, Masgraw C** (1997) Polyamine metabolism and its regulation. *Physiologia Plantarum* **100**, 664-674
- Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T, Igarashi Y, Seki M, Sekiguchi F, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2003) Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant Cell Environment* **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. *Biochemical and Biophysical Research communications* **313**, 369-375

- Waie B, Rajam MV** (2003) Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine gene. *Plant Science* 164, 727–734
- Wi SJ, Kim WT, Park KY** (2006) Overexpression of carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene generates a broadspectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Reports* 25, 1111–1121
- Zhao KF, Fan H, Harris PJC** (1995) Effect of exogenous ABA on the salt tolerance of corn seedlings under salt stress. *Acta Botanica Sinica* 37, 295-300
- Zhao FG, Qin P** (2004) Protective effect of exogenous polyamines on root tonoplast function against salt stress in barley seedlings. *Plant Growth Regulation* 42, 97-103
- Zheleva D, Tsonev T, Sergive I, Karanov E** (1994) Protective effect of exogenous polyamines against atrazine in pea plants. *Journal of Plant Growth Regulation* 13, 203-211
- Zeevaart JAD, Creelman RA** (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39, 439-473

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Expression analysis of *Pvadc*, *Pvsamdc1*, *Pvsamdc2* and *Pvspds* in two bean cultivars Pinto Villa and Canario 60 subjected to exogenous application of ABA and PAs. Leaves from 15 d old plants were detached and subjected to 6 and 12 h to the next treatments: Distilled water (C), 10 μ M Put, 10 μ M Spd, 10 μ M Spm, 100 and 200 μ M ABA. Experiments were carried on in a bioclimatic camera, 12/12 h photoperiod at 25 °C \pm 2 °C. Actin was used as loading control. Amplification was performed in duplicate, with a different number of cycles to ensure a linear response in the PCR reaction, and we present one of such assay at 25 cycles.

Fig. 2 Expression analysis of *Pvadc*, *Pvsamdc1*, *Pvsamdc2* and *Pvspds* in two bean cultivars Pinto Villa and Canario 60 under several stress treatments. Leaves from 15 d old plants were detached and subjected during 6 and 12 h to 75, 200 and 400 mM NaCl, 4 °C (cold), 400 mM NaCl + 4 °C, 400 mM NaCl + 0.1 mM ABA, 4 °C + 0.1 mM ABA, 400 mM NaCl + 0.1 mM ABA + 4 °C and distilled water was used as control. Plants were kept in a bioclimatic camera, 12/12 h photoperiod at 25 °C \pm 2 °C. Actin was used as loading control. Amplification was performed in duplicate, with a different number of cycles to ensure a linear response in the PCR reaction, and we present one of such assay at 25 cycles.

FIGURES

Figure 1

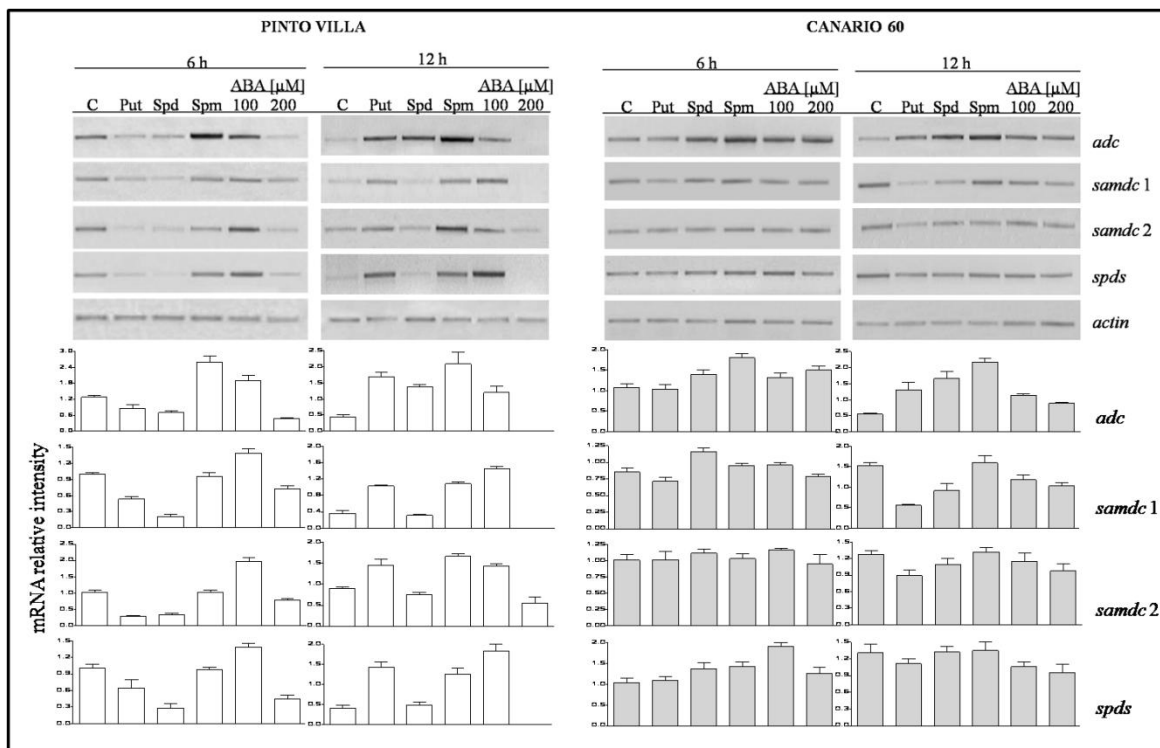
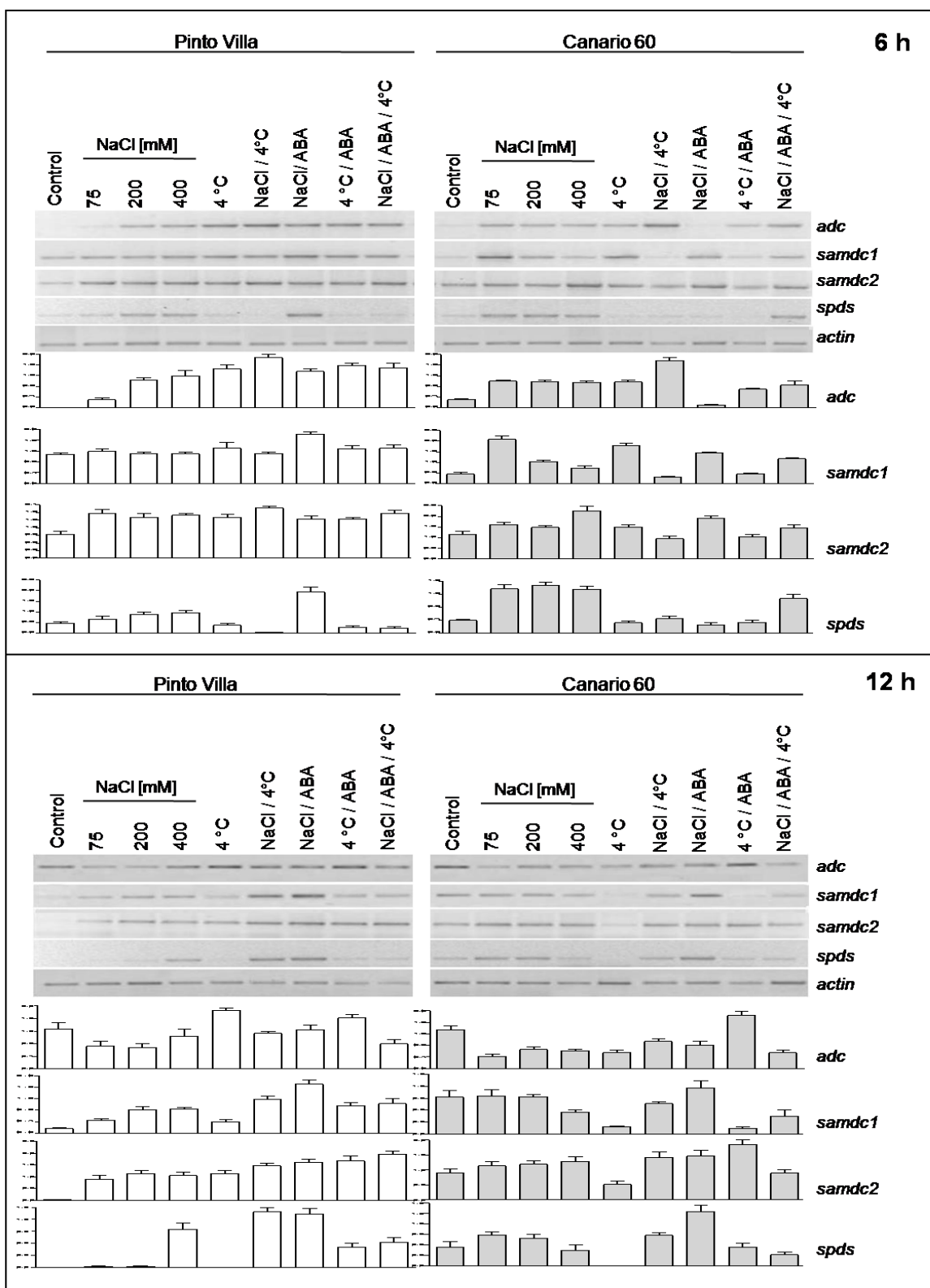


Figure 2



6.4 Aislamiento e identificación de genes inducidos por estrés salino.

En este último capítulo se describe la construcción de una genoteca sustractiva en la variedad tolerante de frijol, Pinto Villa, bajo estrés salino con la finalidad de aislar e identificar los genes inducidos durante esta condición.

La genoteca sustractiva de cDNA se llevó a cabo en hojas de la variedad tolerante, extraídas de plantas de 30 días de edad sometidas a 200 mM de NaCl por 2 y 5 días en condiciones de invernadero. Se seleccionaron estos dos periodos de tiempo con el objetivo de encontrar genes que se expresaran de manera temprana como a largo plazo durante el periodo de agobio. Una vez sintetizado el cDNA mediante la tecnología Super SMART, se procedió con la genoteca utilizando el sistema PCR- Select™ cDNA.

De esta manera se aislaron 71 unigenes potencialmente inducidos bajo esta condición que posteriormente fueron identificados mediante el programa Blastx proporcionado por el sitio NCBI (<http://www.ncbi.org>). Se seleccionaron 8 genes para confirmar su expresión diferencial mediante RT-PCR. Finalmente fueron seleccionados cinco genes para ser estudiados en mutantes T-DNA de *Arabidopsis thaliana*, y una vez que se confirmó la homocigosis de las semillas mutantes tanto por PCR como por RT-PCR, tres de ellos resultaron totalmente silenciados, por lo tanto estos genes fueron seleccionados para los ensayos de fenotipo bajo condiciones de salinidad.

Los genes identificados fueron clasificados en 8 categorías funcionales: genes relacionados a estrés (41 %), mantenimiento celular y desarrollo (22 %), transporte (10 %), fotosíntesis y cloroplasto (7 %), factores transcripcionales (6 %), señalización (4 %), fotorespiración (4 %) y otros (6 %). Se analizó la expresión mediante RT-PCR, de ocho de los genes identificados, el factor transcripcional ATHB-12, la proteína DNAJ, una LEA-18, la subunidad E de una ATPasa vacuolar, la dehidrina, la metalotioneina tipo 2, la S-adenosilmetionina sintasa y por último la

acuaporina, en ambas variedades de frijol, la tolerante Pinto Villa y la sensible Canario 60 y así confirmamos su expresión diferencial.

Con el propósito de realizar una caracterización funcional de algunos de estos genes identificados en la genoteca sustractiva de frijol bajo estrés salino, se adquirieron líneas mutantes insercionales de cinco ortólogos de estos genes en *Arabidopsis thaliana*: ATJ3 (homólogo de DNAJ), MTN3 de función desconocida, una proteína con un motivo rico en glicina (GRMP), una ribonucleoproteína de cloroplasto de 31 KDa y un transportador de oligopéptidos dependiente de protones (POT) para realizar estudios de pérdida de función. Se obtuvieron plantas homocigotas knock-out para las líneas mutantes en los genes ATJ3, MTN3 y GRMP, las cuales fueron sometidas a diversas condiciones de estrés como hídrico, salino y osmótico. Se observó un fenotipo de sensibilidad en estrés salino en la planta mutante para GRMP, con lo que se puede inferir que este gen es importante en *Arabidopsis* para brindarle tolerancia a sal.

Isolation and identification of induced genes in a tolerant bean cultivar under salt stress

Eloísa Hernández-Lucero and Juan Francisco Jiménez-Bremont *

Laboratorio de Estudios Moleculares de Respuesta a Estrés en Plantas, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica AC, Camino a la Presa de San José 2055, C.P. 78216, AP 3-74 Tangamanga, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México

*Corresponding author: Juan Francisco Jiménez Bremont, Ph. D.

Tel. (+52) 444 8342000 ext. 2080

Fax (+52) 444 8 342010

Email: jbremont@ipicyt.edu.mx

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, salt stress, suppressive subtractive hybridization, tolerant cultivar, water potential, Salk mutants

Abbreviations: **ATJ3**, DNAJ Homolog; **GRP**, Glycine rich protein; **POT**, Proton dependent oligopeptide transporter; **SSH**, Suppression subtractive hybridization.

Running title

Genes induced by salt stress in bean. Hernández-Lucero and Jiménez-Bremont.

ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important legume for direct human consumption on a worldwide basis. Salt stress negatively influences survival, biomass production and grain yield of most crops. In order to identify genes induced during the salt stress response in tolerant bean cultivar (Pinto Villa), suppression subtractive hybridization (SSH) was performed. The cDNA was prepared from leaves of bean plants at 200 mM NaCl for 2 and 5 days as tester and cDNA from non-salt treated bean plants as driver. After hybridizing and cloning, forward subtraction cDNA library was obtained, and 71 unigenes were generated from 380 randomly picked clones. These 71 unigenes were classified in eight categories according to their putative function assigned by the Gene Ontology program. RT-PCR analysis using the tolerant cultivar (Pinto Villa) and sensitive cultivar (Canario 60) at 200 mM NaCl for 2 and 5 days was performed. These results showed the differential expressions of these transcripts between cultivars. Five of the isolated genes were studied in *Arabidopsis* T-DNA mutants in order to know their putative participation in the response of the plant to stress.

INTRODUCTION

Globally, the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important food legume for nearly 300 million people, which mostly live in developing countries, because this is a food crop for inexpensive low-income consumers. Bean is regarded as the second largest source of protein in eastern and southern Africa and fourth in tropical America (SDR, 2007). Bean, in addition to its nutritional importance, is of great economical importance as it generates income for millions of small farmers. Unfortunately, agriculture has been threatened at high level by diverse abiotic stresses. It has been estimated that the abiotic stress causes the most significant losses of crops than any other factor, reducing its yield potential by more than 50 % (Wang et al., 2007). It has also been speculated that such yield reduction will worsen because of the dramatic climate changes expected in the future (Lane and Jarvis, 2007). Abiotic stress negatively influences survival, biomass production and accumulation, and grain yield of most crops (Khush and Baenziger, 1998).

Salinity is one of the most severe abiotic stresses affecting production of the legumes worldwide (Bayuelo-Jiménez et al., 2002; Wang et al., 2003). The United Nations Environment Program estimates that approximately 20% of agricultural land and 50% of cropland in the world is salt-stressed (Flowers and Yeo, 1995). Salt stress can damage or reduce all functions of the plant (Greenway and Munns, 1980) and also interferes with water absorption and enhances accumulation of Na^+ , which will lead to imbalance of mineral elements and disturbance of cellular biochemical reactions. As a consequence of salt stress, the cellular metabolism, physiological, biochemical as well as photosynthetic activities are all adversely affected (Chen et al., 2007). The detrimental effects of high concentrations of salt on plants can be observed at the whole-plant level as the death of plants and/or decreases in productivity (Bohnert et al., 1995; Dash and Panda, 2001; Sairam and Tyagi, 2004). Accumulation of excess Na^+ may cause metabolic disturbances in processes where low Na^+ and high K^+ or Ca^{2+} are required for optimum function

(Marschner, 1995). A decrease in nitrate reductase activity, inhibition of photosystem II (Orcutt and Nilsen, 2000), and chlorophyll breakdown (Krishnamurthy et al., 1987) are all associated with increased Na^+ concentrations.

Plant salt tolerance is a complex feature controlled by multiple genes and regulated by different types of proteins (Bohnert and Jensen, 1996), which is the reason why the development of salt tolerant cultivars will contribute to reducing the deleterious effect of soil salinity on crop production. Molecular and genomic studies have shown that many genes with various functions are induced by high-salinity stresses, and that the various signaling factors are involved in the stress responses. Considerable attention has been directed toward elucidating the molecular basis of plant salt tolerance during recent years and numerous salt tolerance-related genes have been identified. Induced genes are good candidates to be involved in osmotolerant responses in plants. Tolerance mechanisms can be categorized as those that function to minimize osmotic stress or ion disequilibrium or alleviate the consequent secondary effects caused by these stresses (Yokoi et al., 2002).

Accumulation of compatible solutes is a process activated in response to osmotic stress. A major category of organic osmotic solutes consists of simple sugars, sugar alcohols and complex sugars (Bohnert and Jensen, 1996). Others include quaternary amino acid derivatives and sulfonium compounds (Nuccio et al., 1999). Furthermore, many of the osmoprotectants enhance stress tolerance of plants when expressed as transgene products (Bohnert and Jensen, 1996; Zhu, 2001). An adaptive biochemical function of osmoprotectants is the scavenging of reactive oxygen species (Bohnert and Jensen, 1996).

The ion disequilibrium induced by the salt stress, increases the activity of ion transport systems that mediate Na^+ homeostasis. H^+ pumps like the P-type ATPases or V-type ATPases, in the plasma membrane and tonoplast, provide the driving force (H^+ electrochemical potential) for secondary active transport and

function to establish membrane potential gradients to facilitate electrophoretic ion flux (Maeshima, 2000, 2001; Morsomme and Boutry, 2000; Ratajczak, 2000).

Some of the induced genes during stress include those coding regulatory proteins, that is, proteins factors involved in further regulation of signal transduction and gene expression that probably function in the stress response (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Seki et al., 2002, 2003), such as various transcription factors, which are sequence-specific DNA-binding proteins that are capable of activating and/or repressing transcription, enzymes involved in phospholipid metabolism, F-box proteins. Molecular and genetic studies have shown that various signal transduction systems function in abiotic stress responses, involving protein phosphorylation and/or dephosphorylation, phospholipid signaling, calcium signaling, protein degradation (Bartels and Sunkar, 2005; Boudsocq and Lauriere, 2005; Mahajan and Tuteja, 2005; Vinocur and Altman, 2005).

Hence, the induction of gene expression by environmental stress must be exploited to unravel mechanisms dealing with abiotic stress tolerance in the agriculturally important grain legumes. Understanding the pattern of activation of gene expression during environmental stress will lead to improved knowledge of the interrelationships of the multiple signalling systems that control stress-adaptive responses in legumes. Suppression subtractive hybridization (SSH), which is first reported by Diatchenko et al. in 1996, is a highly effective method widely used in the study of differential gene expression.

In the present study we imposed salt stress by NaCl treatment to 30-d old bean plants cv. Pinto Villa and isolated the genes induced by salinity at short and long time stress periods with the purpose of to identify the genes activated in the first stage of the salt stress and those induced later.

MATERIAL AND METHODS

Plant growth and stress treatments

Seeds of bean (*Phaseolus vulgaris*) from the cultivar 'Pinto Villa', were sterilized with 50% of commercial sodium hypochlorite during 10 min, rinsed three times with distilled water, and then germinated in Petri dishes for 3 d in the dark. Germinated seeds were sown in pots containing a substrate of sand and perlite (2:1), sub-irrigated with the nutrient solution Hoagland (Hoagland and Arnon, 1950) which was changed every 2 d, and grown 30 d in greenhouse conditions. After the 30 d, plants were subjected to salt stress with NaCl 200 mM during five days and the leaf water potential was measured daily as a reference of the stress condition of the plant. At the second and fifth day of the treatment, leaves, stems and roots were cut off, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until use. The procedure was the same for the control but without the NaCl.

RNA isolation and double strand cDNA synthesis

Total RNA was isolated from the 200 mM NaCl-treated as well as the nontreated bean plants, with the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Quality and concentration of RNA were checked on denaturing agarose gel and by absorbance measurements at 260 and 280 nm on a UV spectrophotometer. Double strand cDNA was synthesized by the Super SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Palo Alto CA) according to the manufacturer instructions.

Suppressive subtractive hybridization (SSH)

The SSH was performed using the PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech, Palo Alto CA) as instructed by the manufacturer. Two populations of cDNA were synthesized. A "tester" cDNA corresponding to 2 µg of mRNA was prepared from the leaves of the stressed plants after salt treatment. A "driver" cDNA was prepared from 2 µg of mRNA isolated from leaves of the unstressed plants. Both of the cDNA populations were digested with *Rsa* I, a 4-base-cutting restriction enzyme that yields blunt ends. The tester cDNA then was subdivided

into 2 portions, and each was ligated with a different cDNA adaptor. Two rounds of hybridizations were performed; in the first round, an excess of driver was added to each sample of tester, leading to the enrichment of differentially expressed sequences. During the second round of hybridization, the 2 primary hybridization samples were mixed together to form new double-stranded hybrids with different ends. Fresh denatured driver cDNA was added again to further enrich differentially expressed sequences. After filling in the ends by DNA polymerase, 2 rounds of PCR amplification were performed using the primers for the different adaptors. The number of cycles of primary PCR was increased to 30, and the number of cycles of secondary PCR was increased to 15. All PCR products were subcloned into the pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad CA) and transformed into *E. coli* Select96™ (Promega) to construct the subtracted library.

Sequencing and bioinformatic analysis of cDNA clones

Plasmids containing the cDNA clones were extracted and partially sequenced with ABI PRISM 377 DNA automated sequencer (Perkin Elmer). Each sequence was screened for overall base quality and contaminating vector was removed. All the sequences were analyzed with the SeqmanII DNASTAR program in order to obtain the number of EST's, contigs and unigenes. The homology of the unigenes were analyzed with the Blast program (Blastx) provided by the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website (<http://www.ncbi.org>). The 71 unigenes were also classified in 8 functional categories by the Gene Ontology software.

RT-PCR

For validation of the up regulation, we assay RT-PCR analyses of 8 genes. Total RNA from the same Pinto Villa NaCl treated samples used for the SSH construction, as well as RNA from the Canario 60 cultivar treated at the same time that the tolerant one were used for RT-PCR assays. First strand cDNA synthesis was performed with SuperScript™ First Strand Synthesis System for reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR; Invitrogen, Carlsbad CA) as indicated by the manufacturer.

Confirmation of homozygous of *Arabidopsis thaliana* mutant plants

Five mutant lines of *Arabidopsis thaliana* were used for analyze the putative role of five genes selected from the SSH constructed from bean under salt stress. The genes and their respective mutant lines were: the ATJ3 (a DNAJ homologue; Salk_132923), the MTN3 of unknown function (Salk_077789), a glycine rich protein (GRP; Sail_387_D04), a 31 KDa chloroplast ribonucleoprotein (Salk_051237) and a proton dependent oligopeptide transporter (POT; Salk_044047). The mutant seeds of each line were sown in GM medium and subjected to 4°C for two days in the dark. Then, plates were grown for three weeks in a camera at $20 \pm 2^\circ\text{C}$, with a photoperiod of 16/8 h and light intensity of 6000 lux. Plants were used for genomic DNA and RNA purification, and for RT-PCR assays to confirm homocigosis. Genomic DNA was used for PCR amplification using the primers: Salk_132923 5, 5' CTTGAAGGTATCTCTTGAGGATGTGTACC 3' and Salk_132923 3, 5' GACGATGCATCTGAATACGTACCAGG 3' for ATJ3; Salk_077789 5, 5' GTCTTGCTCTTAAGGATATCTATGTTGCCG 3' and Salk_077789 3, 5' CTACAACGAACTAGTACACGTGGACAATG 3' for MTN3; Sail_387_D04 5, 5' CCGACTTACGATATTGATCTTATCTGGCAC 3' and Sail_387_D04 3, 5' CCAGAAAGTGCCATCATACTCTGCC 3' for the Glycine rich protein; Salk_051237 5, 5' AGGTGGTGGGAAGTGTGTGTGATTTAAC 3' and Salk_051237 3, 5' ACTATCAACATCGTACGGCAAGTTTCCG 3' for the 31 KDa chloroplast ribonucleoprotein and finally Salk-044047 5, 5' AGGAAGGCCATACGTCCGTGC 3' and Salk_044047 3, 5' GGTAACGACCGAGAAATGCGTCG 3' for the POT. All the genes, except the GRP, were amplified by the 175LB primer 5' GGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG 3'; in the case of the GRP the primer used was the 410LB 5' TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC 3'. Once the homocigosis was confirmed, we made RT-PCR to verify if the transcript was repressed. The primers used for such experiment were: for the ATJ3, Salk_132923 5 and ATJ3RT3 5' TTCACGACCTCCCCAGGATTAGA 3'; for MTN3, Salk_077789 5 and MTN3RT3 5' TCACCATATCGATGCTCACTTCTGGCAA 3'; for GRP, Salk_051237 5 and Salk_051237 3; for the 31 KDa chloroplast ribonucleoprotein, 31RIB5 5'

ATGACTTCTTCAGTACTAACCCCAAGC 3' and Salk_044047 3; and for POT, the POTRT5 5' TCTCTTCAAGAAGAATACGTCACCGACG 3' and Salk_044047 3.

Experiments of phenotype

The homozygous plants were grown to obtain seeds which were used for the phenotype experiment. The homozygous seeds were germinated five days in GM and then transferred to plates with GM/NaCl 150 mM. In each plate, were sown ten shoots of the mutant line next to other ten shoots of the control Columbia 0, and were grown *in vitro* under the same conditions described previously but in vertical position until observe difference between cultivars.

RESULTS

Characterization of stress treatment

The physiological status of the bean (*cv.* Pinto Villa) 30 d-old plants subjected to salt stress (200mM NaCl) for five days was assessed considering the water potential (Ψ_w) measurements in stressed leaves (Fig. 1). During salinity treatment the leaves water potentials were reduced. Since the second day of stress, the leaf water potential was -0.65 MPa, while at the fifth day was decreased until -1.35 MPa (Fig. 1). Based on these results, we selected the bean plants submitted to 2 and 5 days of stress to carry out the suppression subtractive hybridization.

Identification of differentially expressed gene transcripts in *Phaseolus vulgaris* by SSH

In order to identify genes differentially expressed in *P. vulgaris* (*cv.* Pinto Villa) under salt stress conditions, a subtracted cDNA library of bean leaves was developed. As defined for this method, “tester” is used to designate the cDNA population containing sequences of interest and “driver” to designate the sample used to remove sequences from genes expressed in both populations. Total RNA from tester (2 and 5 day of salt stressed) and driver (un-stressed) leaves were

reverse-transcribed prior to PCR-select cDNA subtraction. The subtracted PCR product was ligated into pCR4 vector, subsequently transferred into *E. coli*. 380 colonies were picked at random from the plates. The DNA plasmid was then digested with *EcoRI* and the digestion products were analyzed on agarose gel in order to discarder fragments lowers than 100 bp. Then the sequencing was realized. A total of 380 ESTs were generated. After data assembly with the SeqManII program of DNASTar, 132 contigs were formed with an average length of 845 bp. BLAST analysis of the contigs using the GenBank Blastx database produced 71 tentatively unique genes (Table 1) and they were submitted to GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), accession numbers GH454327 to GH454396.

Functional classification of differentially expressed genes

To understand the molecular mechanisms of salt tolerance of bean plants, differentially expressed genes selected by subtractions were classified into different categories according to their putative functions generated by the gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) database. A total of 71 transcripts with hits to the GenBank Blastx database were grouped into 8 categories: (1) signaling, (2) transcription factor, (3) transport, (4) cell maintenance and development, (5) chloroplast associated and photosynthesis, (6) photorespiration, (7) proteins related to stress, (8) others proteins (Fig 2). The category with the highest number of EST's was that of proteins related to stress, which represented the 41 % of the total and where there were indentified heat shock proteins, like a DNAJ and a HSP 81.2, also we found a dehydrin, the LEA-18, proteins related to oxidative stress like catalase, cationic peroxidase 2, metallothioneins 1 and 2, others like the carbonic anhydrase, a glycine rich protein, etc.

Analysis of salt stress regulated differential gene expression by RT-PCR

Once isolated and identified the 71 unigenes potentially involved in the response of bean to salt stress by the SSH, we selected eight genes to determine the differential expression by RTPCR analysis. For such experiment, two bean

cultivars (tolerant, Pinto Villa and sensitive, Canario 60) and two periods (2 and 5 days) of stress treatment were used, in order to compare genotype and time gene regulation. The conditions for PCR were optimized to produce unsaturated PCR product accumulation. For all unigenes analyzed, each signal was normalized to the actin signal (Fig. 3) using a standard number of PCR cycles depending of each gene (see materials and methods). In the Pinto Villa cultivar, four of the eight genes analyzed shown a clear upregulation respect to the control (Fig. 3). The ATHB-12 transcription factor was totally induced, LEA-18 a little more at day 5 then the 2, the vacuolar ATPase subunit E was repressed at the second day but increased at the fifth, and S-adenosylmethionine synthase was induced at both periods. The other four genes were also overexpressed but in a lower level during both days, the heat shock protein, the dehydrin, the metallothionein type 2 and finally the aquaporin were induced in the two days.

On the other hand, in the sensitive cultivar Canario 60, was observed the same effect for the ATHB-12 transcription factor, that is, at both days, the transcript was totally upregulated. In this cultivar, the highest induction was detected in LEA-18 with 2.4- and 5-fold at 2 and 5 days respectively, over the control; the transcripts of the other genes were not significantly different, and in the case of dehydrin, metallothionein type 2 and S-adenosylmethionine synthase it was observed a slight down regulation.

Analyses of some bean isolated genes in *Arabidopsis thaliana* mutants

From the 71 unigenes isolated by the SSH, we selected five unigenes to be analyzed their corresponding ortologs of *A. thaliana*. The T-DNA insertion lines within the genes ATJ3, a DNAJ homologue (Salk_132923); the MTN3 of unknown function (Salk_077789); a glycine rich protein, GRP (Sail_387_D04); a 31 KDa chloroplast ribonucleoprotein (Salk_051237); proton dependent oligopeptide transporter, POT (Salk_044047) were identified in the SIGnal database (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Primers specific for each gene were designed to amplify the junctions of the T-DNA insertion and to select a homozygous line using a PCR-based screen.

Even when the five genes resulted homozygous, only in the genes ATJ3, MTN3 and GRP the bands corresponding to each transcript were absent, while in the POT and chloroplast ribonucleoprotein the gene was expressed (Fig. 4).

Phenotypic characterization of GRP knockout mutant

The three homozygous mutant lines described before were subjected to phenotypic assays by analyzing their growth *in vitro* in GM plates with 150 mM of NaCl. Only the Sail_387_D04 mutant line, corresponding to the GRP protein, showed a differential phenotype respect to the control Columbia 0 (Fig. 5). The phenotypic characteristics observed in this line were a smaller size compared to the control, less number of leaves, shorter stems and with fewer ramifications, also, the most of these shoots died before than the Columbia 0 under the saline conditions.

The figure 6, represent the *A. thaliana* GRP behavior under several abiotic stresses like cold, osmotic, salt, drought, oxidative, genotoxic, UV-B, wounding and heat. Such studies are available in the database of the site AtGenExpress. The regulation of this protein in *Arabidopsis* confirms that like heterologous of our gene in *P. vulgaris*, is involved in the salt stress response.

DISCUSSION

In the present study, 71 unigenes were isolated and identified from a tolerant bean cultivar, Pinto Villa, by Suppression subtractive hybridization under salt stress conditions at 200 mM of NaCl (Table 1). The salt stress induces various biochemical and physiological responses in plants; salinity is characterized by water stress (wilting) and reduced growth. Severe injury caused by prolonged exposure to high salinity results in stunted plants and tissue death; plants must adapt to stress in order to survive. Reduced growth caused by salinity is a progressive condition that increases as salinity increases above the plant's tolerance threshold (Blaylock, 1994). The plant response to salinity consists of numerous processes that must function in coordination to alleviate both cellular hyperosmolarity and ion disequilibrium. In addition, crop plants must be capable of satisfactory biomass production in a saline environment (Yokoi et al., 2002). Salt tolerance is controlled by multiple genes and regulated by different types of proteins (Bohnert and Jensen, 1996). We classified the 71 unigenes in eight functional categories: 1. The biggest, the group of proteins related to stress with 41 % of the total, and which included proteins like heat shock proteins (HSPs), like DNAJ which are the most extensively characterized of the stress genes and are mostly encoded by nuclear genes (Singla et al., 1997; Vierling, 1991); dehydrin, LEA-18, the 'Late Embryogenesis Abundant' or LEA proteins and osmotin may protect macromolecules and membranes and chaperones and proteases are implicated in protein turnover and protein translocation (Grover et al., 2001); metallothioneins, glycine rich protein, and others. 2. The second category was cell maintenance and development with 22 %; in this group are the S-adenosylmethionine synthase, ADP ribosylation factor, ATP synthase, translationally-controlled tumor protein homolog (TCTP) (HTP), etc. 3. The next group was transport with 10% including nitrite transporter, vacuolar ATPase, aquaporin, MTN3; the molecular identities of key ion transport systems that are fundamental to plant salt tolerance are now known (Hasegawa et al., 2000). 4. Then, in photosynthesis and chloroplast with 7%, are Rubisco, NADP dependent

malic enzyme, Rubisco activase. 5. We found also transcriptional factors (6%) which play important roles in response of the plant to environmental stresses and its development. Transcription factors are sequence-specific DNA-binding proteins that are capable of activating and/or repressing transcription (Seki et al., 2007); in this group found the ATHB-12, a splicing factor, a eukaryotic translation initiation factor 5A. 6. Signaling (4%), Molecular and genetic studies have shown that various signal transduction systems function in abiotic stress responses, involving protein phosphorylation and/or dephosphorylation, phospholipid signaling, calcium signaling, protein degradation and so on (Seki et al., 2007, Bartels and Sunkar, 2005; Boudsocq and Lauriere, 2005; Mahajan and Tuteja, 2005; Vinocur and Altman, 2005); in this study we found a casein kinase II, a phosphoribulokinase, a putative extracellular dermal glycoprotein. 7. In photorespiration (4%) are the photosystem II 22kDa protein, NADH plastoquinone oxidoreductase. 8. And finally a 6% that include unknown proteins. It is important to analyze the functions of stress inducible genes not only to understand the molecular mechanisms of stress tolerance and the responses of higher plants but also to improve the stress tolerance of crops by gene manipulation.

We selected eight genes of the isolated in the SSH, for assaying by RT-PCR and confirm their differential expression respect to control. Besides the tolerant cultivar Pinto Villa, this experiment also was made in the sensitive Canario 60. Results shown that in the tolerant, all the genes tested were overexpressed, mainly the ATHB-12 transcription factor, the LEA-18, the vacuolar ATP synthase and the S-adenosylmethionine synthase, but also the other four, heat shock protein DNAJ, dehydrin, metallothionein type 2, S-adenosylmethionine synthase. On the other hand, in the sensitive Canario 60 only the ATHB-12 and the LEA-18 were induced and the rest of the transcript remained without significant change or were downregulated, which support the tolerance of the Pinto Villa bean cultivar.

Based on our results, we selected five genes for to study by Salk mutants of *Arabidopsis thaliana*. The genes were: the ATJ3 (DNAJ homolog), the Proton

dependent oligopeptide transporter (POT), the 31 KDa chloroplast ribonucleoprotein, the MTN3, and the glycine rich motif protein (GRMP). The first part of the study was the confirmation of their homocigosis, and after that, the transcriptional study to know if the corresponding transcript was repressed. The positive ones were ATJ3, MTN3 and GRMP and these were used for phenotype assays, where the mutant seeds were grown in NaCl 150 mM. Only the GRP presented different phenotype respect to the control, with a minor size, shorter stems, minor number of leaves and a major damage than the control. It has been shown that the expression of GRMP genes is regulated in response to a number of external stimuli including cold, water stress, high salinity and viral infection (Sachetto-Martins et al., 2000). One of the original interests in glycine rich proteins (GRPs) came from the observation that genes encoding GRPs were developmentally regulated and were also induced by physical, chemical and biological factors, suggesting that they were participating in important cellular processes. GRPs show broad expression pattern diversity. These proteins can be specifically found in different types of specialized tissues, at a given developmental stage. As such, they may be very useful as tools to study plant gene regulation and differentiation processes (Sachetto-Martins et al., 2000).

REFERENCES

- Bayuelo-Jiménez J.S., Craig R., Lynch J.P.** (2002) Salinity tolerance of *Phaseolus* species during germination and early seedling growth. *Crop Science* **42**: 1584-1594
- Bartels, Sunkar** (2005) Drought and salt tolerance in plants, *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**: 23-58
- Blaylock A.D.** (1994) Soil salinity, Salt tolerance, and growth potential of horticultural and Landscape Plants. University of Wyoming. Cooperative extension service
- Bohnert H.J., Jensen R.G.** (1996) Metabolic engineering for increased salt tolerance-the next step. *Australian Journal of Plant Physiology* **23**: 661-667
- Bohnert H.J., Nelson D.E., Jensen R.G.** (1995). Adaptations to environmental stress. *The Plant Cell* **7**: 1109-1111
- Boudsocq M., Lauriere C.** (2005) Osmotic signaling in plants. Multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiology* **138**: 1185-1194
- Chen C., Tao C., Peng H., Ding Y.** (2007) Genetic Analysis of Salt Stress Responses in Asparagus Bean (*Vigna unguiculata* (L.) ssp. *sesquipedalis* Verdc.) *Journal of Heredity* **98**: 655-665
- Dash M., Panda S.K.** (2001). Salt stress induced changes in growth and enzyme activities in germinating *Phaseolus mungo* seeds. *Biologia Plantarum* **44**: 587-589
- Flowers T.J., Yeo A.R.** (1995) Breeding for salinity resistance in crop plants where next. *Australian Journal of Plant Physiology* **22**: 875–884
- Greenway H, Munns H.** (1980) Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology* **31**:149-190
- Grover A., Kapoor A., Lakshmi O.S., Agarwal S., Sahi C., Katiyar-Agarwal S., Agarwal M., Dubey H.** (2001) Understanding molecular alphabets of the plant abiotic stress responses. *Current Science* **80**: 25

- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K. and Bohnert, H.J.** (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 463-499
- Hoagland D.R., Arnon D.I.** (1950) The water culture method of growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* **347**: 1-32
- Khush G.S., Baenziger P.S.** (1998) in *Crop Productivity and Sustainability – Shaping the Future* (eds. Chopra, V. L., Singh, R. B. and Varma, A.), Oxford and IBH Publishing, New Delhi, pp. 113-125
- Lane A., Jarvis A.** (2007) Changes in Climate will modify the Geography of Crop Suitability: Agricultural Biodiversity can help with Adaptation. *eJournal* **4**: 1-12
- Maeshima M.** (2000) Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**: 37-51
- Maeshima M.** (2001) Tonoplast transporters: Organization and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 469-497
- Mahajan S., Tuteja N.** (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **444**: 139-158
- Marschner H.** (1995) Mineral nutrition of higher plants, 2nd edn. London: Academic Press
- Morsomme P., Boutry M.** (2000) The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**: 1-16
- Nuccio, M.L., Rhodes, D., McNeil, S.D., Hanson, A.D.** (1999) Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 128-134
- Ratajczak R.** (2000) Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁽⁺⁾-translocating ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**, 17-36
- Sachetto-Martins G., Franco L.O., Oliveira D.** (2000) Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif?. *Biochimica et Biophysica Acta* **1492**: 1-14
- Sairam R.K., Tyagi A.** (2004) Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science* **86**: 407-421
- Secretaria de Desarrollo Rural del Estado de Puebla (SDR)** 2007

- Seki M., Kamei A., Satou M., Sakurai T., Fujita M., Oono Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** (2003) Transcriptome Analysis in Abiotic Stress Conditions in Higher Plants. *Topics in Current Genetics* **4**: 271-295
- Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Shinozaki K.** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold, and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* **31**: 279-292
- Seki M., Umezawa T., Kim J.M., Matsui A., Kim T., Shinozaki K.** (2007) Transcriptome analysis of plant drought and salt stress response. M.A. Jenks et al. (eds.), *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops* 261-283.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 217-223
- Singla S.L., Pareek A., Grover A.** in *Plant Ecophysiology* (ed. Prasad, M. N. V.), John Wiley and Sons, 1997, pp. 101-127
- Vierling E.** (1991) *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 579-620
- Vinocur B., Altman A.** (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* **16**: 123-132.
- Wang W., Vinocur B., Altman A.** (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperature towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*. **218**: 1-14
- Wang Z-Q., Yuan Y-Z., Ou J-Q., Lin Q-H., Zhang C-F.** (2007) Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. *Journal of Plant Physiology* **164**: 695-701

Yokoi S., Ray A. Bressan R.A., Hasegawa P.M. (2002) Salt Stress Tolerance of Plants *JIRCAS Working Report* 25-33

Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* **6**: 66-71

FIGURE LEGENDS

Table 1. Genes isolated in the tolerant bean cultivar, Pinto Villa, under salt stress.

Figure 1. Water potential of a bean cultivar, Pinto Villa, under salt stress.

Bean plants of the Pinto Villa cv., were grown 30 days in a greenhouse under semi hydroponic conditions by using the Hoagland nutritive solution. At this age, plants were treated with NaCl 200 mM for five days, and the water potential was measured since the second day of the treatment until the end.

Figure 2. Functional classification of the bean proteins isolated.

The 71 unigenes isolated by the Suppression Subtractive Hybridization in bean under salt stress, were submitted to analyses with the Gene Ontology software resulting eight functional categories.

Figure 3. RT-PCR assays of two bean cultivars subjected to salt stress.

Plants of the two bean cultivars, Pinto Villa and Canario 60 of 30-d old, grown under semihidroponic conditions were treated with NaCl 200 mM for 2 and 5 days. Total RNA from each cultivar was isolated and used for the RT-PCR analyses.

Figure 4. RT-PCR assays to confirm knock out lines.

The five mutant lines of *Arabidopsis thaliana* selected from the bean SSH: ATJ3 (DNAJ Homolog; Salk_132923), MTN3 (Salk_077789), GRP (Glycine rich protein; (Salk_387_D04), 31 KDa Chloroplast ribonucleoprotein (Salk_051237), POT (Proton dependent oligopeptide transporter; Salk_044047), were tested by RT-PCR to confirm silencing of the corresponding gene. The PCR products were loaded in 1% agarose gel, using the APT (Adenine phosphoribosil transferase) gene as loading control.

Figure 5. *Arabidopsis thaliana* mutant lines under salt stress for phenotype experiments. A. *thaliana* seeds of the mutant lines Salk_387_D04 (GRP, Glycine

rich protein), Salk_077789 (MTN3) and Salk_132923 (ATJ3), as well as Columbia 0 as control, were germinated in GM medium during five days at 20 ± 2 °C. After, the shoots were transferred to a new plate containing GM/NaCl 150 mM. Ten plants of each mutant line were deposited next to other 10 plants of the control Col. 0 in order to compare. Plates were grown vertical for 20 days to observe differences between plants.

Supplementary Figure. Graph of the GRMP behaviour under salt stress. The expression level of the *A. thaliana* GRMP (AT4G37900) was analyzed under salt stress by the AtGenExpress Visualization Tool (AVT) to know about its behaviour. Results indicate that this gene is upregulated under salt condition in the roots of the plant.

Tables

Table 1

Uni gen	Clone SSHPv	Highest homology	Plant reference	E-value
Cell maintenance and development				
1	9,17,152,153,164	[BAB83761] S-adenosylmethionine synthase	<i>Phaseolus lunatus</i>	0.0
2	51,186,188	[AAB36495] Histone H 3.2	<i>Medicago sativa</i>	2e-34
3	4,35,42,157,179,192,216,257	[CAJ15162] Myo-inositol 1-phosphate synthase	<i>Phaseolus vulgaris</i>	0.0
4	335	[Q9M5G3] Translationally-controlled tumor protein homolog (TCTP)(HTP)	<i>Hordeum vulgare</i>	5e-67
5	80	[NP_198322] GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7e-77
6	73, 84,129	[AAW33106] F1-ATPase alpha subunit	<i>Rubus sp.</i>	6e-144
7	55,196,368	[BAB90396] ADP-ribosylation factor	<i>Oryza sativa</i>	2e-95
8	97	[AAV74407] Chloroplast latex aldolase-like protein	<i>Manihot esculenta</i>	2e-35
9	101,103	[CAC48392] Aminoaldehyde dehydrogenase	<i>Pisum sativum</i>	2e-08
10	128,131,132,175	[ABC75834] Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Glycine max</i>	3e-100
11	160,240,246,317	[Q01516] Fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplast precursor	<i>P. sativum</i>	2e-102
12	213	[NP_566731] Dienelactone hydrolase family protein	<i>A. thaliana</i>	1e-54
13	338, 353,354	[YP_538749] ATP synthase CF1 epsilon subunit	<i>G. max</i>	2e-58
14	340	[P24459] ATP synthase subunit alpha mitochondrial	<i>P. vulgaris</i>	7e-54
15	49	[NP_565267] Epsin N-terminal homology (ENTH) domain-containing protein	<i>A.thaliana</i>	1e-17
16	183	[CAO02550] Putative ribosomal protein S3	<i>Vigna unguiculata</i>	1e-29
Photosynthesis and chloroplast				
17	38,63,82,98,108,117,156,178,203,209,221,224,227,230,242,244,248,256,334,343,362,367	[CAA42617] Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit	<i>P. vulgaris</i>	1e-126
18	36,39,88,102,124,148,161,168,171,182,228,259,366	[AAC12868] Rubisco activase (Rca1)	<i>P. vulgaris</i>	0.0
19	13,21,90,92,94,106,121,147,167,189,238,249,255	[AAW29505] Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	<i>Crematosperma sp.</i>	2e-73
20	357	[CAA56354] NADP dependent malic enzyme	<i>P. vulgaris</i>	4e-82
21	12	[P19684] 33 kDa ribonucleoprotein, chloroplast precursor	<i>Nicotiana sylvestris</i>	7e-34

Photorespiration				
22	123	AAZ04048 Photosystem II protein 1	<i>Ranunculus macranthus</i>	8e-17
23	139	P54773 Photosystem II 22kDa protein, chloroplast precursor (CP22)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	3e-47
24	145	ABC25111 NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit K	<i>G. max</i>	9e-23
Related to stress				
25	18	NP_178298 PAP8 (Purple acid phosphatase precursor); acid phosphatase/protein serine	<i>A. thaliana</i>	4e-25
26	119,137	AAB00554 Dehydrin	<i>P. vulgaris</i>	8e-22
27	151,198,199,207,245	BAF03553 Cysteine proteinase CP2	<i>P. vulgaris</i>	3e-82
28	210,236,258,352	CAA92583 Cysteine protease	<i>P. sativum</i>	1e-41
29	169,173,185,191,214	BAA35121 DnaJ homolog	<i>Salix gilgiana</i>	7e-112
30	195	AAN31859 Heat shock protein 81.2	<i>A. thaliana</i>	1e-121
31	233,234	CAG28949 S-adenosylmethionine decarboxylase uORF	<i>Prunus persica</i>	5e-11
32	337	AAF81194 LEA-18	<i>P. vulgaris</i>	5e-32
33	345	CAA06819 Cysteine synthase, O-acetyl-L-serine (thiol)-lyase	<i>Cicer arietinum</i>	3e-46
34	364	AAD51625 Seed maturation protein PM37	<i>G. max</i>	2e-82
35	1,253,319, 346,363	AAB88173 Catalase	<i>G. max</i>	4e-146
36	10	AAC83463 Cationic peroxidase 2	<i>G. max</i>	4e-59
37	54	AAF19523 Cytochrome c oxidase subunit 2	<i>V. unguiculata</i>	2e-113
38	77	AAY21210 Ultraviolet-B-repressible protein	<i>Gossypium hirsutum</i>	2e-18
39	111,219,225,243,347	AAM34480 Putative glutathione S-transferase	<i>Phaseolus acutifolius</i>	1e-108
40	149	AAD37427 Peroxidase 1 precursor	<i>P. vulgaris</i>	2e-85
41	30,218,250,355	AB176561 Type 2 metallothionein	<i>Vigna angularis</i>	6e-93
42	220	BAD18376 Type 1 metallothionein	<i>G. max</i>	2e-16
43	239	BAF34844 Pterocarpan reductase	<i>Lotus japonicus</i>	9e-69
44	58	ABN08828 Peroxisomal biogenesis factor 11	<i>Medicago truncatula</i>	2e-64
45	150	AAP83877 Putative fatty acid desaturase TRZIP	<i>Trifolium repens</i>	7e-23
46	155	Q945B7 Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester oxidative cyclase, chloroplast precursor	<i>Euphorbia esula</i>	6e-62
47	211	NP_174753 Oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	<i>A. thaliana</i>	4e-92

48	360	[CAK54360] Putative desaturase-like protein	<i>Trifolium repens</i>	5e-94
49	361	[AAD27876] Carbonic anhydrase	<i>Vigna radiata</i>	1e-129
50	231	[AAA33969] Hydroproline-rich protein	<i>G. max</i>	7e-12
51	336	[BAA10929] Cytochrome P450 like_TBP	<i>Nicotiana tabacum</i>	1e-43
52	348	[ABY48136] Glycine-rich motif protein	<i>M. truncatula</i>	9e-18
53	344	[P22357] Anther-specific protein SF18 precursor	<i>Helianthus annuus</i>	3.6
Signaling				
54	142	[NP_179889] Casein kinase II alpha chain	<i>A. thaliana</i>	6e-38
55	237,241	[CAA72118] Phosphoribulokinase	<i>P. sativum</i>	1e-114
56	350	[CAC10209] Putative extracellular dermal glycoprotein	<i>C. arietinum</i>	4e-98
Transcriptional factors				
57	79,89,99,130	[BAD27734] Splicing factor	<i>O. sativa</i>	2e-43
58	85	[NP_191748] ATHB-12; transcription factor	<i>A. thaliana</i>	6e-43
59	113	[AAQ08194] Eukaryotic translation initiation factor 5A isoform IV	<i>Hevea brasiliensis</i>	3e-18
60	118	[NP_567536] RNA recognition motif (RRM)-containing protein	<i>A. thaliana</i>	5e-58
Transport				
61	86	[CAA93316] Nitrite transporter	<i>Cucumis sativus</i>	8e-25
62	99	[AAO69667] Vacuolar ATPase subunit E	<i>P. acitifolius</i>	2e-41
63	208	[BAA25753] Ca ²⁺ /H ⁺ exchanger	<i>V. radiata</i>	1e-31
64	229	[AAL32127] Aquaporin	<i>M. truncatula</i>	5e-37
65	342	[AAL57201] Putative nodule membrane protein	<i>M. sativa</i>	1e-62
66	202,370	[AAU14999] MtN19-like protein	<i>P. sativum</i>	3e-31
67	235	[NP_197755] MTN3	<i>A. thaliana</i>	8e-48
Other				
68	23	[YP_588293] Chloroplast hypothetical protein	<i>Zea mays</i>	4e-19
69	130	[NP_758764] Hypothetical protein	<i>Erwinia amylovora</i>	5e-43
70	136	[CAB67231] Hypothetical protein	<i>Oenothera elata subsp. hookeri</i>	4e-15
71	369	[CAN82966] Hypothetical protein	<i>Vitis vinifera</i>	4e-20

Figures

Figure 1

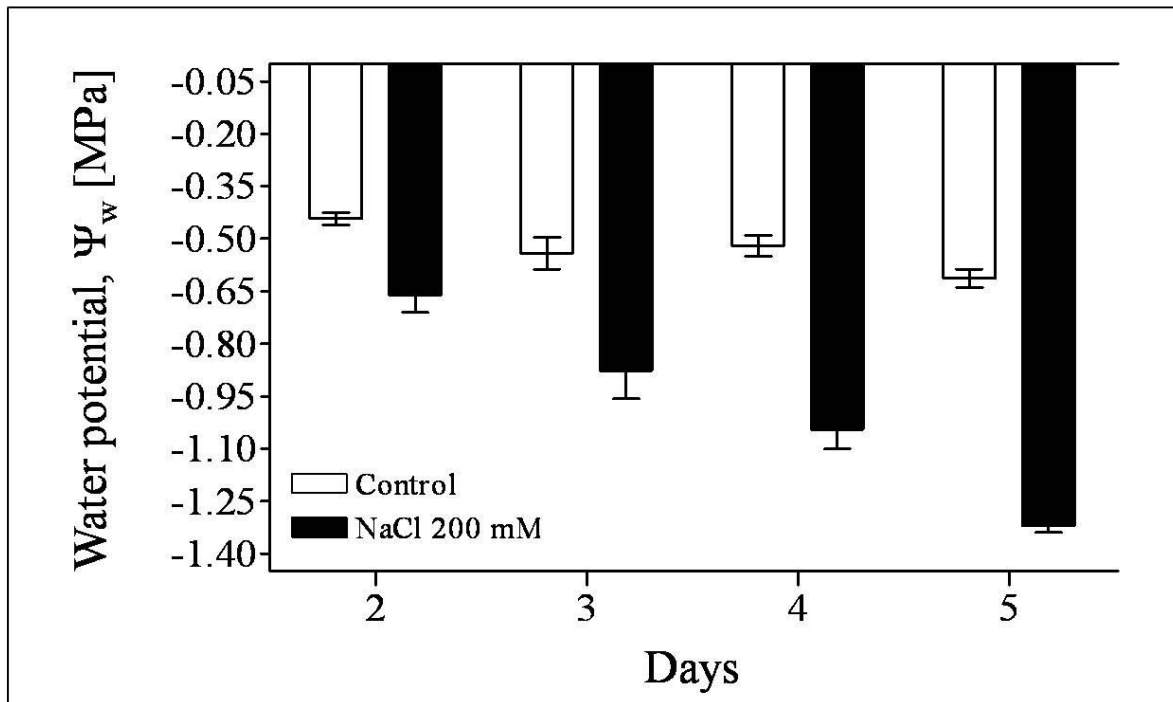


Figure 2

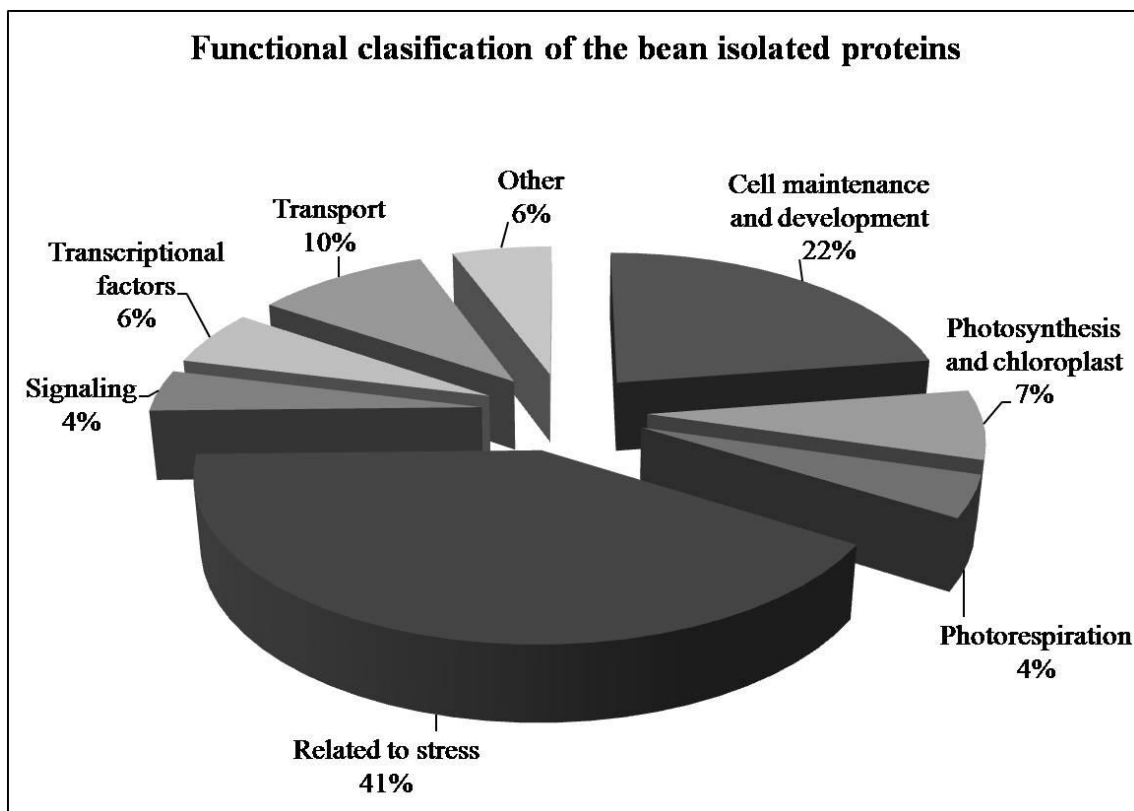


Figure 3

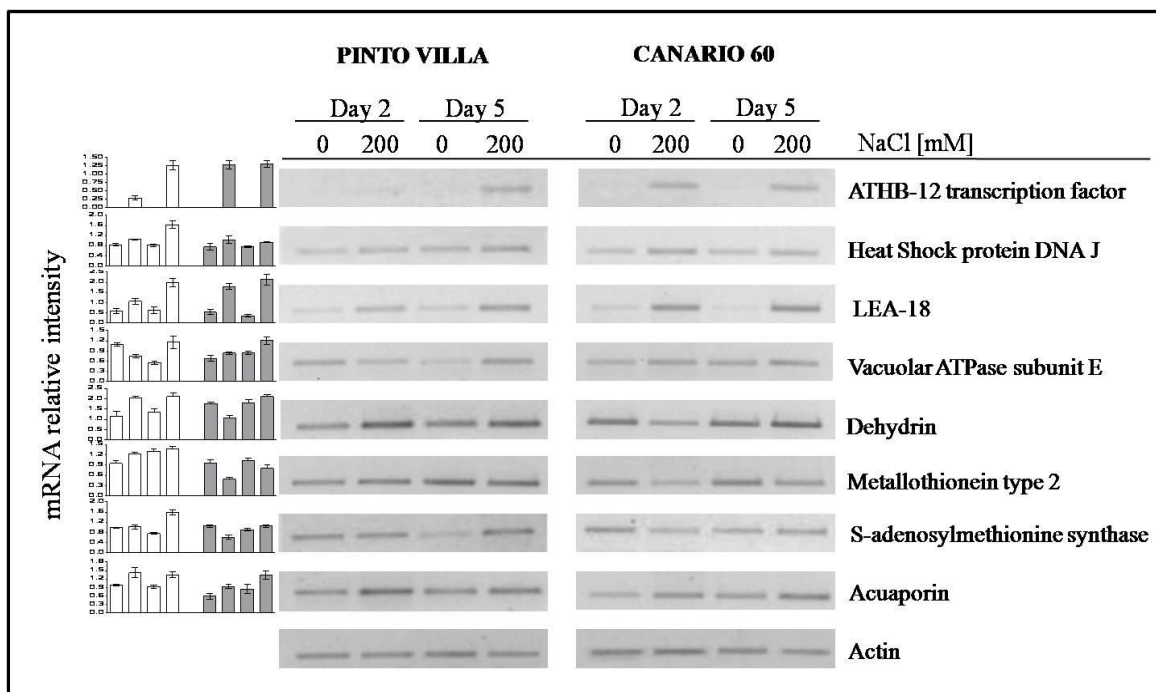


Figure 4

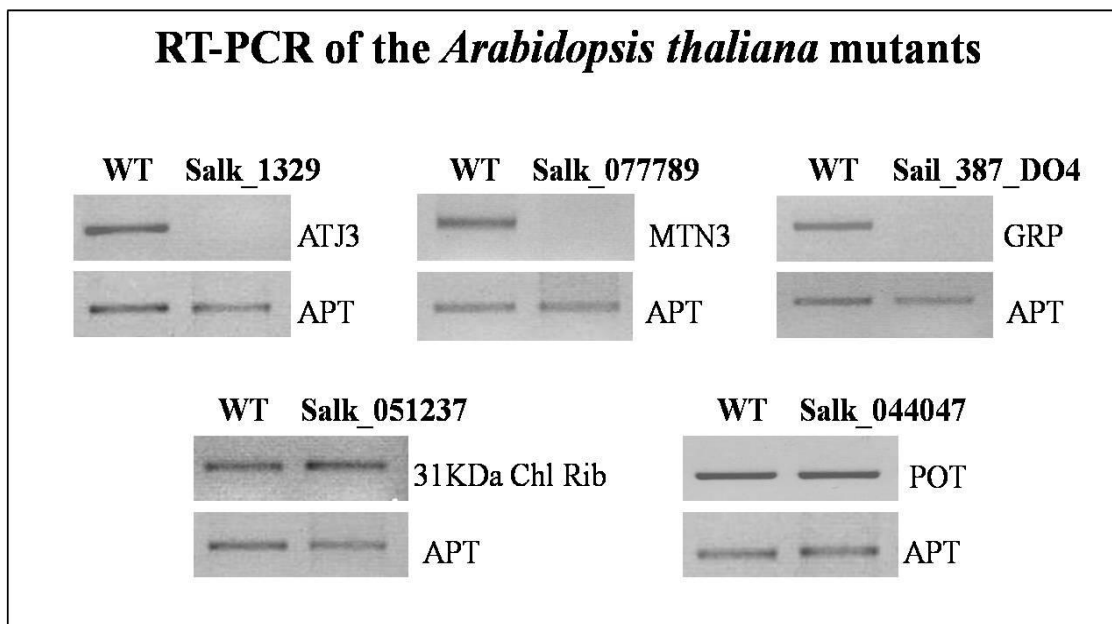
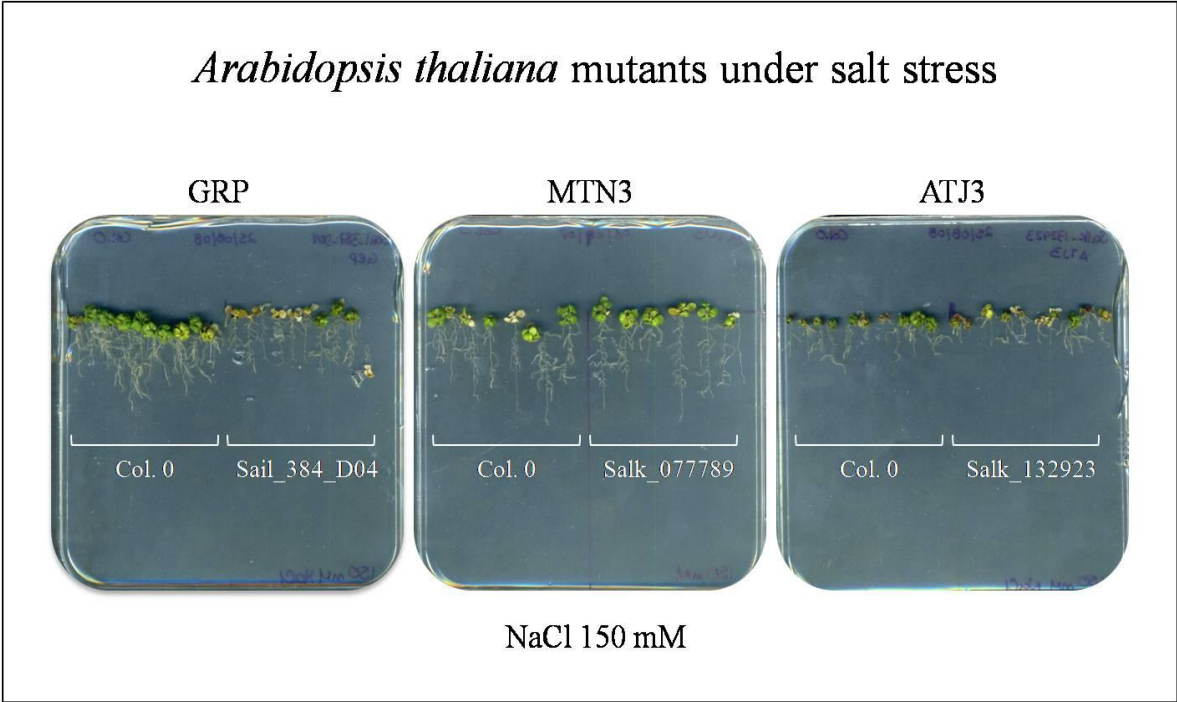
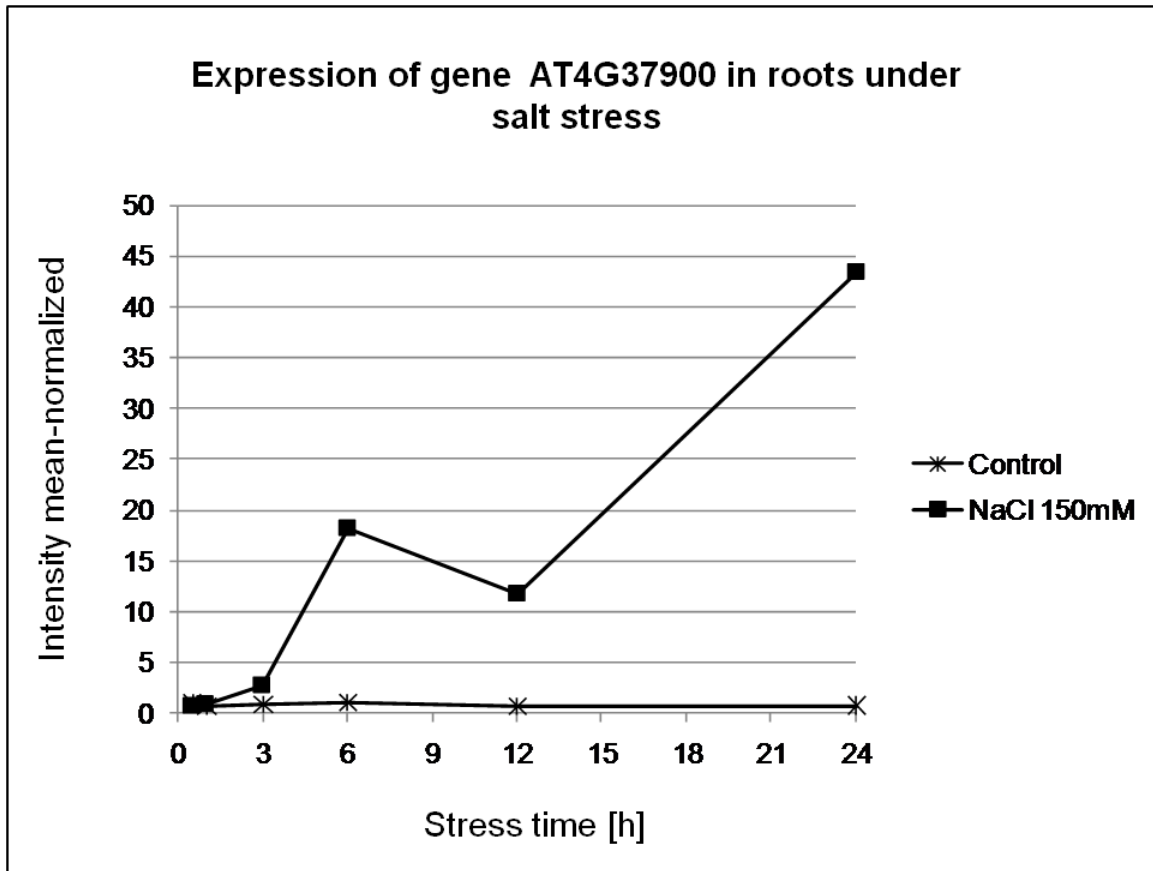


Figure 5



Supplementary figure



7. DISCUSIÓN GENERAL

La salinidad, entre otros tipos de estrés abiótico, es ya un gran problema a nivel mundial, se estima que sobre 800 millones de hectáreas en el planeta están afectadas por sales, de estas 397 millones lo son por problemas de salinidad y 434 millones por condiciones asociadas a sodicidad (Munns, 2005; FAO, 2000). Varias son las causas vinculadas a estos procesos de salinización, entre las cuales es posible citar un excesivo empleo de fertilizantes, uso de agua de mala calidad por el exceso de sales, mal drenaje y tala de vegetación arbórea (Tanwar, 2003). De ahí la importancia de este tipo de estudios que contribuyen al conocimiento de los mecanismos y respuestas moleculares que presentan las plantas para poder superar todas estas condiciones adversas. La magnitud de las respuestas de las plantas se encuentra estrechamente relacionada a la concentración de las sales, a la duración del estrés a que están expuestas y a la especie o cultivar de la que se trate.

El primer paso que se llevó a cabo para la caracterización de estos dos cultivares de frijol fue con un enfoque fisiológico, es decir, se analizaron parámetros como la acumulación de prolina, clorofila y el potencial hídrico, así como el efecto de la salinidad en la morfología de las plantas.

Cuando una planta se encuentra en condiciones de salinidad, su potencial hídrico se ve disminuido, y para que la célula pueda mantener su turgencia, ocurre una acumulación de osmolitos compatibles, entre ellos la prolina, que están involucrados en la osmoregulación y permiten que pueda ser tomada una mayor cantidad de agua del ambiente, amortiguando así el efecto inmediato de la pérdida de agua en la planta. La prolina además, participa en la regulación del potencial redox, como captor de radicales hidroxilo, como soluto que protege a las macromoléculas de desnaturalización, reduce la acidez en la célula, actúa como un compuesto de almacenaje y fuente de nitrógeno para un rápido crecimiento después del estrés (Blum y Ebercon, 1976; Simiroff y Cumbes, 1989; Schobert y

Tschesche, 1978; Venkamp et al., 1989; Singh, 1973). En el caso de la prolina se observó que la variedad tolerante Pinto Villa, no presentaba una acumulación de ésta cuando se encontraba en condiciones de salinidad, sino hasta que el nivel de estrés ya era muy alto, mientras que la variedad sensible, Canario 60, empezaba a acumularla desde la primera fase del estrés, además que el daño en este ultimo cultivar, consecuencia del agobio, era ya muy evidente respecto a la variedad tolerante. Estos datos sugerían que Pinto Villa contaba con otro mecanismo para oponer resistencia al estrés salino, diferente a la acumulación de prolina y que sugeríamos era la acumulación de poliaminas, las cuales han sido relacionadas en diversos estudios como parte de la respuesta de las plantas ante una situación de estrés, y esta idea estaba apoyada con el hecho de que al adicionar poliaminas de manera exógena a la variedad sensible, se veían disminuidos los niveles de prolina apoyando nuestra teoría.

La reducción en el crecimiento de la planta debido al estrés salino está frecuentemente asociada a una disminución en la actividad fotosintética así como al transporte de electrones (Greenway y Munns, 1980), lo cual va acompañado de la degradación de clorofila (Curran et al., 1990; Lichtenthaler et al., 1996; Zagolski et al., 1996), por lo tanto, otro de los parámetros estudiados fue el contenido de clorofila en plantas estresadas por sal. Observamos una reducción en el contenido total de clorofila en ambos cultivares durante el periodo de estrés, sin embargo, a diferencia de Canario 60, la variedad tolerante elevó su contenido de clorofila al inicio del estrés comparado con el control.

El estrés salino limita la disponibilidad de agua a las células vegetales, lo cual es traducido como una disminución en el potencial hídrico. Las plantas resisten un bajo potencial hídrico acumulando solutos y modificando la propiedades de las paredes celulares para evitar la deshidratación, así como utilizando proteínas protectoras y mecanismos para tolerar el contenido reducido de agua previniendo o reparando el daño celular (Verslues et al., 2006). Nuestros resultados mostraron una reducción en el potencial hídrico en ambos cultivares bajo estrés salino pero

esta disminución fue más notable en la variedad sensible Canario 60. La menor disminución en el potencial hídrico en las hojas de Pinto Villa demuestra que esta variedad tiene mecanismos para contrarrestar el efecto del estrés.

De acuerdo a los datos obtenidos con los estudios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, el siguiente paso en la investigación fue llevar a cabo un estudio molecular para comprender mejor los mecanismos internos que cada una de las dos variedades de frijol presenta para hacer frente al estrés salino. Para ello, primero se llevó a cabo la determinación de poliaminas, putrescina, espermidina y espermina, que son reguladores de crecimiento, críticos para un gran número de procesos incluyendo la división celular, embriogénesis somática, crecimiento de la raíz, inicio de la floración, y desarrollo de flores y frutos (Evans y Malmberg, 1989; Galston y Kaur-Sawhney, 1990). Además de su papel en el desarrollo de las plantas, las poliaminas juegan un importante papel en la respuesta de las plantas al estrés; se han reportado aumentos de varias veces en el nivel de poliaminas libres en las células vegetales en respuesta a una variedad de estrés abiótico incluyendo la salinidad (Evans and Malmberg, 1989; Liu et al., 2000; Alcázar et al., 2006). Además desde principio de los 90's se ha demostrado que las variedades resistentes a salinidad presentan niveles de poliaminas más altos bajo condiciones de estrés (Basu y Ghosh, 1991; Erdei et al., 1990). En el presente estudio se llevó a cabo la determinación de poliaminas en las dos variedades a dos tiempos diferentes de estrés salino, 1 y 7 días. Después del primer día de tratamiento, los niveles de todas las poliaminas incrementó en la variedad tolerante Pinto Villa, mientras que en la sensible Canario 60, los niveles de espermidina y espermina solo se incrementaron a la concentración de NaCl más alta utilizada (400 mM). Al séptimo día, Pinto Villa acumuló espermina, pero en Canario 60 decayeron todos los niveles, estos resultados sugieren que la acumulación de espermina en Pinto Villa podría ser parte del mecanismo que le confiere tolerancia a la salinidad. Algunas de las maneras en que las poliaminas pueden contribuir a la tolerancias son que pueden actuar estabilizando proteínas y membranas, captando radicales libres, afectando la absorción de iones o inhibiendo la apertura de los estomas

(Tiburcio et al., 1994; Drolet et al., 1986; Yamaguchi et al., 2007); específicamente la espermina, por tener una cadena más larga y más cargas positivas, sería la más efectiva para la neutralización y la estabilización de las membranas.

A nivel molecular, se llevó a cabo un análisis de los transcritos de las principales enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas, ADC (arginina descarboxilasa), SAMDC (S-adenosilmetionina descarboxilasa) y SPDS (espermidina sintasa) a 1 y 7 días de estrés salino. En el caso de la ADC, el transcrito fue inducido en ambos cultivares. De la SAMDC, se analizaron dos homólogos del gen, uno de los cuales fue aislado durante el desarrollo de la presente investigación, la *samdc1*; estos fueron regulados de manera diferencial entre los dos cultivares, mientras que en Canario 60 los dos transcritos presentaron una sobreexpresión general, en Pinto Villa solo se indujo la SAMDC1. La SPDS fue inducida en ambos cultivares el primer día de estrés, pero al séptimo día, solo se incrementó el transcrito de la variedad sensible pero no de la tolerante. Como se observó en los resultados, hay una inconsistencia entre la expresión de estos cuatro genes y los niveles de poliaminas libres, lo cual puede ser explicado por la existencia de otros genes biosintéticos de poliaminas en el genoma de frijol, por la regulación de las poliaminas a nivel postranscripcional y/o postraducciona l y por la conjugación y/o oxidación de las poliaminas.

Uno de los estudios moleculares más importantes de este trabajo fue la construcción de una genoteca sustractiva de cDNA en la variedad de frijol Pinto Villa, bajo condiciones de estrés salino. A partir de la misma se aislaron 71 unigenes que se expresan tanto de manera temprana como tardía durante el estrés. Estos 71 genes fueron clasificados en 8 categorías funcionales: 1. Proteínas relacionadas con el estrés, 2. Mantenimiento celular y desarrollo, 3. Transporte, 4. Fotosíntesis y cloroplasto, 5. Factores transcripcionales, 6. Fotorespiración, 7. Señalización y 8. Otros. Algunos de los genes aislados mediante esta genoteca han sido previamente estudiados en respuesta a estrés, pero muchos de ellos no, por lo cual resulta interesante la identificación de estos

nuevos genes que pueden sentar las bases para nuevas investigaciones enfocadas a descubrir el mecanismo que les permite a algunas plantas tolerar las condiciones de agobio.

Por último y para cerrar este trabajo, se seleccionaron 5 genes de los encontrados en la genoteca sustractiva y se estudiaron en líneas Salk de *Arabidopsis thaliana*, aprovechando todos los avances que se tienen en la actualidad con este modelo. Se utilizaron líneas mutantes T-DNA de los genes de interés y que no han sido estudiadas, estas fueron una DNAJ, una proteína rica en glicina (GRP), un transportador de oligopéptidos dependiente de protones (POT), una ribonucleoproteína de cloroplasto 31 KDa y una proteína de función desconocida, MTN3. Las plantas mutantes fueron sometidas a estrés salino con la finalidad de encontrar algún fenotipo diferencial, lo cual ocurrió únicamente en la planta mutante para la GRP, observándose plantas más pequeñas, con menor número de hojas y un daño más visible respecto a las plantas control. Se ha propuesto que las GRP son proteínas de unión a RNA y que están involucradas en su procesamiento, estabilización y transporte (Steinert et al., 1991). En plantas se ha reportado la presencia de péptidos repetitivos ricos en glicina, además que la expresión de los genes que codifican a las proteínas ricas en glicina (GRP) son reguladas por desarrollo, y también inducidas en algunos géneros de plantas por factores físicos, químicos y biológicos (Fusaro y Sachetto-Martins, 2007). Datos experimentales recientes han contribuido al conocimiento de la función biológica de algunas GRP. Mayfield y Preus (2000) demostraron el papel de una oleosina-GRP de *Arabidopsis* en el reconocimiento del polen y en hidratación. Las GRPs también han sido implicadas en la traducción de señales por la caracterización de la AtGRP3 como un ligando extracelular de la cinasa receptora WAK1 en la planta (Park et al., 2001). También se ha observado la participación de las GRPs de unión a RNA en la aclimatación de plantas a frío (Kim et al., 2005; Kwak et al., 2005). Los diversos patrones de expresión de los genes *grp*, además de las diferentes localizaciones subcelulares de algunos grupos de GRP, indican claramente que estas proteínas están implicadas en varios procesos fisiológicos

independientes (Sachetto-Martins et al., 2000). Se sabe que para que una planta mutante presente un fenotipo diferencial respecto a una planta control, es preciso que se combinen muchas variables, de ahí la importancia de este gen para futuras investigaciones, ya que estos resultados dan un punto de partida hacia el esclarecimiento de las rutas y los mecanismos implicados en la respuesta de las plantas, es este caso de frijol, a las condiciones adversas a que pueden verse sometidas.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abiotic stress.** **Biology Online** (2008-05-04) http://www.biology-online.org/dictionary/Abiotic_stress
- Acosta-Gallegos J.A., Ochoa-Márquez R., Arrieta-Montiel M.P., Ibarra-Pérez F., Pajarito-Ravelero A., Sánchez-Valdez I.** (1995) Registration of “Pinto Villa” Common Bean. *Crop Science* **35**, 1211-1212
- Alcázar R., Marco F., Cuevas J.C., Patron M., Ferrando A., Carrasco P., Tiburcio A., Altabella T.** (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters* **28**: 1867–1876
- Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse T.J., Kim C.J., Chen H., Shinn P., Stevenson D.K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C.C, Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D.E., Marchand T., Risseeuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W.L., Berry C.C., Ecker J.R.** (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657
- Araus J.L., Slafer G.A., Reynolds M.P., Royo C.** (2002) Plant breeding and water relations in C3 cereals: what should we breed for? *Annals of Botany (London)* **89**: 925-940
- Arnon D.I.** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* **24**: 1-15
- Aziz A., Martin-Tanguy J., Larher F.** (1997) Plasticity of polyamine metabolism associated with high osmotic stress in rape leaf discs and with ethylene treatment. *Plant Growth Regulation* **21**: 153-163
- Baker J., Steele C., Dure L.** (1988) Sequence and characterization of 6 *Lea* proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology* **11**: 277-291
- Bartels D., Engelhardt K., Roncarati R., Schneider K., Rotter M., Salamini F.** (1991) An ABA and GA modulated gene expressed in the barley embryo encodes an aldose reductase related protein. *EMBO Journal* **10**: 1037-1043

- Basu R., Ghosh B.** (1991) Polyamines in various rice (*Oryza sativa*) genotypes with respect to sodium-chloride salinity. *Physiologia Plantarum* **82**: 575-581
- Benavides M.P., Aizecang G.I., Tomaro M.L.** (1997) Polyamines in *Helianthus annuus* L. during germination under salt stress. *Plant Growth Regulation* **16**: 205-211
- Blaylock A.D.** (1994) Soil salinity, Salt tolerance, and growth potential of horticultural and Landscape Plants. University of Wyoming. Cooperative extension service
- Blum A., Ebercon A.** (1976) Genotypic responses in Sorghum to drought stress. Free proline accumulation and drought resistance. *Crop Science* **16**: 428-431
- Blumwald E., Aharon G.S., Apse M.P.** (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**: 140-151
- Bocca S.N, Magioli C, Mangeon A, Junqueira RM, Cardeal V, Margis R, Sachetto-Martins G.** (2005) Survey of glycine-rich proteins (GRPs) in the Eucalyptus expressed sequence tag database (ForEST). *Genetics and Molecular Biology* **28**: 608-624
- Bohnert H.J., Jensen R.G.** (1996) Metabolic engineering for increased salt tolerance-the next step. *Australian Journal of Plant Physiology* **23**: 661-667
- Bohnert H.J., Nelson D.E., Jensen R.G.** (1995) Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* **7**: 1099-1111
- Bohnert, H.J., Shen B.** (1999) Transformation and compatible solutes. *Scientia Horticulturae* **78**: 237-260
- Bors W., Langebartels C., Michel C., Sandermann H.** (1989) Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochemistry* **28**: 1589-1595
- Bostock R.M., Quatrano R.S.** (1992) Regulation of *Em* gene expression in rice. *Plant Physiology* **98**: 1356-1363
- Bouchereau A. Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J.** (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* **140**: 103-125
- Bray E.A.** (1993) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* **103**: 1035-1040

- Bray E.A.** (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* **2**:48-54
- Bray E.A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E.** (2000) Responses to abiotic stresses. In W. Gruissem, B. Buchanan, R. Jones, eds., *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 1158–1249
- Bray E.A., Beachy R.N.** (1985) Regulation by ABA of conglycinin expression in cultured developing soybean cotyledons. *Plant Physiology* **79**: 746-750
- Brüggemann L., Pottosin I., Schönknecht G.** (1998) Cytoplasmic polyamines block the fast-activating vacuolar cation channel. *The Plant Journal* **16**: 101-105
- Brüggemann L., Pottosin I., Schönknecht G.** (1999) Selectivity of the fast activating vacuolar cation channel. *Journal of Experimental Botany* **50**: 873-876
- Buchner J.** (1996) Supervising the fold: Functional principles of molecular chaperones. *FASEB Journal* **10**: 10-19
- Campbell S.A., Close T.J.** (1997) Dehydrins: genes, proteins, and association with phenotypic traits. *New Phytologist* **137**: 61-74
- Capell T., Bassie L., Christou P.** (2004) Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 9909-9914
- Casero R.A., Marton L.J.** (2007) Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* **6**: 373-390
- Cassab G.I.** (1998) Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 281-309
- Cassman K.G., Dobermann A., Walters D.T., Yang H.** (2003) Meeting cereal demand while protecting natural resources and improving environmental quality. *Annual Review of Environment and Resources* **28**: 315-58
- Chandler P.M., Robertson M.** (1994) Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**: 113-141

- Chattopadhyay M.K., Gupta S., Sengupta D.N., Ghosh B.** (1997) Expression of arginine decarboxylase in the seedlings of indica rice (*Oryza sativa* L.) as affected by salinity stress. *Plant Molecular Biology* **34**: 477-483
- Chattopadhyay M.K., Tiwari B.S., Chattopadhyay G., Bose A., Sengupta D.N., Ghosh B.** (2002) Protective role of exogenous polyamines on salinity-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* **116**: 192-199
- Chen T.H.H., Murata N.** (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current opinion in Plant Biology* **5**: 250-257
- Chen W.J., Zhu T.** (2004) Networks of transcription factors with roles in environmental responses. *Trends in Plant Science* **9**: 1360-1385
- Childs A.C., Metha D.J., Gerner E.W.** (2003) Polyamine-dependent gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**: 1394-1406
- Close T.J.** (1996) Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum* **97**: 795-803
- Close T.** (1997) Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum* **100**: 291-296
- Cohen S.S.** (1998) A guide to the polyamines. Oxford University Press, New York
- Crespi M.** (2007) Analysis of the response to abiotic stress in legumes. *Abiotic stress in legumes*, www.grainlegumes.com
- Crespi M., Gálvez S.** (2000) Molecular mechanisms in root nodule development. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**: 155-166
- Cuming, A.C.** (1999) LEA proteins. In Seed Proteins (Shewry, P.R. and Casey, R., eds), pp. 753–780, Kluwer Academic
- Curran P.J., Dungan J.L., Gholz H.L.** (1990) Exploring the relationship between reflectance red-edge and chlorophyll content in slash pine. *Tree Physiology* **7**: 33-48
- Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F.** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**

- Debouck D.G.** (1999) Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean, in: *Common Bean Improvement in the Twenty-First Century*, S. P. Singh, ed., Kluwer Academic Publ., Dordrecht, the Netherlands, pp. 25-52
- Delgado-Salinas A.** (1985) Systematics of the genus *Phaseolus* in Mexico and Central America. Ph.D. dissertation, University of Texas, Austin
- Demidchik V., Davenport R.J., Tester M.** (2002) Nonselective cation channels. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **53**: 67-107
- Drolet G., Dumbroff E.B., Legge R.L., Thompson J.E.** (1986) Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry* **25**: 367-371
- Dure, L. III.** 1993. Structural motifs in Lea proteins. In: T.J. Close and E.A. Bray (Eds.) *Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp. 91-103
- Dure, L. III, Crouch M., Harada J., Ho T.H.D., Mundy J., Quatrano R.S., Thomas T., Sung Z.R.** (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology* **12**: 475-486
- Dure L. III, Greenway S.C, Galau G.A.** (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry* **20**: 4162–4168
- Erdei L., Trivedi S., Takeda K., Matsumoto H.** (1990) Effects of osmotic and salt stresses on the accumulation of polyamines in leaf segments from wheat-varieties differing in salt and drought tolerance. *Journal of Plant Physiology* **137**: 165-168
- Evans P.T., Malmberg R.L.** (1989) Do polyamines have roles in plant development? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**: 235-269
- FAO/AGL** (2000) Food and Agricultural Organization (Land and Plant Nutrition Management Service)
- Feirer R.P., Mignon G., Litvay J.** (1984) Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in the wild carrot. *Science* **223**: 1433-1435

- Flowers T.J., Hajibagheri M.A., Clipson N.J.W. (1986)** Halophytes. *The Quarterly Review of Biology* **61**: 313-337
- Fusaro A., Mangeon A., Rocha C., Junqueira R., Coutinho T., Margis R., Sachetto-Martins G. (2001)** Classification, expression pattern and comparative analysis of sugarcane expressed sequences tags (ESTs) encoding glycine-rich proteins (GRPs). *Genetics and Molecular Biology* **24**: 263-273
- Fusaro A., Sachetto-Martins G. (2007)** Blooming Time for Plant Glycine-Rich Proteins Plant Signal Behavior. **2**: 386-387
- Galau G.A., Hughes D.W., Dure III L. (1986)** Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. *Plant Molecular Biology* **7**: 155-170
- Galston A., Kaur-Sawhney R. (1990)** Polyamines. *Plant Physiology* **94**: 406-410
- Garg B.K., Gupta I.C. (1997)** Physiology of salt tolerance of arid crops. Mung bean and moth bean. *Current Agriculture* **21**: 35-48
- Garufi A., Visconti S., Camoni L., Aducci P. (2007)** Polyamines as physiological regulators of 14-3-3 interaction with the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell Physiology* **48**: 434-440
- Ge C., Cui X., Wang Y., Hu Y., Fu Z., Zhang D., Cheng Z., Li J. (2006)** *BUD2*, encoding an S-adenosylmethionine decarboxylase, is required for *Arabidopsis* growth and development. *Cell Research* **16**: 446-456
- Goykovic V., Saavedra G. (2007)** Some effects of salinity on the tomato cultivars and agronomic practices in its managing. *Idesia (Chile)*. **25**: 47-58
- Greenway H., Munns H. (1980)** Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology* **31**: 149-190
- Groppa M.D., Benavides M.P. (2007)** Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* **34**: 35-45
- Grover A., Kapoor A., Lakshmi O.S., Agarwal S., Sahi C., Katiyar-Agarwal S., Agarwal M., Dubey H. (2001)** Understanding molecular alphabets of the plant abiotic stress responses. *Current Sciences* **80**: 206-216
- Grover A., Sanan N., Sahi C. (1998)** *Current Science* **75**: 178-179

- Grzelczak Z.F., Sattolo M.H., Hanley-Bowdoin L.K., Kennedy T.D., Lane, B.G.** (1982) Synthesis and turnover of proteins and mRNA in germinating wheat embryos. *Canadian Journal of Biochemistry* **60**: 389-397
- Halfter U., Ishitani M., Zhu J.K.** (2000) The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**: 3735-3740
- Hanfrey C., Sommer S., Mayer M.J., Burtin D., Michael A.J.** (2001) Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *The Plant Journal* **27**: 551-560
- Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K., Bohnert H.J.** (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 463-499
- Hoagland D.R., Arnon D.I.** (1950) The water-culture method of growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* **347**
- Hummel I., Gouesbet G., Amrani A.E., Aïnouche A., Couée 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
- Igarashi K., Kashiwagi K.** (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **271**: 559-564
- 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.** (2004) Spermidine synthase genes are essential for survival of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **135**: 1565-1573
- Imai R., Chang L., Ohta A., Bray E., Takagi M.** (1996) A *lea*-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **170**: 243-248

- Ingram J., Bartels D.** (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 377-403
- Ishitani M., Liu J.P., Halfter U., Kim C.S., Shi W.M., Zhu J.K.** (2000) SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell* **12**: 1667-1677
- Iuchi S., Kobayashi M., Taji T., Naramoto M., Seki M., Kato T., Tabata S., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **27**: 325-333
- Jarvis B.C., Shannon, P.R.M., Yasmin S.** (1983) Involvement of polyamines with adventitious root development in stem cuttings of mung bean. *Plant Cell Physiology* **24**: 677-683
- Jiang C., lu B., Singh J.** (1996) Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of the *BN115* gene from *B. napus*. *Plant Molecular Biology* **30**: 679-84
- Jiménez-Bremont J.F., Hernández-Lucero E., Alpuche-Solís A.G., Casas-Flores S., Barba de la Rosa A.P.** (2006) Differential distribution of transcripts from genes involved in polyamine biosynthesis in bean plants. *Biologia Plantarum* **50**: 551-558
- Jiménez-Bremont J.F., Ruiz O., Rodríguez-Kessler M.** (2007) Modulation of spermidine and spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**: 812-821
- Johansen C., Sexena N.P., Chauhan Y.S., Subbarao G.V, Pundir R.P.S, Kumar Rao J.V.D.K., Jana M.K.** (1990) Genotypic variation in salinity response of chickpea and pigeonpea. In S.K. Sinha et al. (ed.) Proceedings of the International Congress of Plant Physiology, New Delhi, India. February 1988 (vol. 2). Society of Plant Physiology and Biochemistry, New Delhi, India

- Kakkar R.K., Nagar P.K.** (1997) Distribution and changes in endogenous polyamines during winter dormancy in tea [*Camellia sinensis* L. (O) Kuntze], *Journal of Plant Physiology* **151**: 63-67
- Kakkar R.K., Nagar P.K., Ahuja P.S., Rai V.K.** (2000) Polyamines and plant morphogenesis. *Biologia Plantarum* **43**: 1-11
- Karlson D., Nakaminami K., Toyomasu T., Imai R.** (2002) A cold-regulated nucleic acid-binding protein of winter wheat shares a domain with bacterial cold-shock proteins. *Journal of Biological Chemistry* **20**: 35248-56
- Kasinathan V., Wingler A.** (2004) Effect of reduced arginine decarboxylase activity on salt tolerance and on polyamine formation during salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **121**: 101-107
- 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 and Cell Physiology* **45**: 712-722
- Kasukabe Y., He L., Watakabe Y., Otani M., Shimada T., Tachibana S.** (2006) Improvement of environmental stress tolerance of sweet potato by introduction of genes for spermidine synthase. *Plant Biotechnology* **23**: 75-83
- Kaur-Sawhney R., Tiburcio A.F., Altabella T., Galston A.W.** (2003) Polyamines in plants: an overview. *Journal of Cell and Molecular Biology* **2**: 1-12
- Kawasaki S., Borchert C., Deyholos M., Wang H., Brazille S., Kawai K., Galbraith D., Bohnert H.J.** (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* **13**: 889-905
- Keller B.** (1993) Structural cell wall proteins. *Plant Physiology* **101**: 1127-1130
- Keller B., Templeton M.D., Lamb C.J.** (1989) Specific localization of a plant cell wall glycine-rich protein in protoxylem cells of the vascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **86**: 1529-1533
- Kelley W.L.** (1998) The J domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends in Biochemical Sciences* **23**: 222-227

- Khanna-Chopra R., Sinha S.K.** (1998) Prospects of success of biotechnology approaches for improving tolerance to drought stress in crop plants. *Current Science* **74**: 25-34
- Khush G.S., Baenziger P.S.** (1998) in *Crop Productivity and Sustainability – Shaping the Future* (eds. Chopra, V. L., Singh, R. B. and Varma, A.), Oxford and IBH Publishing, New Delhi, pp. 113–125
- Kim Y.O., Kim J.S., Kang H.** (2005) Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **42**: 890-900
- Knight H., Trewavas A.J., Knight M.R.** (1997) Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant Journal* **12**: 1067-1078
- Krishnamurthy R., Bhagwat K.A.** (1989) Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars. *Plant Physiology* **91**: 500-504
- Kumar A., Altabella T., Taylor M., Tiburcio A.F.** (1997) Recent advances in polyamine research. *Trends in Plant Science* **2**: 124-130
- Kumria R., Rajam M.V.** (2002) Ornithine decarboxylase transgene in tobacco affects polyamines, *in vitro* morphogenesis and response to salt stress. *Journal of Plant Physiology* **159**: 983-990
- Kusano K., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y.** (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* **228**: 367-381
- Kusano T, Yamaguchi K, Berberich T, Takahashi Y** (2007) The polyamine spermine rescues *Arabidopsis* from salinity and drought stresses. *Plant Signaling & Behavior* **2**: 250-251
- Kwak K.J., Kim Y.O., Kang H.** (2005) Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress. *Journal of Experimental Botany* **56**: 3007-16
- Lane A., Jarvis A.** (2007) Changes in Climate will modify the Geography of Crop Suitability: Agricultural Biodiversity can help with Adaptation. *eJournal* **4**: 1-12
- Lee T.M.** (1997) Polyamine regulation of growth and chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) roots cultured in vitro. *Plant Science (Limerick)* **122**: 111-117

- Legocka J., Zaichert J.** (1999) Role of Spermidine in the Stabilization of apoprotein of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex of photosystem II during leaf senescence process. *Acta Physiologiae Plantarum* **21**: 127-137
- Li G., Chang H., Li B., Zhou W., Sun D., Zhou R.** (2007) The roles of the atDjA2 and atDjA3 molecular chaperone proteins in improving thermotolerance of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Science* **173**: 408-416
- Li Z.Y., Chen S.Y.** (2000) Differential accumulation of the S-adenosylmethionine decarboxylase transcript in rice seedlings in response to salt and drought stresses *Theoretical and Applied Genetics* **100**: 782-788
- Lichtenthaler H.K., Buschmann C., Rinderle U., Schmuck G.** (1996) Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. *Radiation and Environmental Biophysics* **25**: 297-308
- 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. *Journal of Integrative Plant Biology (Formerly Acta Botanica Sinica)* **47**: 1326-1334
- Liu J.H., Moriguchi T.** (2007) Changes in free polyamines and gene expression during peach flower development. *Biologia Plantarum* **51**: 530-532
- Liu J., Zhu J.K.** (1997) An *Arabidopsis* mutant with increased calcium requirement for potassium nutrition and salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**: 14960-14964
- Liu K., Fu H.H., Bei Q.X., Luan, S.** (2000) Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiology* **124**: 1315-1325
- Ludevid M.D., Freire M.A., Gomez J., Burd C.G., Albericio E., Giralt E., Dreyfuss G., Pages M.** (1992) RNA binding characteristics of a 16-kDa glycine-rich protein from maize. *The Plant Journal* **2**: 999-1003
- Maas E.V., Hoffman G.J.** (1977) Crop salt tolerance. Current assessment. *Journal of Irrigation and Drainage*. **103**: 115-134

- Magné C., Larher F.** (1992) High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Analytical Biochemistry* **200**: 115-118
- Maiale S., Sánchez D.H., Guirado A., Vidal A., Ruiz O.A.** (2004) Spermine accumulation under salt stress. *Journal of Plant Physiology* **161**: 35-42
- Malmberg R.L., Watson M.B., Galloway G.L., Yu W.** (1998) Molecular genetic analyses of plant polyamines. *Critical Reviews in Plant Sciences* **17**: 199-224
- Mansour M.M.F.** (2000) Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biologia Plantarum* **43**: 491-500
- Marcé M., Brown D.S., Capell T., Figueras X., Tiburcio A.F.** (1995) Rapid high performance liquid chromatographic method for the quantification of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *Journal of Chromatography B* **666**: 329-335
- Mayfield J.A., Preuss D.** (2000). Rapid initiation of *Arabidopsis* pollination requires the oleosin-domain protein GRP17. *Nature Cell Biology* **2**: 128-130
- Meinke D., Cherry J., Dean C., Rounsley S., Koornneef M.** (1998) *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* **282**: 662-682
- Miernyk J.A.** (2001) The J-domain proteins of *Arabidopsis thaliana*: an unexpectedly large and diverse family of chaperones. *Cell Stress & Chaperones* **6**: 209-218
- Mo H., Pua E.C.** (2002) Up-regulation of arginine decarboxylase gene expression and accumulation of polyamines in mustard (*Brassica juncea*) in response to stress. *Physiologia Plantarum* **114**: 439-449
- Moreno N., Bougourd S., Haseloff J., Fiejo J.A.** (2006) Chapter 44: Imaging Plant Cells. In: *Handbook of Biological Confocal Microscopy - 3rd edition* pp 769-787 Pawley JB (Editor). Springer Science+Business Media, New York.
- Muchitch M.J., Edwards L.A., Fletcher J.S.** (1983) Influence of diamines and polyamines on the senescence of plant suspension cultures. *Plant Cell Reports* **2**: 82-84

- Mudgett M.B., Clarke S.** (1994) Hormonal and environmental responsiveness of a developmentally regulated protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in wheat. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 25605-25612
- Munns R** (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* **25**: 239-250
- Munns R.** (2005) Genes and salt tolerance: ringing them together. *New Phytologist* **167**: 645-660
- Murty K.S., Smith T.A., Rould C.** (1971) The relation between the putrescine content and potassium status of black currant leaves. *Annals of Botany* **35**: 687-695
- Noctor G., Foyer C.** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* **49**: 249-279
- Orcutt D.M., Nilsen E.T.** (2000) The physiology of plants under stress soil and biotic factors. 684 pp. New York: John Wiley & Sons.
- Pang X.M., Zhang Z.Y., Wen X.P., Ban Y., Moriguchi T.** (2007) Polyamines, all-purpose players in response to environment stresses in plants. *Plant Stress* **1**: 173-188
- Park A.R., Cho S., Yun U., Jin M., Lee S., Sachetto-Martins G., Park O.** (2001) Interaction of the *Arabidopsis* receptor protein kinase wak1 with a glycine-rich protein, AtGRP-3. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 26688-93
- Perez-Amador M.A., Leon J., Green P., Carbonell J.** (2002) Induction of arginine decarboxylase ADC2 gene provides evidence for the involvement of polyamines in the wound response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **130**: 1454-1463
- Qin X., Zeevaart J.A.** (2002) Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiology* **128**: 544-551
- Roberts D.R., Dumdroff E.B., Thompson J.E.** (1986) Exogenous polyamines alter membrane fluidity in bean leaves: A basis for a potential misinterpretation of their true physiological role. *Planta* **167**: 395-401

- Rodríguez-Kessler M., Alpuche-Solís A., Ruiz O., Jiménez-Bremont J.F.** (2006) Effect of salt stress on the regulation of maize (*Zea mays* L.) genes involved in polyamine biosynthesis. *Plant Growth Regulation* **48**: 175-185
- Rosales Serna R., Kohashi-Shibata J., Acosta-Gallegos J.A., Trejo-Lopez C., Ortiz-Cereceres J., Kelly J.D.** (2004) Biomass distribution, maturity acceleration and yield in drought stressed common bean cultivars. *Field Crops Research* **85**: 203-211
- Roy M., Wu R.** (2001) Arginine decarboxylase transgene expression and analysis of environmental stress tolerance in transgenic rice. *Plant Science* **160**: 869-875
- Roy M., Wu R.** (2002) Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. *Plant Science* **163**: 987-992
- Sachetto-Martins G., Franco L.O., Oliveira D.** (2000) Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif?. *Biochimica et Biophysica Acta* **1492**: 1-14
- SAGAR** (Secretariat of Agriculture) (2000) Actual situation and perspective of bean production in Mexico: 1990-2000, CEA-SAGAR
- Sairam R.K., Tyagi A.** (2004) Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science* **86**: 407-421
- Sánchez D.H., Cuevas J.C., Chiesa M.A., Ruiz O.A.** (2005) Free spermidine and spermine content in *Lotus glaber* under long-term salt stress. *Plant Science* **168**: 541-546
- Santa-Cruz A., Acosta M., Pérez-Alfocea F., Bolarin M.C.** (1997) Changes in free polyamine levels induced by salt stress in leaves of cultivated and wild tomato species. *Physiologia Plantarum* **101**: 341-346
- Saunders F.R., Wallace H.M.** (2007) Polyamine metabolism and cancer prevention. *Biochemical Society Transactions* **35**: 364-368
- Schobert B., Tschesche H.** (1978) Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **541**: 270-277

- Seiler N., Raul F.** (2005) Polyamines and apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **9**: 623-642
- Seiler N., Raul F.** (2007) Polyamines and the intestinal tract. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **44**: 365-411
- Seki M., Umezawa T., Kim J-M., Matsui A., To T.K., Shinozaki K.** (2007) Transcriptome analysis of plant drought and salt stress response. M.A. Jenks et al. (eds.) Springer, *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*, 261-283
- Seo M., Koshiba T.** (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* **7**: 41-48
- Serraj R., Sinclair T.R.** (2002) Osmolyte accumulation: can it really help increase crop under drought conditions? *Plant Cell Environment* **25**: 333-341
- Shabala S., Cuin T.A., Pottosin I.** (2007) Polyamines prevent NaCl-induced K⁺ efflux from pea mesophyll by blocking non-selective cation channels. *FEBS Letters* **581**:1993-1999
- Shaw S.** (2006) Imaging the live plant cell. *The Plant Journal* **45**: 573-598
- Sheldon A., Menzies N.W., So H.B., Dalal R.C.** (2004) The effect of salinity on plant available water. In 'Proceedings for the Super Soil 2004 conference, The University of Sydney'
- Shen Q., Ho T.H.D.** (1997) Promoter switches specific for abscisic acid (ABA)-induced gene expression in cereals. *Physiologia Plantarum* **101**: 653-664
- Shevyakova N.I., Shorina M.V., Rakitin V.Y., Stetsenko L.A., Kuznetsov V.I.V.** (2004) Ethylene-induced production of cadaverine is mediated by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Doklady Biological Sciences* **395**: 127-129
- Shi H., Quintero F.J., Pardo J.M., Zhu J.K.** (2002) The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell* **14**: 465-477
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki Y.** (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology* **115**: 327-334

- Showalter A. M.** (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* **5**: 9-23
- Simiroff N., Cumbes Q.J.** (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**: 1057-1060
- Singh T.N., Aspinall D., Paleg L.G., Boggess S.F.** (1973) Stress metabolism. II. Changes in proline concentration in excised plant tissues. *Australian Journal of Biological Sciences* **26**: 57-63
- Slafer G.A., Araus J.L., Richards R.A.** (1999) Physiological traits to increase the yield potential of wheat. In: *Wheat: Ecology and Physiology of Yield Determination*. pp. 379–415. Satorre E. H., and Slafer G. A. Eds, Food Product Press, New York
- Smith T.A.** (1985) Polyamines. *Annual Review of Plant Physiology* **36**: 117-143
- Steinert P.M., Mack J.W., Korge B.P., Gan S.Q., Haynes S.R., Steven A.C.** (1991) Glycine loops in proteins: their occurrence in certain intermediate filament chains, loricroins and single-stranded RNA binding proteins. *International Journal of Biological Macromolecules* **13**: 130-139
- Swire-Clark G.A., Marcotte R.W.** (1999) The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Sacharomyces cerevisiae*. *Plant Molecular Biology* **39**: 117-128
- Tabor C.W., Tabor H.** (1984) Polyamines. *Annual Review of Biochemistry* **53**: 749-790
- Tachimoto M., Fukutomi M., Matsushiro H., Kobayashi M., Takahashi E.** (1992) Role of putrescine in *Lemna* plants under potassium deficiency. *Soil Science & Plant Nutrition* **38**: 307-313
- Tanwar B.S.** (2003) Saline water management for irrigation. International Commission on irrigation and drainage. New Delhi, India. 140 p.
- Tardieu F., Davies W.J.** (1992) Stomatal response to abscisic acid is a function of current plant water status. *Plant Physiology* **98**: 540-545
- Terán H., Singh S.P.** (2002) Comparison of sources and lines selected for drought resistance in common bean. *Crop Science* **42**: 64-70

- Tester M., Davenport R.** (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* **91**: 503-527
- The Arabidopsis Information Resource (TAIR):** TAIR9 Genome release, on http://arabidopsis.org/doc/news/breaking_news/140, June 19, 2009
- Thomas T., Thomas T.J.** (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cellular and Molecular Life Science* **58**: 244-258
- Thomas T., Thomas T.J.** (2003) Polyamine metabolism and cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **7**: 113-126
- Tiburcio A.F., Besford R.T., Capell T., Borrell A., Testillano P.S., Risueno M.C.** (1994) Mechanism of polyamine action during senescence responses induced by osmotic stress. *Journal of Experimental Botany* **45**: 1789-1800
- Tiburcio A.F., Kaur-Sawhney R., Galston A.W.** (1990) Polyamine metabolism. In: *The Biochemistry of Plants*. pp. 283-325 Miflin B.J., Lea P.J. Eds., Academic Press, San Diego, CA
- Umekage S., Ueda T.** (2006) Spermidine inhibits transient and stable ribosome subunit dissociation. *FEBS Letters* **580**: 1222-1226
- Urano K., Hobo T., Shinozaki K.** (2005) *Arabidopsis* ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *FEBS Letters* **579**: 1557-1564
- Urano K., Yoshiba Y., Nanjo T., Igarashi Y., Seki M., Sekiguchi F., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** (2003) Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant Cell Environment* **26**: 1917-1926
- USDA, ARS, National Genetic Resources Program** (2010) Germoplasm Resources Information Network (GRIN), National Germoplasm Resources Laboratory, Beltsville Maryland. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?3769>
- Varner J.E., Cassab G.I.** (1986) Molecular biology: A new protein in petunia. *Nature* **323**: 110

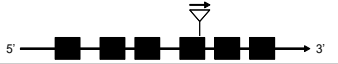











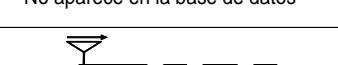
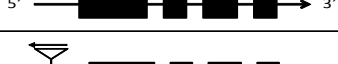
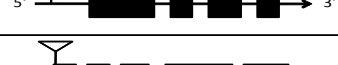
- Velasco R., Salamini F., Bartels D.** (1994) Dehydration and ABA increase mRNA levels and enzyme activity of cytosolic GAPDH in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular Biology* **26**: 541-546
- Venkamp J.H., Lampe J.E.M., Koot J.T.M.** (1989) Organic acids as sources of drought induced proline synthesis in field bean plants, *Vicia faba* L. *Journal of Plant Physiology* **133**: 654-659
- Verslues P.E., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J., Zhu J.K.** (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal* **45**: 523-539
- Vierling E.** (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 579-620
- Vinebrooke R.D., Cottingham K., Norberg J., Scheffer M., Dodson S., Maberly S., Sommer U.** (2004) Impacts of multiple stressors on biodiversity and ecosystem functioning: the role of species co-tolerance. *OIKOS* **104**: 451-457
- Waie B., Rajam M.V.** (2003) Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine gene. *Plant Science* **164**: 727-734
- Walden R., Cordeiro A., Tiburcio A.F.** (1997) Polyamines: small molecules triggering pathways in growth and development. *Plant Physiology* **113**: 1009-1013
- Walsh P., Bursac D., Law Y.C., Cyr D., Lithgow T.** (2004) The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Journal* **5**: 567-571
- Walters D.R.** (2003a) Resistance to plant pathogens: possible roles for free polyamines and polyamine catabolism. *New Phytologist* **159**: 109-115
- Walters D.R.** (2003b) Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* **64**: 97-107
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A.** (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* **9**: 244-252

- Wang X., Ikeguchi Y., McCloskey D.E., Nelson P., Pegg A.E.** (2004) Spermine synthesis is required for normal viability, growth, and fertility in the mouse. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 51370-51375
- Wang Z.Q., Yuan Y.Z., Ou J.Q., Lin Q.H., Zhang C.F.** (2007) Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. *Journal of Plant Physiology* **164**: 695-701
- Waters E., Lee J., Vierling E.** (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* **47**: 325-338
- Welin B.V., Olson A., Nylander M., Palva E.T.** (1994) Characterization and differential expression of dhn/lea/rab-like genes during cold acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **26**: 131-144
- Wen X.P., Pang X.M., Matsuda N., Kita M., Inoue H., Hao Y.J., Honda C., Moriguchi T.** (2007) Over-expression of the apple spermidine synthase gene in pear confers multiple abiotic stress tolerance by altering polyamine titers. *Transgenic Research* **17**: 251-263
- Wi S.J., Kim W.T., Park K.Y.** (2006) Overexpression of carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stress in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Reports* **25**: 1111-1121
- Wortham B.W., Patel C.N., Oliveira M.A.** (2007) Polyamines in bacteria: pleiotropic effects yet specific mechanisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **603**: 106-115
- Xu D., Duan X., Wang B., Hong B., Ho T-HD, Wu R.** (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley conferred tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology* **110**: 249-257
- Yamaguchi K., Takahashi Y., Berberich T., Imai A., Miyazaki A., Takahashi T., Michael A., Kusano T.** (2006) The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **580**: 6783-6788

- Yamaguchi K., Takahashi Y., Berberich T., Imai A., Takahashi T., Michael A.J., Kusano Y.** (2007) A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **352**: 486-490
- Yan W., Craig E.A.** (1999) The Glycine-Phenylalanine-Rich Region Determines the Specificity of the Yeast Hsp40 Sis1. *Molecular and Cellular Biology* **19**: 7751-7758
- Yang J., Zhang J., Liu K., Wang Z., Liu L.** (2007) Involvement of polyamines in the drought resistance of rice. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1545-1555
- Yokoi S., Ray A. Bressan R.A., Hasegawa P.M.** (2002) Salt Stress Tolerance of Plants *JIRCAS Working Report* 25-33
- 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*. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1525-1529
- Zagolski F., Pinel V., Romier J., Alcayde D., Gastellu-Etchegorry J.P., Giordano G., Marty G., Mougín E., Joffre R.** (1996) Forest canopy chemistry with high spectral resolution remote sensing. *International Journal of Remote Sensing* **17**: 1107-1128
- Zhang W., Sun Y.L., Timofejeva L., Chen C., Grossniklaus U., Ma H.** (2006) Regulation of *Arabidopsis* tapetum development and function by *dysfunctional tapetum (DYT1)* encoding a putative bHLH transcription factor. *Development* **133**: 3085-3095
- Zeevaart J.A., Creelman R.A.** (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**: 439-473
- Zhao K., Fan H., Harris P.** (1995) Effect of exogenous ABA on the salt tolerance of corn seedlings under salt stress. *Acta Botanica Sinica* **37**: 295-300
- Zhu J.K.** (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* **6**: 66-71
- Zhu J.K.** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 247-273

9. APENDICE

1. Posición de las inserciones en cada gen de interés de *Arabidopsis thaliana* en las líneas mutantes

Gen	No. Acceso	Línea	Posición de la inserción
ATJ3 (Homólogo a la DNAJ3 de <i>Medicago</i>)	At3g44110	Salk_132923	
		Salk_141625	
Transportador de oligopéptidos dependiente de protones (POT)	At1g72120	Salk_044047	
		Salk_141969	
ATPasa vacuolar, subunidad E1	At4g11150	Salk_003830 HM	
		Salk_006180	
Ribonucleoproteína de cloroplasto de 31 KDa	At5g50250	Salk_051237 HM	
		WiscdsLox383H9	
Factor eucariótico 5A de inicio de la traducción	At1g69410	Salk_059807C HM	
		Salk_022515C	
Caseína cinasa II, cadena α	At2g23070	Salk_022432 HM	
MTN3	At5g23660	Salk_077789 HM	
		SAIL_234_H03	No aparece en la base de datos
MTN19	At5g61820	Salk_034861	
		Salk_078266	
Proteína rica en glicina	At4g37900	SAIL_303_G11	
		SAIL_387_D04	