

T 4 45

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha 01.05.03  
ENTRADA NUM. 18221

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**Fotosistema II e infección viral:  
Análisis de fluorescencia de imagen y  
regulación de la biosíntesis de las  
proteínas OEC durante la patógenesis.**

LIBRO DE BIBLIOTECA  
613584315  
L15601730

**M<sup>a</sup> LUISA PÉREZ BUENO**

TESIS DOCTORAL

GRANADA, 2003

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
02 MAY 2003  
COMISION DE DOCTORADO

Abreviaturas	11
Resumen (Summary)	13
A.- Introducción	17
A.1.- La cadena de transporte electrónico fotosintética	19
A.2.- El fotosistema II	21
A.2.1.- Función del fotosistema II	21
A.2.2.- Subunidades constituyentes del PSII	23
A.2.3.- El complejo de oxidación/fotólisis del agua (OEC)	29
A.2.3.1.- La subunidad PsbO del OEC	30
A.2.3.2.- La subunidad PsbP del OEC	35
A.2.3.3.- La subunidad PsbQ del OEC	36
A.2.4.- Estructura del PSII	38
A.2.5.- Transporte de las proteínas cloroplastídicas de codificación nuclear	40
A.3.- Tobamovirus	44
A.3.1.- PMMoV. Organización genética y ciclo de infección viral	44
A.3.2. Ciclo de infección viral	48
A.4.- Efecto de la infección viral en la fotosíntesis	50
A.5.- Estudio de factores de estrés en fotosíntesis mediante técnicas de imagen	56
A.5.1.- Principios de fluorescencia. Fluorescencia y estrés	56
A.5.2.- La fluorescencia de imagen (FI) como método de detección de estrés temprano. "Ver es creer"	59
A.5.2.1.- Fluorescencia de la clorofila	61
A.5.2.2.- Fluorescencia multiespectral	67
B.- Objetivos	71
C.- Material y Métodos	75
C.1.- Material biológico. Hospedador experimental y virus.	77
C.2.- Preparación de muestras en electroforesis	79
C.2.1.- Preparación de fracciones cloroplastídicas	79
C.2.1.1.- Obtención de membranas tilacoidales	79
C.2.1.2.- Obtención de preparaciones enriquecidas en PSII	79



C.2.1.3.- Método de eliminación selectiva de polipéptidos	
OEC de preparaciones de PSII	80
C.2.1.4.- Determinación de clorofila	80
C.2.2.- Extracto total de hoja	80
C.3.- Análisis electroforético de proteínas	80
C.3.1.- Análisis electroforético monodimensional	81
C.3.2.- Análisis electroforético bidimensional	81
C.3.2.1.- Preparación de la muestra	82
C.3.2.2.- Primera dimensión (IEF)	83
C.3.2.3.- Segunda dimensión	83
C.3.3.- Detección de proteínas por tinción de plata	84
C.3.4.- Transferencia electroforética de proteínas a membrana	
de nitrocelulosa (western blotting). Inmunorrevelado	84
C.3.5.- Secuenciación del extremo N-terminal de proteínas	85
C.4.- Impronta de hojas	85
C.5.- Electroelución de proteínas	86
C.6.- Obtención de anticuerpos policlonales	87
C.7.- Clonación de secuencias de cDNA	87
C.7.1.- Oligonucleótidos utilizados	87
C.7.2.- Manipulación de E. Coli	88
C.7.2.1.- Medios de cultivo, mantenimiento y crecimiento	88
C.7.2.2.- Obtención de bacterias competentes y	
transformación	88
C.7.3.- Preparación y análisis de ácidos nucleicos	89
C.7.3.1.- Purificación de DNA plasmídico	89
C.7.3.2.- Purificación de DNA genómico de planta	89
C.7.3.3.- Extracción de RNA total de plantas	90
C.7.3.4.- Análisis electroforético de DNA	91
C.7.3.5.- Purificación de DNA de geles de azarosa	91
C.7.3.6.- Cuantificación de ácidos nucleicos	91
C.7.3.7.- Tratamiento enzimático del DNA	92
C.7.3.8.- Amplificación de DNA mediante PCR	92
C.7.3.9.- Clonación de DNA obtenido por PCR	93

C.7.3.10.- Selección y análisis de clones recombinantes	93
C.7.3.11.- Detección de secuencias de DNA por hibridación (Análisis de Southern)	94
C.7.3.12.- Detección de secuencias de RNA por hibridación (Análisis de Northern)	95
C.7.3.13.- Sondas utilizadas	96
C.7.3.14.- Determinación de las secuencias nucleotídicas	97
C.7.3.15.- Análisis de las secuencias	97
C.8.- Técnicas de imagen	97
C.8.1.- FI	97
C.8.1.1.- Aparato de medida de la FI	97
C.8.1.2.- Procesamiento de datos de FI	99
C.8.1.3.- Protocolo de medida	100
C.8.2.- Microscopía electrónica	103
D.- Resultados	105
D.1.- Sintomatología	107
D.2.- Determinación de la secuencia aminoacídica de la región N- terminal de las isoformas minoritarias de PsbP	110
D.3.- Clonación de los genes que codifican las proteínas constituyentes del OEC. Análisis de sus secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas	113
D.3.1.- Clonación de <i>psbO</i> . Análisis de las secuencias de cDNA y aminoacídicas deducidas	113
D.3.1.1.- Estrategia de clonación de los cDNAs correspondientes a <i>psbO</i>	113
D.3.1.2.- Análisis de las secuencias nucleotídicas de los distintos cDNAs de <i>psbO</i>	115
D.3.1.3.- Análisis de las secuencias aminoacídicas deducidas de los distintos cDNAs de <i>psbO</i>	121
D.3.2.- Clonación de <i>psbP</i> . Análisis de las secuencias de cDNA y aminoacídicas deducidas	125
D.3.2.1.- Estrategia de clonación de los cDNAs correspondientes a <i>psbP</i>	125

D.3.2.2.- Análisis de las secuencias nucleotídicas de los distintos cDNAs de <i>psbP</i>	130
D.3.2.3.- Análisis de las secuencias aminoacídicas deducidas de los distintos cDNAs de <i>psbP</i>	134
D.3.3.- Clonación de <i>psbQ</i> . Análisis de las secuencias de cDNA y aminoacídicas deducidas	140
D.3.3.1.- Estrategia de clonación de los cDNAs correspondientes a <i>psbQ</i>	140
D.3.3.2.- Análisis de las secuencias nucleotídicas de los distintos cDNAs de <i>psbQ</i>	142
D.3.3.3.- Análisis de las secuencias aminoacídicas deducidas de los distintos cDNAs de <i>psbQ</i>	144
D.4.- Análisis genómico por southern blot de los genes <i>psbO</i> , <i>psbP</i> y <i>psbQ</i> de <i>N. benthamiana</i>	146
D.5.- Análisis del efecto de la infección viral sobre la expresión génica del huésped	148
D.5.1.- Análisis de la expresión de los genes <i>psbO</i> , <i>psbP</i> y <i>psbQ</i>	149
D.5.2.- Análisis de la expresión de otros genes nucleares y cloroplastídicos	151
D.5.3.- Análisis de la acumulación y de la distribución viral	155
D.6.- Estudio de la infección viral mediante técnicas de imagen	156
D.6.1.- Análisis por FI de la interacción PMMoV-I y <i>Nicotiana benthamiana</i>	156
D.6.1.1.- Análisis por FI de las hojas AS	157
D.6.1.1.1.- Análisis del NPQ	157
D.6.1.1.2.- Análisis del rendimiento cuántico del PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ )	162
D.6.1.2.- Análisis por fluorescencia de imagen de las hojas S	165
D.6.1.2.1.- Análisis del quenching no fotoquímico (NPQ)	165
D.6.1.2.2.- Análisis del rendimiento cuántico del PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ )	168
D.6.3.- Efectos de la infección viral en la ultraestructura del cloroplasto	169

D.6.3.1.- Hojas asintomáticas	172
D.6.3.2.- Hojas sintomáticas	173
E.- Discusión	185
F.- Conclusiones (Concluding remarks)	205
G.- Bibliografía	210

## ABREVIATURAS

AS	asintomática
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BSA	albúmina sérica bovina
CC	core complex del PSII
CAB	proteína de unión a clorofila (chlorophyll a-b binding protein)
CHAPS	3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propano-sulfonato
Chl	clorofila
CP	proteína de la cápsida viral (capsid protein)
CR	centro de reacción del PSII
Cyt	citocromo
DMF	dimetilformamida
d.p.i.	días post-inoculación
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FI	fluorescencia de imagen
Gox	glicolato oxidasa
LHCII	complejo mayor de antena del PSII (light harvesting complex II)
MES	ácido 4-morfolinoetanosulfónico
MET	microscopía electrónica de transmisión
MSP	proteína estabilizadora de iones de manganeso (manganese stabilizing protein), PsbO.
NBT	nitro blue tetrazolium
NP-40	nonilfenoxipolietoxietanol
NPQ	quenching no fotoquímico (non-photochemical quenching)
OEC	complejo de lisis del agua (oxygen evolving complex)
ORF	marco abierto de lectura (open reading frame)
Pheo	feofitina

PMMoV	virus del moteado suave del pimiento (pepper mild mottle virus)
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSA	persulfato amónico
PSI	fotosistema I
PSII	fotosistema II
PVDF	difluoruro de polivinilideno
RbcL	subunidad grande de la RuBisCO
RbcS	subunidad pequeña de la RuBisCO
Rca	RuBisCO activasa
ROS	especies reactivas del oxígeno (reactive oxygen species)
S	sintomática
SDS	dodecilsulfato sódico
SPP	proteasa estromática de procesamiento (stromal processing peptidase)
STD	dominio para el transporte a estroma (stromal targeting domain)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tic	translocón de la membrana interna del cloroplasto (translocon at inner membrane)
Toc	translocón de la membrana externa del cloroplasto (translocon at outer membrane)
TPP	proteasa tilacoidal de procesamiento (thylakoid processing peptidase)
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
TTD	dominio para el transporte a tilacoide (thylakoid targeting domain)
TWEEN 20	polioxietilensorbitano

~ RESUMEN (SUMMARY) ~

En trabajos previos al presente habíamos demostrado que la infección por tobamovirus induce una inhibición del fotosistema II (PSII), localizada en el complejo de oxidación/fotólisis del agua (OEC). En plantas infectadas disminuían los niveles de las proteínas constituyentes del OEC. Por ello, en esta Tesis Doctoral nos planteamos en primer lugar, la clonación de los genes *psbO*, *psbP* y *PsbQ* que codifican las tres subunidades proteicas del OEC, para posteriormente caracterizar las proteínas correspondientes. Las proteínas OEC de *Nicotiana benthamiana* resultaron ser familias proteicas, codificadas por familias multigénicas.

En segundo lugar, investigamos si la caída en los niveles de proteínas OEC durante la infección viral, tiene su origen en problemas en la transcripción o en procesos posteriores. Para ello llevamos a cabo estudios de la expresión génica de las proteínas OEC durante la patogénesis, mediante la determinación por Northern blott de sus correspondientes mRNA. Comprobamos que, en la mayoría de los casos, los niveles de mRNA son paralelos a los de la proteína correspondiente. Ello indica fallos en la transcripción, atribuibles a la presencia viral.

Las técnicas de imagen han sido de gran utilidad en nuestro estudio para, en último lugar, realizar un seguimiento de la infección viral y de los mecanismos de defensa que el cloroplasto desarrolla durante ésta. Las técnicas de fluorescencia de imagen (FI) han revelado una heterogeneidad con un patrón muy definido de la eficiencia fotosintética en la hoja asintomática infectada. El patrón de NPQ, que mide la energía disipada y no utilizada en fotosíntesis, muestra que estos procesos son más intensos en las zonas de expansión del virus.

Los estudios por microscopía electrónica de transmisión de la ultraestructura de cloroplastos de hojas de plantas infectadas, muestran cambios asociados normalmente a situaciones de estrés vegetal: presencia de numerosos granos de almidón, de plastoglobulos y desorganización de la estructura de los *grana*.

El sistema huésped patógeno utilizado en estos estudios ha sido *Nicotiana benthamiana* infectada por las cepas españolas e italiana del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV-S, PMMoV-I).



We have previously shown that tobamovirus infection induce an inhibition of PSII electron transport, disturbing the oxygen-evolving complex (OEC). In the infected plants, the OEC polypeptide pattern was modified when compared to healthy plants, being the levels of the 33, 24 and 16 kDa extrinsic proteins lowered to differing extent.

In the present work, we have cloned the genes *psbO*, *psbP* y *PsbQ* encoding the three OEC subunits in *Nicotiana benthamiana*. We have also characterized the corresponding proteins. They are protein families codifying by multigene families.

In addition, we have further investigated the gene expression pattern of the OEC proteins at different post-infection times in order to determine whether their reduced accumulation levels are associated to transcriptional and/or post-transcriptional processes. Northern blot analysis of total RNA from *N. benthamiana*-infected plants showed that the viral infection is associated to a reduction of the OEC proteins-encoding mRNAs, at both the early and acute phases of the infection. However, during the recovery phase of the infection, an increase in the OEC proteins-encoding mRNAs was observed. Thus, the accumulation level of the OEC-mRNAs parallel those of their encoded proteins. The data are indicative that during the pathogenesis the OEC protein accumulation is regulated at the transcriptional level.

Finally, we have followed up the infection process by red-fluorescence imaging to analyze the quantum yield of PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) and the non-photochemical quenching (NPQ), related to energy dissipation. Chlorophyll fluorescence imaging reveals a complex, time-varying spatial pattern of the photosynthetic efficiency and NPQ processes in asymptomatic leaves from virus-infected plants.

The electron microscopy pictures of the chloroplast from virus-infected leaves show typical stress-induced changes on the chloroplast ultrastructure: numerous starch grains and plastoglobuli, as well as alterations in the grana *stacking* and chloroplast shape.

The host pathogen system in our studies was *Nicotiana benthamiana* infected with the Spanish and Italian strains of the pepper mild mottle virus (PMMoV-S, PMMoV-I).

*~ INTRODUCCIÓN ~*

### **A.1.- La cadena de transporte electrónico fotosintética**

En plantas superiores, cianobacterias y algunas algas el transporte electrónico fotosintético ocurre gracias a la intervención de tres complejos denominados fotosistemas I y II (PSI y PSII, respectivamente) y el citocromo  $b_6/f$ . Este proceso está acoplado con la síntesis de ATP dirigida por la ATP-sintasa. El donador de electrones de la cadena de transporte es la molécula de agua, que se oxida produciendo oxígeno molecular y el aceptor final es el NADP, que se reduce a NADPH (fig. 1). Las reacciones redox intermedias se muestran de forma más detallada en el conocido esquema en Z, propuesto originalmente por Hill y Bendall (1960) (fig. 2).

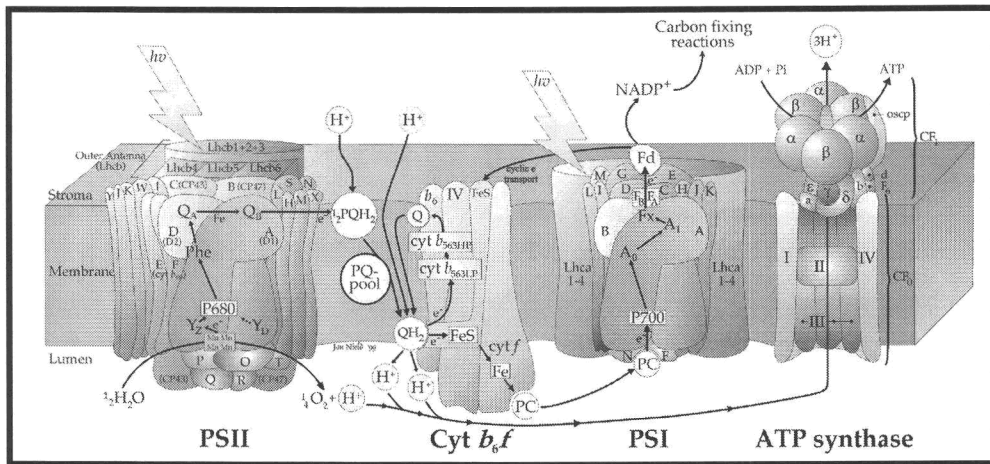


Fig. 1.- Complejos constituyentes de la cadena de transporte electrónico fotosintética.. De J. Barber ([www.bio.ic.ac.uk/research/barber/index.html](http://www.bio.ic.ac.uk/research/barber/index.html))

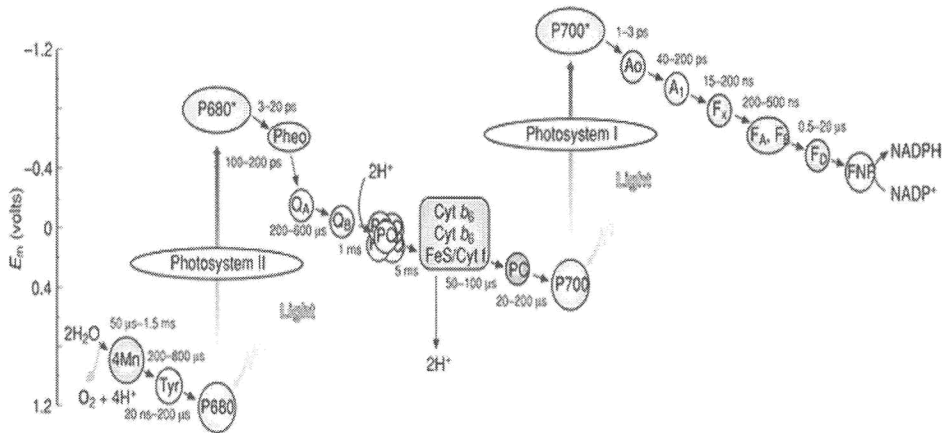


Fig. 2.- Esquema en Z de la cadena de transporte electrónico fotosintética (según Whitmarsh y Govindjee, [www.leafgreentech.cz/workshop/index.html](http://www.leafgreentech.cz/workshop/index.html))

Los cuatro complejos fotosintéticos se encuentran distribuidos de forma heterogénea en la membrana del tilacoide (Andersson y Franjen, 1992; Albertsson, 1995), como se ilustra en la fig. 3. En el interior de las membranas de los *grana* no expuestas al estroma, predomina el PSII $\alpha$  mientras que las zonas de los *grana* expuestas al estroma y en las lamelas estromáticas están enriquecidas en complejos

PSII $\beta$ , PSI y ATPasa. El cyt *b<sub>f</sub>* se encuentra en ambas regiones de la membrana en la misma proporción. En el PSII se distinguen dos subpoblaciones, PSII $\alpha$  y PSII $\beta$  (Melis, 1976). Ambos difieren en el tamaño de antena. El primero de ellos es el principalmente activo en el transporte fotosintético lineal y el PSII $\beta$  parece estar implicado en vías de transporte alternativas, ser un estado intermedio de ensamblaje del PSII o bien un mecanismo de acumulación de centros de reacción de PSII a modo de reserva (van Wijk y col., 1993).

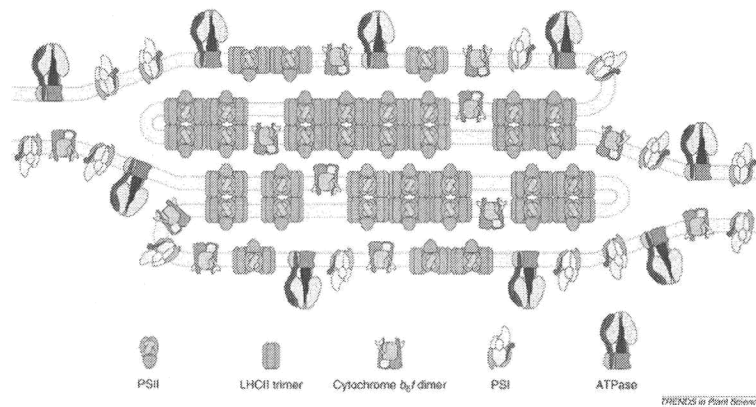
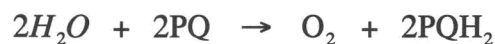


Fig.3.- Organización de los complejos fotosintéticos en la membrana tilacoidal (Allen y Forsberg, 2001).

## A.2.- El fotosistema II

### A.2.1.- Función del fotosistema II

La función del PSII puede denominarse H<sub>2</sub>O-PQ oxidorreductasa y, de forma resumida, cataliza la reacción siguiente:



Los complejos antena del PSII absorben la energía lumínica gracias a la presencia de un gran número de moléculas de Chl a y b, unas 250 por centro de reacción de PSII, y carotenoides ( $\beta$ -caroteno, luteína, neoxantina y violaxantina) asociados a sus proteínas constituyentes. La luz se transforma en energía de

excitación, que se transfiere desde las antenas del complejo a su centro de reacción, P680, considerado en plantas un tetrámero de Chls con un máximo de absorbancia a esa  $\lambda$  (Barber, 2002b). En su estado excitado  $P680^*$ , dona un electrón a la feofitina (Pheo), formándose el par  $P680^+ Pheo^-$ .  $P680^+$  acepta, tras cada separación de cargas consumada, un electrón de un residuo de la proteína D1 del CR y queda reducido a P680. Nuevos fotones absorbidos por el PSII permiten repetir esta secuencia de reacciones y la extracción secuencial de electrones desde D1-Tyr161. Ésta a su vez los acepta en cada caso del  $H_2O$  vía el complejo de iones Mn (Barber, 2002b). Éste está constituido por cuatro átomos que forman un complejo con las cadenas laterales de varios residuos aminoacídicos (Asp170, Ala344, His332 ó Glu333, y posiblemente His337 y Asp189 ó His190) de la proteína D1 del CR (Kamiya y Shen, 2003). Los últimos datos experimentales en cuanto a su estructura, apuntan a que tres de los átomos se sitúan en las esquinas de un triángulo isósceles mientras que el cuarto se halla en el centro (Barber, 2002a).

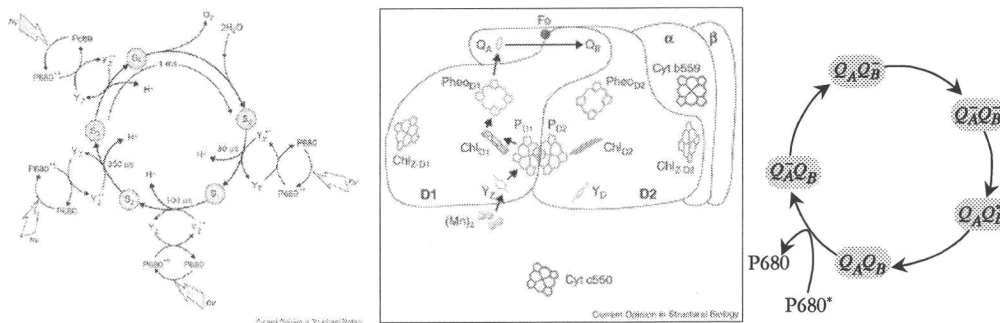


Fig. 4.- Transporte electrónico en PSII. Lado aceptor (ciclo de Kok) y donador de electrones (ciclo de quinonas). Adaptado de Barber (2002a).

Su mecanismo de funcionamiento empezó a conocerse tras las observaciones de Joliot y Joliot (1968) y Kok y col. (1970), que mostraron que el complejo pasaba por un ciclo de 5 estados de oxidación  $S_0-S_4$ . Tras la extracción de cuatro electrones

del H<sub>2</sub>O por este proceso, se libera una molécula de O<sub>2</sub>. El complejo de Mn aparece así como un lugar de almacenamiento de cargas durante el proceso de oxidación/fotólisis del H<sub>2</sub>O (Burda y Schimid, 2001; Kozlov y Klimov, 1998).

En el lado aceptor de electrones del PSII, Pheo los transfiere a una molécula de PQ (Q<sub>A</sub>), estrechamente asociada al CR. Q<sub>A</sub><sup>-</sup> cede su electrón a una segunda quinona móvil Q<sub>B</sub>, situada en el conocido como *lugar Q<sub>B</sub>*, punto de acción de numerosos herbicidas antifotosintéticos (Moreland, 1992). Esta transferencia se ve favorecida por la presencia de un átomo de Fe no hemínico, localizado entre ambas quinonas. Cada quinina asociada con el sitio Q<sub>B</sub> es capaz de aceptar en última instancia dos electrones del H<sub>2</sub>O y dos protones del estroma, antes de liberar a la matriz lipídica de la membrana tilacoidal PQH<sub>2</sub>, doblemente reducida (fig. 4).

#### A.2.2.- Subunidades constituyentes del PSII

El PSII, responsable del desprendimiento de oxígeno fotosintético, está presente en la membrana tilacoidal de los cloroplastos de plantas superiores, algas y cianobacterias (Barber, 2003) (fig. 5). Es un complejo multiproteico con un peso molecular aproximado de 320 kDa (Kamiya y col., 2003) y más de 30 subunidades denominadas, según los genes que las codifican, PsbA - PsbZ y Lhcb1 - Lhcb6 (Barber y col., 1997 y 1999; Rhee, 2001; Heathcote y col., 2002). En la tabla 1 se detallan su peso molecular, el número de hélices transmembrana, función y localización del gen que la codifica en el genoma nuclear (n) o cloroplastídico (c). Se especifica también qué proteínas son características de plantas o cianobacterias.

Funcionalmente, podemos distinguir en el PSII el *core complex* (CC), y los complejos antena. En el CC se incluyen el centro de reacción (CR, reaction center), el complejo de oxidación/fotólisis del agua (OEC, oxygen evolving complex), y una serie de proteínas de bajo peso molecular (Hankamer y col., 2001a).

El CR es la unidad mínima capaz de llevar a cabo la separación de cargas y se constituye de 6 subunidades proteicas (D1, D2, CP43, CP47, Cyt *b559* α y Cyt *b559* β). El heterodímero D1/D2 une todos los cofactores implicados en el transporte electrónico en el PSII. Éstos son, desde el lado donador al aceptor: dos residuos de tirosina denominados Y<sub>Z</sub> y Y<sub>D</sub>, el P680, dos moléculas de clorofila auxiliares, dos de

feofitina *a* (Pheo *a*), dos plastoquinonas ( $Q_A$  y  $Q_B$ ), un átomo de hierro no hemínico y un anión bicarbonato. Además, el CR parece contener dos moléculas de  $\beta$ -caroteno (Rhee, 2001; Telfer y col., 2003). P680 está compuesto en plantas superiores por cuatro moléculas equidistantes de Chl *a* con similares niveles energéticos en el estado singlete y redox, mientras que en cianobacterias se trata de un “par especial” de moléculas (Barber, 2002b; Diner y Rappaport, 2002). D1 y D2 son dos proteínas homólogas codificadas en el genoma del cloroplasto que presentan 5  $\alpha$  hélices transmembranales y conforman el heterodímero del CR relacionados por un pseudo eje de simetría secundario, con una conformación similar al formado por las subunidades L y M del CR de bacterias purpúreas.

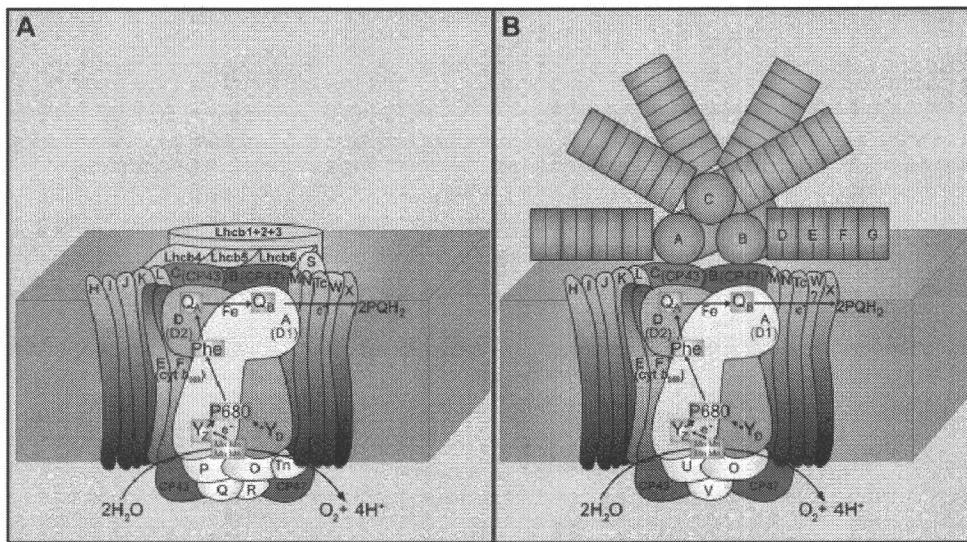


Fig. 5.- Estructura del PSII en plantas (A) y cianobacterias (B). De Hankamer y col. (2001a).

Tabla 1 (en la página siguiente): Subunidades del PSII. Obtenido de Hankamer y col. (2001a y 1997), Rhee (2001), y Wollman y col. (1999). (c) codificación cloroplastídica y (n) codificación nuclear; (\*) exclusivas de plantas superiores y algas verdes; (\*\*) exclusivas de cianobacterias.



Subunidad	Gen	pm (kDa)	Hélices $\alpha$ transmemb.	Función	
D1 / PsbA	<i>psbA</i> (c)	38,8	5	Unión P680 y complejo de Mn	RC
D2 / PsbD	<i>psbD</i> (c)	39,4	5	Unión a P680	
CP43 / PsbC	<i>psbC</i> (c)	56,3	6	Antena interna, unión a chl a	
CP47 / PsbB	<i>psbB</i> (c)	51,8	6	Antena interna, unión a chl a	
Cyt <i>b559</i> $\alpha$ / PsbE	<i>psbE</i> (c)	9,3	1	Ensamblaje D1/D2, fotoprotección	
Cyt <i>b559</i> $\beta$ / PsbF	<i>psbF</i> (c)	4,5	1	Ensamblaje D1/D2, fotoprotección	
33 kDa / PsbO	<i>psbO</i> (n)	27,0	0	Regulación oxidación del agua	OEC
24 kDa / PsbP *	<i>psbP</i> (n)	20,2	0	Regulación oxidación del agua	
16 kDa / PsbQ *	<i>psbQ</i> (n)	16,9	0	Regulación oxidación del agua	
PsbU **	<i>psbU</i> (n)	15,1	0	Regulación oxidación del agua	
Cyt <i>c550</i> / pbsV **	<i>psbV</i> (n)	5,9	1	Regulación oxidación del agua	
PsbH	<i>psbH</i> (c)	7,8	1	Reparación D1, regulación ciclo PQ	Core complex
PsbI	<i>psbI</i> (c)	4,2	1	Desconocida	
PsbJ	<i>psbJ</i> (c)	4,2	1	Ensamblaje LCHII y OEC al CC	
PsbK	<i>psbK</i> (c)	4,3	1	Desconocida	
PsbL	<i>psbL</i> (c)	4,5	1	Ensamblaje CP43 y OEC, Dimerización del PSII	
PsbM	<i>psbM</i> (c)	3,7	1	Desconocida	
PsbN	<i>psbN</i> (c)	4,7	1	Desconocida	
PsbR	<i>psbR</i> (n)	10,2	0	Desconocida	
PsbW*	<i>psbW</i> (n)	6	1	Control dimerización y acumulación PSII	
PbsT <sub>n</sub>	<i>pbsT<sub>n</sub></i> (n)	3	0	Desconocida	
ycf8 / PsbT <sub>c</sub>	<i>psbT</i> (c)	3,8	1	Fotoprotección	
PsbX	<i>psbX</i> (n)	4	1	¿Relación con función de Q <sub>A</sub> y Q <sub>B</sub> ?	
PbsY-A1 y PbsY-A2	<i>pbsY</i> (n)	4 y 1	¿?	¿pertenece a PSII? ¿Unión a Mn?	
PsbZ	<i>psbZ</i> ( )			Regulación transferencia de electrones	
CP24 / Lhcb4	<i>lhcb4</i> (n)	23	3	Unión a pigmentos, absorción de luz	Complejo menor de antena
CP26 / Lhcb5	<i>lhcb5</i> (n)	27	3	Unión a pigmentos, absorción de luz	
CP29 / Lhcb6	<i>lhcb6</i> (n)	28	3	Unión a pigmentos, absorción de luz	
PsbS	<i>psbS</i> (n)	22	4	Regulación localización LHCII	
Lhcb1 / Lhcb I	<i>lhcb1</i> (n)	25	3	Unión a pigmentos, absorción de luz	LHCII
Lhcb2 / Lhcb II	<i>lhcb2</i> (n)	25	3	Unión a pigmentos, absorción de luz	
Lhcb3 / Lhcb III	<i>lhcb3</i> (n)	24	3	Unión a pigmentos, absorción de luz	

Debido a su activa participación en las reacciones redox del PSII, la proteína D1 se ve dañada por la acción de radicales libres y es necesario que su velocidad de reemplazamiento sea muy alta. De hecho, de los aproximadamente 120 genes que posee el genoma cloroplastídico, el *psbA* es el que presenta el transcrito con mayor nivel de traducción. Esta peculiaridad de la proteína D1 trata de evitar el proceso de fotoinhibición y la consiguiente reducción de la eficiencia fotosintética y resulta fundamental dentro de la dinámica del PSII, aspecto que ha generado una abundante literatura en las dos últimas décadas (Baena-González y Aro, 2002; Zhang y Aro, 2002).

CP43 y CP47 son complejos pigmento - proteína que funcionan como las antenas internas del centro de reacción y están relacionadas por el mismo pseudoeje que D1 y D2. CP47 posee 6 hélices  $\alpha$  transmembranales, con los extremos amino y carboxilo expuestos al estroma. Tiene unidas 15 moléculas de Chl *a* y 3  $\beta$ -carotenos (Rhee y col., 1997, 1998). Un gran lazo luminal (V-VI) de unos 200 aa parece estar implicado en la oxidación del agua. Aparte de su función como antena, diversos experimentos de delección del gen *psbB* que la codifica indican su importancia en la función y ensamblaje del PSII (Vermaas y col., 1986 y 1988).

La apoproteína de CP43 es, en muchos sentidos, homóloga a la de CP47, como en el número de hélices transmembrana, el de moléculas de Chls y carotenoides a los que une, y la existencia del gran lazo (150 aa) entre las hélices V y VI (Bricker, 1990). Difiere de su homóloga en que su extremo N-terminal puede ser fosforilado irreversiblemente en plantas superiores y en que su unión al PSII es más débil, pudiendo ser fácilmente eliminada de preparaciones de CR o durante el ciclo de reparación de la D1 en condiciones fotoinhedoras. La delección del gen *psbC* que la codifica o su modificación, tiene menor impacto en la actividad oxigénica y en el ensamblaje del PSII, que en el caso del gen *psbB* (Barber y col., 1997 y 1999; Rhee, 2001).

Los estudios estructurales más recientes ponen de manifiesto que la organización de las hélices transmembrana de las principales subunidades del CR del PSII, D1/D2/CP43/CP47 es muy similar al de las 22 hélices que también suman las proteínas PsaA y PsaB del CR del PSI. Esta similitud es una evidencia del origen evolutivo común de ambos fotosistemas (Hankamer, 2001a).

El cyt  $b_{559}$  posee dos subunidades proteicas, PsbE y PsbF, cada una de ellas con una hélice  $\alpha$  transmembranal que ensambla un grupo hemo. Una de sus peculiaridades es que puede encontrarse en varios estados, que difieren en su potencial redox (Ortega y col., 1998; Roncel y col., 2003). Su función es aún tema de debate y es conocido como el “enigmático cyt  $b_{559}$ ” (Rhee, 2001). La estequiometría en plantas superiores debe ser de 1 cyt/CR, situado en la proximidades de la hélice A de D2. Estudios de *crosslinking* señalan que su grupo hemo debe estar en las proximidades del sitio  $Q_B$  de la D1 (Barbato y col., 1995), lo que estaría de acuerdo con diferentes hipótesis que implican al cyt  $b_{559}$  en rutas de transporte electrónico alternativas en el PSII, en que  $Q_B^-$  puede donar electrones al cyt bajo diferentes condiciones de estrés (Thompson y Brudvig, 1988; Ortega y col. 1998; Barber y de las Rivas, 1993). Ortega y col. (1999) han propuesto el cyt  $b_{559}$  sea uno de los sensores primarios del daño fotoinhibitorio en el PSII.

Los otros complejos antena del PSII, son el complejo mayor de antena (LHCII) trimérico y tres complejos monoméricos menores de antena. Ambos tienen como función la absorción de luz y transferencia de la energía de excitación a las antenas internas del CR del PSII. El LHCII antena de plantas superiores y algas verdes se compone de proteínas codificadas por los genes *cab*, denominadas Lhcb1, Lhcb2 y Lhcb3, que unen moléculas de Chl a y b. Los complejos pigmento-proteína menores de antena también poseen proteínas de tipo CAB (Lhcb4, Lhcb5 y Lhcb6), llamadas de forma tradicional CP29, CP26 y CP24, respectivamente, y que unen moléculas de Chl a, Chl b y carotenoides. En plantas, cada dímero del CC une dos copias de los complejos menores y 2 - 4 trímeros de LHCII para formar el supercomplejo PSII. Algunos trímeros de LHCII pueden desplazarse entre las regiones de las lamelas granales y del estroma dependiendo del estado de fosforilación de la antena que es a la vez consecuencia de las condiciones ambientales. Muy recientemente se ha comprobado que plantas de *Arabidopsis* sin LHCII forman supercomplejos de PSII funcionales, gracias a que la función de la antena mayor es capaz de asumirla el CP26 organizándose también en trímeros (Ruban y col., 2003 y referencias que incluye).

A pesar de ser también organismos con fotosíntesis oxigénica, las cianobacterias y algas rojas, captan la energía solar mediante los ficobilisomas, con ficobiliproteínas.

Uno de los aspectos que más curiosidad despiertan en la estructura del PSII es la abundancia de proteínas de bajo peso molecular (proteínas LW, resumen en tabla 1 y Hamkamer 2001a, Rhee y col., 1998), ausentes en bacterias que realizan fotosíntesis no oxigénica. Entre ellas podrían incluirse las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del cyt  $b_{559}$ , al que nos hemos referido anteriormente. En su mayoría, son pequeñas proteínas (38-83 aa) intrínsecas con una única hélice  $\alpha$  transmembranal en posición central flanqueada por 2 extensiones hidrofílicas que sobresalen en la cara estromática y tilacoidal de la membrana. Sus funciones no están totalmente definidas (ver tabla 1) pero en general se puede hablar de una función estructural o reguladora del PSII, facilitando el ensamblaje de las distintas partes del complejo o la dimerización del PSII (Hamkamer y col., 2001a; Zouni y col., 2001). Un estudio muy reciente (Swiatek y col., 2003) en *Nicotiana tabacum* en el que se han modificado los genes del operón *psb EFJL* del genoma cloroplástico es interesante de cara a descifrar nuevos aspectos de la función de las proteínas que codifican mediante el estudio del fenotipo de los mutantes resultantes. Los cuatro mutantes exhiben distintos fenotipos, ninguno de los cuales es capaz de llevar a cabo un crecimiento autótrofo y blanquean rápidamente en presencia de la luz. Presentan una estructura cloroplástica alterada con incremento en el número de *grana* apilados frente al de lamelas estromáticas. La pérdida de cada una de las cuatro subunidades proteicas desestabiliza enormemente la estructura del PSII pero al menos la de PsbL y PsbJ no es tan drástica y los mutantes correspondientes son capaces de conservar una cierta actividad residual en el fotosistema. Es de particular interés que los mutantes  $\Delta psbJ$  y  $\Delta psbL$  muestran una enorme dependencia de las condiciones ambientales, sobre todo las lumínicas, y que tienen cambios en los niveles de proteínas OEC, fundamentalmente en PsbP y PsbQ. Sin embargo otras proteínas LW, como las PsbY1, PsbY2, PsbW y PsbZ sólo son indispensables bajo especiales condiciones de crecimiento de las plantas (Swiatek y col., 2003 y referencias incluidas). El resto de proteínas LW plantean aún más interrogantes sobre su función, además los experimentos de delección de genes que las codifican arrojan además resultados distintos si se trata de plantas o

cianobacterias. La información respecto a ellas hasta la fecha se resume en la tabla 1; para mayor detalle, consultar Hankamer (2001).

### A.2.3.- El complejo de oxidación/fotólisis del agua (OEC)

El complejo de oxidación/fotólisis del agua (OEC) va a merecer especial interés en esta introducción, ya que se ha revelado como el principal punto de acción de las infecciones virales en el cloroplasto, tema objeto de la presente Tesis. En plantas superiores y algas verdes está constituido por tres proteínas extrínsecas ancladas a la cara luminal del PSII, conocidas como las proteínas de 33, 24 y 16 kDa o PsbO, PsbP y PsbQ atendiendo a los genes que las codifican. Éstas alojan un complejo de iones manganeso, aniones  $\text{Ca}^{2+}$  y un anión  $\text{Cl}^-$  (Yamamoto y col., 1983; Stewart y col., 1985; Enami y col., 1994; Adeltroth y col., 1995; Seidler y col., 1996; Homann, 2002). PsbP y PsbQ están ausentes en el PSII de cianobacterias, donde son sustituidas por las subunidades PsbU y PsbV (fig. 5) (Shen e Inoue, 1993; Barber y col., 1997; Seidler, 1996a).

Vecinas al complejo OEC existen otras dos proteínas extrínsecas de bajo peso molecular unidas débilmente a la cara luminal del tilacoide cuya función en este complejo, o en el PSII en general, no está definida. Son PsbR, ausente en cianobacterias, y PsbT (Ljungberg y col. 1984 y 1986; Webber y col. 1989).

El gen *ycf8* localizado en el mismo operón que *psbB* en plantas y cianobacterias fue denominado recientemente como *psbT* (c) y su producto de 3,8 kDa identificado como un componente del PSII que podría estar implicado en la protección frente a fotoinhibición (Monod y col. 1994, Hong y col., 1995). Una proteína hidrofílica de 5 kDa, ésta de codificación nuclear y que se copurifica con PsbO (33 kDa) (Ljungberg y col. 1986), ha sido llamada también PsbT (n); de función desconocida, parece ser una proteína extrínseca situada en la cara luminal del PSII.

Las tres proteínas OEC están codificadas por los genes nucleares *psbO*, *psbP* y *psbQ* respectivamente. En el momento de su descubrimiento (para citas ver Andersson y Styring, 1991) se pensó que su función en la fotólisis del agua era enzimática, ya que la eliminación de PsbP y PsbQ llevaba a una inhibición parcial del desprendimiento de  $\text{O}_2$ , y la de los tres polipéptidos a una inhibición total con

eliminación paralela de Mn (Åkerlund y col., 1982; Kuwabara y Murata, 1984). Posteriormente, se comprobó que la eliminación de los polipéptidos llevaba asociada además la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Cl}^-$  y que el aumento *in vitro* de las concentraciones de estos iones provocaba la recuperación parcial de la actividad oxigénica de las partículas de PSII privadas de OEC (Debus, 1992). Ello apuntaba a que los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$  eran cofactores fundamentales para la actividad del PSII (Andersson y Åkerlund, 1987; ver revisión histórica de Homan, 2002) y que la actividad de las proteínas OEC no era enzimática. Cabe destacar además que no hay descrito ningún sitio de unión a manganeso en ninguna de las proteínas del OEC, lo que apoyaría la hipótesis de que su función es meramente estructural (ver revisión de Seidler, 1996a). Actualmente se considera que regulan el proceso de fotólisis del agua y estabilizan el complejo de iones Mn, por medio de la creación de un entorno químico adecuado para que éste complete el ciclo de Kok.

Además de las proteínas OEC ancladas al PSII, existe una fracción soluble de éstas en el lumen tilacoidal que se presentan como una reserva para el ensamblaje de nuevo PSII (Hashimoto y col. 1996; Kieselbach y col., 1998; Schubert y col., 2002).

La unión por interacción electrostática de las OECs a PSII está sometida a un mecanismo de regulación por el cual las proteínas se ensamblan a PSII activos y se liberan en condiciones en las que es necesario disminuir su actividad, como por ejemplo en condiciones fotoinhibitorias, jugando un papel importante en el recambio de la proteína D1 dañada (Henmi y col., 2001; Eisenberg-Domovich y col., 1995).

El PSII dimérico de plantas superiores presenta dos sitios de unión para OEC. Existen evidencias de que uno de ellos está implicado activamente en la oxidación del agua, mientras que el otro únicamente posee función estructural (Betts y col., 1997).

#### **A.2.3.1.- La subunidad PsbO del OEC**

La proteína PsbO también es llamada proteína estabilizadora del complejo de iones de manganeso (MSP, manganese stabilizing protein). El producto del gen *psbO* presente en planta y cianobacterias es un polipéptido con un tamaño de 292 - 331 aa, que, y tras su procesamiento, da lugar a una proteína madura de 241 - 247 aa. Ésta tiene un alto grado de conservación entre plantas y cianobacterias y entre plantas

superiores. Algunas como guisante y espinaca tienen un 87% de homología en la secuencia y la mayoría de los cambios son conservativos. Aunque se conoce la proteína madura como de 33 kDa, su peso molecular calculado es de 26.5 kDa (Nixon y col. 1992).

La expresión del gen nuclear *psbO* es dependiente del estado de desarrollo del organismo y está regulada por luz (Jain y col., 1998; Palomares y col., 1993).

Cuando PsbO es eliminada del PSII se producen diversas perturbaciones en las transiciones entre los distintos estados S, como son la inhibición parcial de las transiciones  $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow SO$  (Ono y Inoue, 1985; Vass y col., 1992), perturbaciones del estado  $S_2$  (Vass y col., 1987) y una pérdida de dos átomos de Mn (Miyao y col., 1985). La delección del gen que codifica una de sus isoformas en *A. Thaliana* afecta negativamente la actividad fotosintética y provoca retardo en el crecimiento (Murakami y col., 2002). PsbO actúa en la estabilización del complejo de iones Mn y en la protección frente al ataque de agentes reductores exógenos, regulando la reacción de formación de  $O_2$ . Además, provoca cambios en la conformación del lado lumínico de algunas subunidades intrínsecas del PSII, facilitando el ensamblaje de las proteínas PsbP y PsbQ (Miyao y Murata, 1984; Seidler, 1996a).

El sitio de unión de PsbO al PSII en plantas superiores es aún tema de debate. Algunos autores como Enami y col. (1997) proponen que PsbO interacciona con residuos de CP43. Otros como Nield y col. (2000b y 2001) y Yamasaki y col. (2001), basándose en estudios estructurales mediante microscopía crioelectrónica, y Seidler (1996b) y Bricker y col. (1988) por ensayos de "crosslinking", la han situado unida a las proteínas PsbE y PsbI (Enami y col. 1992) y al lazo E de CP47 por su extremo amino terminal, situándose sobre las hélices del extremo C-terminal de D1, quedando la proteína paralela a la superficie de la membrana. Sin embargo otros autores demuestran que la proteína forma un ángulo de  $45^\circ$  aproximadamente con respecto a la membrana del tilacoide (Duncan y col., 2001; Witt y col., 2001). También se ha descrito la interacción de PsbO con el extremo C-terminal de la subunidad  $\alpha$  del *cyt b<sub>559</sub>* (Betts y col., 1998). Shutova y col. (2001) demuestran que cuando esta proteína está anclada al PSII, su estructura depende del estado de oxidación del complejo de iones Mn, pudiendo presentar varias conformaciones, lo que podría explicar las determinaciones experimentales de su estructura *a priori* contradictorias.



Las zonas de la proteína que se unen a PSII han sido caracterizadas mediante estudios de accesibilidad del disolvente a la superficie de la proteína ensamblada y en forma soluble, así como por estudios de mutagénesis dirigida, (Frankel y Bricker, 1995; Miura y col., 1997; Tohri y col. 2002). Se ha comprobado que ambos están unidos mediante interacciones electrostáticas entre grupos de PsbO cargados positivamente y grupos con cargas negativas del PSII, no interviniendo en esta interacción los residuos de PsbO con carga negativa (para revisión ver Miura y col., 1997).

Se han realizado numerosos estudios del efecto del truncamiento de diversas zonas de la proteína en su estructura, capacidad de unión a PSII y de recuperación de la actividad oxigénica. Con proteínas mutantes que tienen truncado el extremo amino terminal se ha demostrado que existen dos regiones de reconocimiento del PSII, Glu1-Lys15 y Thr16-Glu19 y que ésta última es necesaria para la unión de al menos una molécula al CR-PSII. La delección  $\Delta$ Glu19Met provoca la pérdida de la estructura de lámina  $\beta$  dando una estructura desordenada no funcional (Popelkova y col., 2002a y b). El truncamiento del extremo carboxilo también provoca la pérdida de la capacidad de unión al PSII y de la actividad oxigénica (Betts y col., 1998).

Se ha propuesto que la región Leu101-Gly131 de la proteína es un sitio de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  y que éste está estrechamente asociado con el complejo de iones de Mn, pero lo cierto es que la eliminación de PsbO no afecta la organización de aquel complejo (Cole y col., 1987). Para estos autores, la proteína extrínseca y el ion  $\text{Ca}^{2+}$  que una optimizarían la función del complejo de Mn, más que estar directamente implicada en el proceso de fotólisis del agua. Apoya también esta hipótesis el hecho de que la delección del gen *psbO* en *Synechocystis* PCC 6803 no paraliza el crecimiento autotrófico de este organismo (Mayes y col., 1991). Tres regiones de la proteína madura Lys185-Asp193, Arg262-Lys274 y Asp308-Glu322 están enriquecidos en residuos ácidos y básicos, pero se desconoce con exactitud su importancia funcional. La subunidad PsbO posee además dos residuos Cys, en las posiciones 112 y 135 de la proteína de espinaca, que forman un puente disulfuro esencial para su función.

Pese a no haberse encontrado ningún motivo de unión a GTP en la proteína, se ha descrito que PsbO es capaz de unir este cofactor de forma específica (Spetea y col., 2001), lo que podría estar relacionado con su posible función en la degradación



y recambio de la proteína D1, ya que la presencia de GTP es necesaria en este proceso (Henmi y col., 2001). Yamamoto y col. (1998) proponen por tanto que PsbO puede prevenir el daño fotoinhibitorio.

PsbO ha sido descrita como una proteína muy flexible que en su forma soluble adopta una conformación más o menos desplegada pero no de proteína globular típica, con una estructura secundaria bien definida y pocos contactos terciarios (Du y col., 2001); tiene además tendencia a agregar, alta susceptibilidad a desnaturalizantes y es termoestable.

Respecto la estructura que PsbO adopta en la cara luminal de la membrana tilacoidal, mediante medidas espectroscópicas de dicroísmo circular y transformada de Fourier se propuso que esta proteína tuviera un 38% de láminas  $\beta$  y 9% de hélices  $\alpha$  (Xu y col., 1992). Aún no se dispone de ninguna estructura cristalina de PsbO de plantas superiores, aunque sí de modelos de su estructura secundaria (fig. 7) (Pazos y col., 2001). Éstos autores la presentan como una proteína tipo  $\beta$  con dos dominios homólogos de aproximadamente 120 residuos aminoacídicos separados por un motivo Pro-Gly-Gly muy flexible. El segundo dominio estructural de la proteína PsbO posee dos largos lazos ricos en Pro y Gly que incluyen las regiones Gly152 - Gly163 y Gly177 - Asn198. El primero tiene se corresponde a una secuencia muy conservada (de las Rivas y Heredia, 1999) y el segundo posee el motivo RGD característico de unión a membrana celular (cell-attachment motif) seguido de una pequeña hélice  $\alpha$  (Pazos y col., 2001).

Recientemente ha sido posible la determinación de la estructura de su esqueleto en los cristales de CC del PSII de *S. elongatus* (Zouni y col., 2001) y de *T. vulcanus* (Kamiya y col., 2003) (fig. 6). PsbO aparece como un tubo de 14 Å de ancho y 35 Å de largo, que se estrecha en dirección al sitio activo; el significado de esta estructura y la posibilidad de que actúe como canal de H<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub> o protones es discutido muy ingeniosamente en una revisión de Rutherford (2001).

Se ha descrito que PsbO se ensambla al PSII dimérico con una estequiometría de 2:1. La proteína anclada en uno de los dos sitios de unión tendría una función meramente estructural, mientras que la otra intervendría en la regulación de la fotólisis del agua (Betts y col., 1998).

Fig. 7.- Modelo de la estructura secundaria de la proteína PsbO de plantas superiores (Pazos y col., 2001).

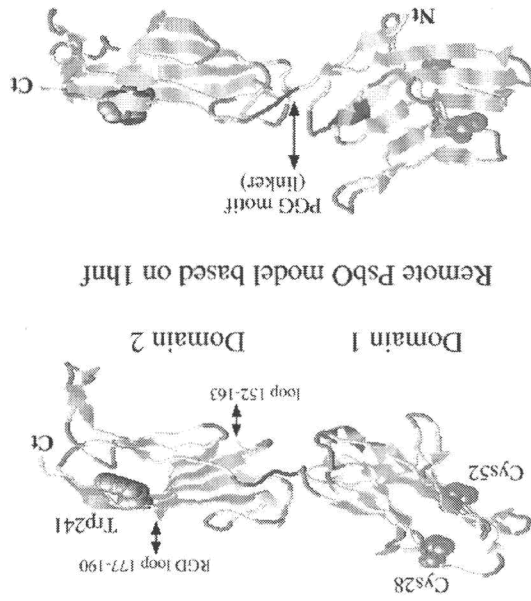
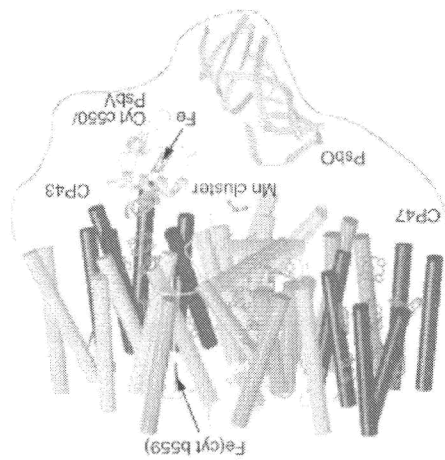


Fig. 6.- Estructura terciaria de la proteína PsbO de *S. elongatus* determinada cristalográficamente (Zouni y col., 2001).



### A.2.3.2.- La subunidad PsbP del OEC

El gen de espinaca *psbP* codifica un precursor de esta subunidad con un péptido de tránsito de 81 aa y una proteína madura de 186 aa (Janssen y col., 1987); ésta presenta un 83% de identidad en la secuencia con su homóloga de guisante, con la cual la mayoría de los cambios son conservativos (Wales y col., 1989b). Su masa molecular calculada es de 20.209 kDa. Aproximadamente el 25% de sus residuos están cargados, con un 63% de residuos polares, lo que explica su naturaleza hidrofílica (Wales y col., 1989b). Se ha propuesto que los residuos cargados intervengan en la unión de la subunidad al lado luminal del PSII en el que, según análisis de microscopía electrónica por criofractura, se corresponde con una protuberancia de 4 nm (Janssen y col., 1987).

Su función ha sido estudiada mediante experimentos de disociación del PSII y posterior reconstitución y con mutantes que no la expresan, y se ha concluido que esta proteína favorece que el PSII sea capaz de producir O<sub>2</sub> en condiciones limitantes de Ca<sup>2+</sup> y Cl<sup>-</sup>. Puesto que no hay evidencias que indiquen la existencia de sitios de unión a iones en PsbP, algunos autores (Murata y Miyao, 1985) sugirieron que actúe como concentrador de estos iones. Hay evidencias experimentales de que esta proteína no modifica la afinidad del PSII por Ca<sup>2+</sup> y Cl<sup>-</sup> pero sí su cinética de unión y liberación del complejo, sugiriendo una función estructural en la creación de un entorno químico adecuado para la producción de O<sub>2</sub> (Seidler, 1996a; Vrettos y col., 2001). *In vitro*, en preparaciones de PSII desprovistas de esta proteína, el complejo de iones Mn está expuesto a reductores exógenos que disminuyen la actividad del complejo, lo que indica que esta proteína actúa también en la protección del PSII (Zhang y col., 1998).

Resumiendo, las funciones de PsbP propuestas hasta el momento serían: evitar la disociación de los iones Ca<sup>2+</sup> del PSII durante el ciclo de Kok, crear un sitio de unión a Cl<sup>-</sup> de alta afinidad, y estabilizar y proteger el complejo de iones Mn de ataques químicos (Maclachlan y col., 1994; Seidler, 1996a; Campbell y col., 1998).

Existen evidencias experimentales de que la expresión del gen que la codifica, el *psbP*, está regulada por luz, sacarosa y factores de desarrollo endógenos (Kochhar y col., 1996; Wenng y col., 1989).

PsbP se halla unida directamente al PSII y no a través de PsbO, como se creía anteriormente, ya que es posible liberar esta última de preparaciones de PSII sin afectar la unión de la primera (Bernier y Carpentier, 1995), aunque se piensa que PsbO provoca cambios conformacionales en algunas subunidades del PSII que inducen un aumento en la afinidad por PsbP. Se han propuesto que otros componentes del PSII pueden interactuar con PsbP como son CP43 (de Vitry, 1989), o el cyt  $b_{559}$  (Seidler, 1996b). Análisis estructurales utilizando técnicas de microscopía electrónica (Nield y col. 2000a) muestran la proteína sobre la cara luminal del extremo N-terminal de D1. Aunque no está claro qué regiones de PsbO interactúan con las proteínas intrínsecas de PSII, Ifuku y Sato (2001) sugieren que el extremo N-terminal sea una de ellas; experimentos con las proteínas quiméricas entre espinaca y tabaco demuestran también la importancia de esta región, fundamentalmente sus 20 primeros residuos, en la retención de iones indispensables para el desprendimiento de  $O_2$ , en particular Asn15.

Al contrario de lo que ocurre para PsbO, poco es sabido respecto a la estructura de esta proteína. En la actualidad no se dispone de ninguna estructura cristalina ni predicción teórica de la estructura secundaria. Se estima que la estructura secundaria se compone en un 37 % de láminas  $\beta$ , un 5% de hélices  $\alpha$ , un 24% de giros y un 34 % de estructuras desordenadas (Zhang y col., 1998), y que adopta una conformación con dos regiones estructurales diferenciadas. Una comprende desde el residuo Ala1 al Asn58 y es responsable de la retención de los iones, principalmente la secuencia Gly10-Phe19, y la segunda comprende la región que va desde Leu59 hasta el final de la secuencia y podría ser responsable de la unión a PSII (Kuwabara y Suzuki, 1995; Ifuku y Sato, 2001; Ifuku y col., 2001).

#### A.2.3.3.- La subunidad PsbQ del OEC

El producto del gen nuclear *psbQ* de espinaca es el precursor de esta proteína, con un péptido de tránsito de 83 residuos y una proteína madura de 149 (Janssen y col., 1987). El gen *psbQ* que la codifica es inducible por luz (Grover y col., 1999).

Como PsbP, PsbQ tiene una función estructural de retención de iones  $Cl^-$  y  $Ca^{2+}$  en el lado donador del PSII, para el óptimo funcionamiento del complejo de

iones Mn. Cuando se elimina de preparaciones aisladas de PSII, la actividad oxigénica disminuye drásticamente, pero se recupera casi totalmente, incrementando las concentraciones de los dos iones. Diversos autores coinciden en que contribuye, junto con PsbP, a la creación de sitios de unión a  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad, pudiendo favorecer el desprendimiento de  $\text{O}_2$  en condiciones limitantes de  $\text{Cl}^-$ . Además, colabora en la estabilización y protección del complejo de iones Mn frente a agentes reductores exógenos (Maclachlan y col., 1994; Seidler, 1996a; Vrettos y col., 2001).

Ifuku y col. (2001) sostienen que en plantas esta subunidad del OEC se ancla al PSII a través de PsbP, aunque más recientemente Suzuki y col. (2003) han encontrado evidencias de que, al menos en algas verdes, PsbQ tiene su propio sitio de unión al PSII. Tras la eliminación de los primeros doce residuos del extremo N-terminal de la proteína PsbQ madura, ésta pierde su capacidad de unión al CC de PSII aislados (Kuwabara y col., 1986).

La proteína PsbQ está enriquecida en residuos Arg, Lys y Pro. Aunque existe sólo un 28% de homología de secuencia entre las proteínas de espinaca y *Chlamydomonas*, éstos son los residuos más conservados. Una característica peculiar es la existencia de cuatro Pro (posiciones 9 a 12) en la proteína madura; se piensa que esta región aporta rigidez y precede a una lámina  $\beta$ , seguida de un giro  $\beta$ . Otras regiones que podrían adoptar conformación de lámina  $\beta$  son Asp77-84 y Leu85-90 (Kuwabara y col. 1987; Grover y col., 1999).

No se dispone de ninguna estructura cristalina de esta proteína, pero sí de un modelo teórico de Balsera y col. (2003), en el que presenta dos regiones definidas. La primera, desde el primer residuo hasta el 48, es una estructura bastante desordenada que contiene el motivo GlyPro<sub>4</sub>LysSGly<sub>2</sub>LysProGly que podría formar una estructura poliprolina tipo II caracterizado por tener conformación de hélice con giro a la izquierda. La segunda, desde el residuo 49 hasta el final de la proteína, posee cuatro hélices  $\alpha$  principales que forman un up-down bundle.

#### A.2.4.- Estructura del PSII

Debido a la dificultad que supone la cristalización de supercomplejos proteicos de membrana, en la actualidad no ha sido posible el estudio de la estructura tridimensional del PSII de plantas superiores mediante técnicas de alta resolución como la difracción de rayos X, aunque sí se tuvo éxito en el caso de cianobacterias.

Sin embargo, sí ha sido posible el análisis mediante técnicas especiales de microscopía electrónica de cristales bidimensionales del CR de espinaca con una resolución de 17 Å (Rhee y col., 1997 y 1998; Barber y Kühlbrandt, 1999) y 9-10 Å (Hankamer y col., 2001b). Se han identificado 34 hélices  $\alpha$  transmembranales, de las cuales 22 se asignan a sus subunidades principales D1/D2/CP43/CP47, cyt  $b_{559}\alpha$  y cyt  $b_{559}\beta$  y el resto a proteínas de bajo peso molecular. Se comprueba que existe gran similitud entre la estructura determinada para el CR de plantas y cianobacterias (Zouni y col., 2001) y la calculada para el de plantas superiores, indicando la alta conservación evolutiva del complejo.

La estructura del PSII de cianobacterias se ha podido estudiar en *Thermosynechococcus vulcanus* con una resolución de 3,7 Å (Kamiya y col., 2003) y en *Synechococcus elongatus* a 3,8 Å (Zouni y col., 2001) (fig. 8) mediante difracción de rayos X. Así se ha determinado la posición del esqueleto carbonado de las proteínas intrínsecas de membrana D1/D2/CP43/CP47, cyt  $b_{559}\alpha$  y cyt  $b_{559}\beta$ , y de las extrínsecas PsbO, PsbU y PsbV

También ha sido posible la obtención del mapa estructural del supercomplejo de partículas dimericas de LHCII-PSII de espinaca con una resolución de 17Å mediante el análisis de imágenes obtenidas por microscopía electrónica (fig. 9). Los complejos antena aparecen en los dos extremos simétricos y periféricos del núcleo del dímero, con el LHC como estructuras triméricas. No fue posible asignar las zonas de densidad electrónica correspondientes a las proteínas LW.

Fig. 9.- Mapa de proyección del supercomplejo PSII-LHCII de espinaca (Barber y Kuhlbrandt, 1999).

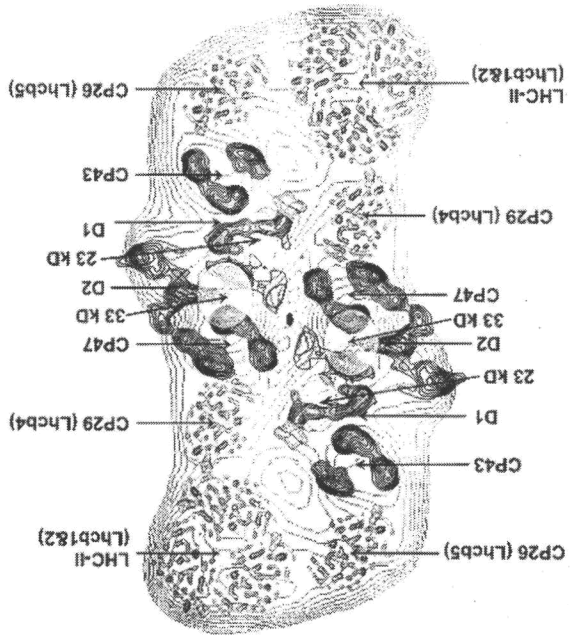
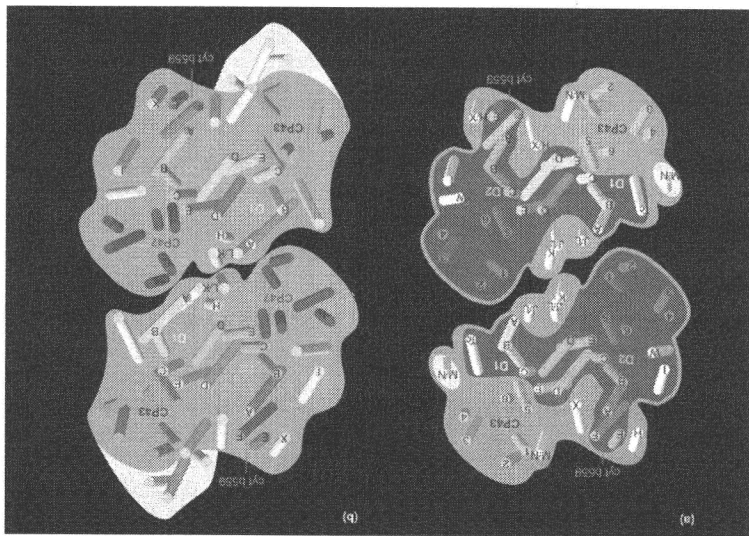


Fig. 8.- Comparación de la estructura del core complex dimérico de PSII entre plantas (espinaca, Hankamer y col., 2001b) y cianobacterias (S. elongatus, Zouni y col., 2001). Asignación de las hélices transmembrana de las subunidades del CR y proteínas LW.



Respecto a la posición del complejo OEC que nos ocupa, se obtuvo una valiosa información con reconstrucciones tridimensionales de los supercomplejos PSII-LHCII que se sometieron al análisis de partículas individuales en muestras vitrificadas que luego se estudiaban mediante microscopía electrónica. En él se pueden distinguir tres densidades independientes que se corresponden con las tres proteínas OEC, como se muestra en la fig. 12 (Nield y col., 2002). Las protuberancias llamadas A y A' se han asignado a la proteína PsbO, mientras que las denominadas B/B' y C/C' se corresponden con las otras dos proteínas del OEC.

Trabajos semejantes fueron realizados para dilucidar la estructura del supercomplejo en cianobacterias y algas verdes (Nield y col. 2000).

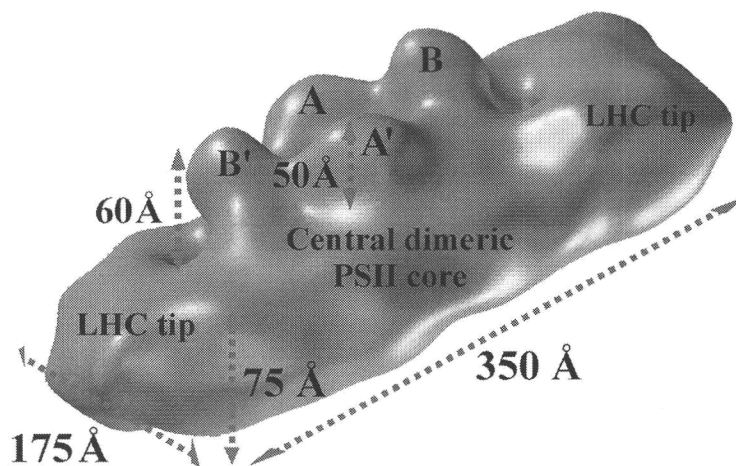


Fig.- 10.- Mapa 3D del dímero LHCII-PSII de espinaca (17Å) (Nield y col., 2002).

#### A.2.5.- Transporte de las proteínas cloroplastídicas de codificación nuclear

Muchas de las proteínas que desarrollan su función en el cloroplasto están codificadas en el genoma nuclear. Estas proteínas, entre las que se encuentran las proteínas constituyentes del OEC y otras subunidades del PSII (ver tabla 1), son sintetizadas por los ribosomas citosólicos como precursores con un péptido señal en



su extremo amino que marca su destino, y posteriormente, transportadas al interior del cloroplasto (fig. 11).

El péptido señal está constituido por dos dominios estructurales. El primero, situado en el extremo N-terminal del precursor, recibe el nombre de STD (stromal targeting domain) y determina el transporte al estroma del cloroplasto. El segundo dominio, denominado TTD (thylakoid targeting domain), marca el transporte a través de la membrana del tilacoide (Schnell, 1998). Los dominios TTD que marcan la translocación de una proteína al interior del tilacoide también reciben el nombre de LTD (lumen targeting domain). Los precursores de las proteínas de localización estromática solo poseen el primer dominio.

La maquinaria general de translocación del cloroplasto, llamada translocón Toc/Tic, está compuesta por un complejo de translocación de la membrana externa (Toc, translocon at the outer envelope membrane) y un complejo de translocación de la membrana interna (Tic, translocon at the inner envelope membrane) del cloroplasto. Reconoce el dominio STD del péptido señal del precursor y lo transporta al estroma del cloroplasto con consumo de GTP. Para su actividad necesita además de la presencia de chaperonas. El complejo Toc es el que lleva a cabo el reconocimiento con alta especificidad del STD, que previamente se une de forma irreversible a los lípidos de la membrana externa del cloroplasto. El análisis de las secuencias de los péptidos de tránsito revela que entre ellos existe un bajo grado de similitud en cuanto a longitud y a composición aminoacídica. Sólo tienen en común que son ricos en residuos hidroxilados (Ser y Thr), hidrofóbicos de pequeño tamaño (Ala, Leu, Phe y Val) y con carga positiva (Arg y Lys), mientras que son deficientes en residuos ácidos (Zhang y Glaser, 2002). Su estructura secundaria en solución acuosa es una estructura azarosa con pequeño contenido de lámina  $\beta$ , y en un ambiente hidrofóbico puede adoptar la conformación de hélice  $\alpha$ . Se cree que este cambio estructural debe ser importante en el reconocimiento y translocación (Jarvis y Soll (2002), Schleiff y Soll (2000), Wollman y col. (1999) y Fuks y Schnell (1997).

Una vez que el precursor se halla en el estroma del cloroplasto es necesario eliminar el STD. Esto ocurre gracias a una metalopeptidasa estromática denominada con las siglas SPP (stromal processing peptidase) que actúa en un solo paso endoproteolítico que requiere el consumo de ATP. Aunque no se ha encontrado un

motivo conservado, la región específica de corte de la SPP es rica en residuos hidroxilados (Ser y Thr) y deficiente en ácidos. Independientemente de la longitud del péptido señal, 10 ó 15 posiciones antes del sitio de corte existe una región enriquecida en residuos básicos con carga positiva (Arg y Lys) (van Dooren y col., 2001; Richter y Lamppa, 2002).

El precursor de la proteína, una vez pierde el STD, es insertada en la membrana o bien transportada al lumen, según el dominio STD que posea. Se han descrito dos mecanismos para la inserción de proteínas en la membrana tilacoidal y dos vías alternativas de translocación a través de la misma que se resumen en el esquema de la fig. 11 (Hulford y col., 1994; Wollman y col., 1999).

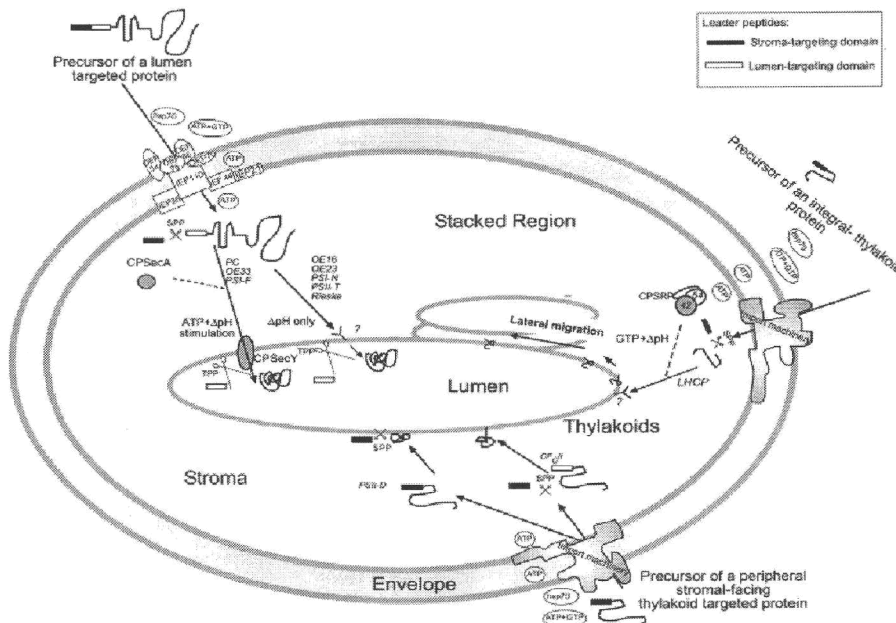


Fig. 11.- Esquema de las posibles vías de transporte de proteínas desde el citosol al cloroplasto (Wollman y col., 1999).

Un mecanismo de inserción de una proteína en la membrana del tilacoide, basado en interacciones proteína-proteína, consiste en el reconocimiento de la proteína por parte de otras subunidades del complejo de membrana al que debe incorporarse. Un ejemplo de este mecanismo es la subunidad Psad del PSI. La otra

vía de inserción es la descrita para la subunidad  $CF_0II$  de la ATP sintasa, en la que la inserción ocurre de forma espontánea. En estas proteínas el TTD parece contener una señal que impide la translocación completa de la proteína (Wollman y col., 1999).

Para la translocación de proteínas a través de la membrana tilacoidal existen dos vías independientes. Una es la vía Sec, que transloca entre otras proteínas, la proteína PsbO del OEC, la plastocianina y la subunidad PsaF de PSI. La otra vía es la llamada Tat (twin arginine translocation), que transloca la subunidades PsbP y PsbQ del OEC y las PsaN y PsaT del PSI, Hcf136. Ambas son vías homólogas a las presentes en procariotas (Creighton y col., 1995; Mori y Cline, 2001).

La maquinaria Sec de cloroplastos requiere del consumo de ATP y reconoce secuencias LTD, que no poseen un motivo conservado pero que se caracterizan por tener tres regiones, una N-terminal básica e hidrofílica con carga neta negativa y variable en longitud, una región central hidrofóbica y una región C-terminal más polar que no suele contener residuos básicos. Existen pruebas experimentales que apuntan a que mediante esta ruta se translocan al lumen proteínas desplegadas (Mori y Cline, 2001; Robinson y col., 2001; Henry y col., 1997).

La vía Tat depende del gradiente de pH transtilacoidal pero no consume nucleótidos trifosfato. Reconoce proteínas cuyo LTD posea en su extremo N-terminal, hidrofóbico, dos Arg consecutivas seguidas por un residuo muy hidrofóbico como Phe dos o tres posiciones adelante. Algunos LTD tienen en común el motivo [SerThr]-Arg-Arg-X-Phe-Leu-Lys que contiene estas dos Arg siendo X un residuo cualquiera. Además, la secuencia debe contener una región central hidrofóbica y una C-terminal que generalmente contiene residuos básicos. A diferencia de lo que ocurre con las proteínas translocadas por el mecanismo Sec, las que siguen la vía Tat lo hacen total o parcialmente plegadas (Mori y Cline, 2002; Mori y Cline, 2001; Robinson y col., 2001; Henry y col., 1997).

Por último, una endopeptidasa de la membrana tilacoidal denominada TPP (thylakoid processing peptidase) produce el corte de la secuencia LTD dejando libre la proteína madura. La secuencia consenso reconocida de forma específica por esta enzima es Val/Ile-X-Ala/Cys↓Ala, siendo X un residuo cualquiera. El corte se produce en la posición marcada con la flecha (Bruce, 2001; Shackleton y Robinson, 1991).

### A.3.- Tobamovirus

#### A.3.1.- PMMoV. Organización genética y ciclo de infección viral

Si bien el objetivo de nuestro trabajo ha consistido en estudiar diversos aspectos del efecto que produce la infección sobre la fisiología de la planta, consideramos necesario hacer una breve descripción de los virus empleados, así como del proceso de la infección viral.

En este trabajo hemos utilizado como modelo experimental dos cepas del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV), las cepas S (Alonso y col., 1989) e I (Wetter y col., 1984), de comportamientos patogénicos diferentes en plantas del género *Capsicum* (García-Luque y col., 1993; rev. Gilardi y col., 1999). Ambas cepas fueron aisladas de cultivos de campo de plantas de pimiento resistentes a los virus del mosaico del tabaco (TMV) y del tomate (ToMV) en el sureste español (cepa S) y en Sicilia (cepa I).

PMMoV pertenece al género de los tobamovirus (Wetter y Conti, 1984), cuyo miembro tipo es TMV. Los tobamovirus constituyen uno de los agentes etiológicos que causan mayores pérdidas económicas en los cultivos de pimiento de todo el mundo. De ahí la importancia del estudio tanto del virus como de los cambios en la fisiología de la planta afectada de cara a poder diseñar estrategias de defensa en la planta que contrarresten los daños causados por las virosis.

PMMoV se transmite por contacto mecánico en las prácticas agrícolas y a través de semillas. Se acepta de forma general que el uso de semillas contaminadas es la causa principal de brotes severos de la enfermedad en los cultivos de pimiento en todo el mundo (rev. Gilardi y col., 1999).

Los viriones de los tobamovirus tienen forma de varilla cilíndrica rígida y alargada de aproximadamente 18 nm de diámetro y 300 nm de longitud (fig. 12). Están constituidos por unas 2.140 unidades de una única proteína denominada proteína de cubierta (CP), distribuidas helicoidalmente alrededor de una molécula de RNA lineal de cadena sencilla y de polaridad positiva que constituye el genoma del virus.

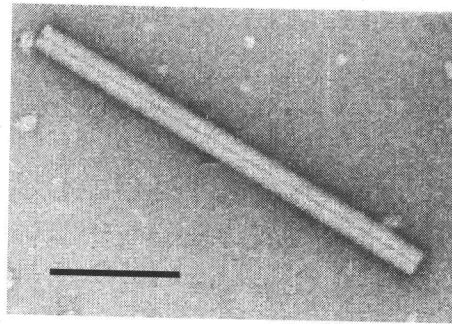


Fig. 12.- Fotografía al microscopio electrónico de una partícula de PMMoV-S. La barra representa 100 nm.

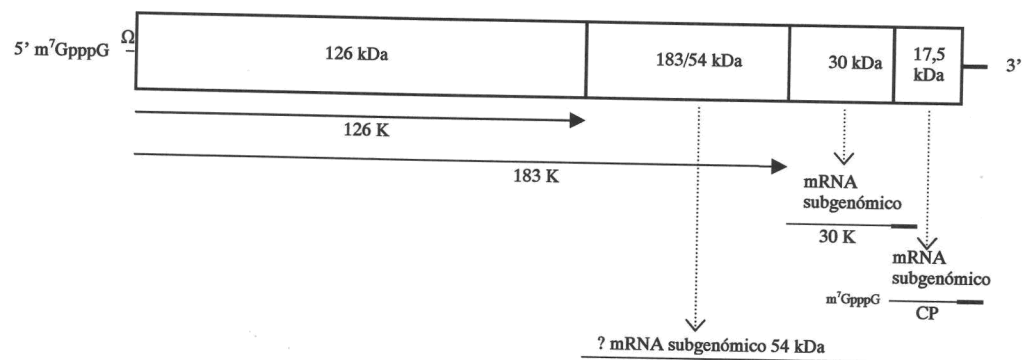


Fig. 13.- Esquema del genoma de PMMoV-S.

En el caso concreto de PMMoV-S, el RNAg consta de 6357 nt (Alonso y col., 1991). En su extremo 5' posee una estructura CAP (7mGpppG) unida a la secuencia líder no codificante de 69 nt. Esta región, desprovista de guaninas y denominada fragmento  $\Omega$ , ha sido identificada como activador de la traducción tanto en sistemas eucariotas como procariotas (Gallie y Walbot, 1992). En su extremo 3' presenta una secuencia no codificante (3' UTR) de 199 nt que adopta una conformación similar a la estructura canónica de la región 3'-UTR de los tobamovirus: tres pseudonudos precediendo a una estructura análoga a los tRNAs (Avila-Rincón y col., 1989). Ambos extremos incrementan la traducción del RNA viral (Gallie, 1996).

El RNA viral posee al menos 4 fases de lectura abiertas (ORFs) que codifican 4 polipéptidos. La primera ORF comienza en el primer codón AUG, en la posición 70 del RNA, y termina en la 3423, y codifica la proteína 126K, de 1.117 aa y una Mr de 126.304 Da. La supresión del codón de terminación ámbar AUA de la proteína 126K y la consiguiente inserción de una tirosina (Beier y col., 1984) permite la traducción de la proteína 183K, desde las posiciones 70 a 4,908. La proteína 183K consta de 1.612 aa y tiene una Mr de 183.340 Da. La tercera ORF abarca desde la posición 4.909 a la 5.682 y codifica la proteína 30K, que tiene 257 aa y una Mr de 28.347 Da. Por último, se encuentra la ORF codificadora de la CP, comprendida entre las posiciones 5.685 y 6.158. La CP posee 156 aa y su Mr es 17,110 Da.

Las proteínas 126K y 183K se traducen a partir del RNA genómico, mientras que las proteínas 30K y de cubierta lo hacen a partir de RNAs subgenómicos, que comparten la región 3' del RNAg. La síntesis de dichos RNAsg utiliza como molde las cadenas de polaridad negativa del RNAg, sintetizadas en el transcurso del proceso de la replicación viral. La existencia de un tercer RNA sg que codificaría una proteína de 55K, correspondiente a la región de la proteína 183K no compartida por la proteína 126K es tema de discusión puesto que su existencia no ha podido ser confirmada por distintos grupos de trabajo (rev. in Hull, 2000).

En la proteína 126K se han identificado dos dominios funcionales característicos de RNAs helicasas y metiltransferasas (Gorbalenya y Koonin, 1993; Schuman y Schwer, 1995). En su extremo N se sitúa un dominio (posiciones 1 a 832) con actividad metiltransferasa, necesario para la formación de la estructura CAP de los RNAs genómicos y subgenómicos. A continuación se sitúa un dominio (desde la posición 833 a la 1.086) con actividad helicasa, necesaria para el desenrollamiento de los RNAs bicatenarios producidos en el transcurso de la replicación viral. Estos dos dominios son compartidos con la proteína 183K.

La proteína 183K tiene además un dominio en la región C con secuencias características de las RNA polimerasas (Poch y col., 1989).

Las proteínas 126K y la 183K forman parte -junto a elementos del huésped- del complejo replicativo viral, habiéndose detectado su presencia en las preparaciones purificadas de la RNA polimerasa dependiente del RNA (Osman y Buck, 1996). Recientemente, se ha establecido que la proteína 126K es también necesaria para el

movimiento a corta y larga distancia viral (Hirashima y Watanabe, 2001; rev. en Nelson y van Bel, 1998).

La proteína 30K corresponde a la proteína de movimiento, necesaria para que se lleve a cabo el paso a través de los plasmodesmos de la unidad infecciosa viral, que en el caso que nos ocupa no requiere la proteína de cubierta, aunque su naturaleza es hoy en día desconocida. En la proteína 30K se ha identificado un dominio de unión a ácidos nucleicos, a través del cual interaccionaría con el RNA viral, facilitando su desplegamiento y posibilitando el paso por los plasmodesmos. A su vez, se localiza en la pared celular, posee la capacidad para incrementar el tamaño de exclusión molecular de los plasmodesmos, y su expresión ocurre en los estadios iniciales de la infección, características propias de las proteínas de movimiento viral (rev. Hull, 2000; Gillespie y cols. 2002).

La proteína de la cápsida, aparte de su función estructural para la formación de los viriones, se requiere para el movimiento a larga distancia, a través del floema junto al fotosintato. Aunque no está completamente demostrado, se considera que muy probablemente la dispersión viral en el floema se lleva a cabo en forma de viriones, puesto que se han detectado en el mismo (Simon-Buela y García-Arenal, 1999) y además para que este proceso tenga lugar el tobamovirus necesita una proteína de cubierta funcional para la encapsidación (rev. Nelson y van Bel, 1998). La función de la proteína de la cápsida en el proceso de replicación viral es objeto de controversia. Experimentos llevados a cabo con diversos tobamovirus y en distintos huéspedes mostraban que las cinéticas y las tasas de acumulación de elementos virales (RNAs y proteínas) en protoplastos de mutantes desprovistos del gen de la CP eran similares a los de los virus parentales, portadores de dicho gen (Ishikawa y cols, 1991). Sin embargo, recientemente (Bendahmane y cols, 2002) han mostrado que ciertas mutaciones en dicho gen modifican la acumulación de 30K en protoplastos de tabaco, lo cual es indicativo de que la CP actúa –directa o indirectamente– sobre la replicación viral.

Además de su participación en el ciclo viral, cada una de las proteínas virales, y dependiendo del sistema huésped-patógeno afectan a los procesos de patogénesis viral. Así por ejemplo, en el caso de PMMoV, la proteína 126/183K ha sido identificada como el elemento viral responsable de la sintomatología diferencial

desarrollada por plantas de pimiento tras la infección con distintas cepas virales (Hagiwara y col., 2002). En *Capsicum* spp., la proteína de cubierta es el inductor de la resistencia conferida por los genes L1-L4 y cuya activación provoca la restricción de la infección a los sitios primarios de infección y el desarrollo de las lesiones locales necróticas (Berzal y cols, 1995; de la Cruz y col., 1997; Dardick y cols, 1999; Gilardi y cols, 1998; Gilardi, 2000).

### **A.3.2. Ciclo de infección viral**

Para que se lleve a cabo el establecimiento de una infección generalizada en el huésped, es necesario que tengan lugar una serie de procesos en los que están involucrados tanto elementos virales como del huésped, y de los que poseemos un conocimiento muy limitado.

Tradicionalmente, estos procesos se dividen en desnudamiento, replicación/traducción y movimiento (rev. en Hull, 2000).

Una vez que el virus entra en la célula, que en el caso de los tobamovirus suele ser por daño mecánico y generalmente ocurre en las células de la epidermis, se procede al desnudamiento de la partícula y la liberación del RNA. En este desnudamiento –denominado desnudamiento cotraduccional– participan los ribosomas, y aunque las condiciones precisas en las que se establece son desconocidas, se sabe que va acompañada de la traducción de la proteína 126K. La posterior interacción de ésta con las subunidades de la CP localizadas en el extremo 3' de la partícula posibilita la desencapsidación del RNA en dirección 3'-5' y su completa liberación. La traducción de este RNA dará lugar a las proteínas 126K y 183K, en proporciones constantes y sometidas a una estricta regulación. La síntesis de estas proteínas permite la formación del complejo replicativo (RNA polimerasa-dependiente de RNA, RpRd), junto a elementos del huésped, de los que sólo se ha identificado algunos factores asociados a la traducción, y que se localiza en el retículo endoplasmático. Posteriormente, se produce la replicación del RNAg por la RpRd, dando lugar a un RNA complementario, denominado RNA-, y del mismo tamaño que el RNAg. Este RNA- sirve de molde para sintetizar tanto los RNAs genómicos como los subgenómicos que actúan de mRNAs para las proteínas 30K y CP (fig. 13).



La síntesis de los distintos RNAs y proteínas son procesos estrictamente regulados. La CP se une al RNA genómico sintetizado y dará lugar a los viriones. La 30K, unida posiblemente al mismo tipo de RNA y a otros elementos del huésped y quizás también virales, hará posible el movimiento de esta unidad infecciosa viral a las células adyacentes a través de los plasmodesmos, donde se iniciará un nuevo ciclo de infección. Este tipo de movimiento se denomina movimiento de célula-a-célula o movimiento a corta distancia, y ocurre entre distintos tipos de células de la hoja: epidermis, mesófilo, e incluye a las células de la túnica y parénquima del sistema vascular. El posterior acceso a las células acompañantes y los vasos cribosos del floema forma parte del denominado movimiento a larga distancia, donde los requerimientos son diferentes.

Como mencionábamos anteriormente, el movimiento a través del floema ocurre junto al flujo de fotosintato, de forma que el patrón de infección viral en regiones de la planta distantes a la zona inoculada es idéntico al del fotosintato, desde las fuentes a los sumideros (Roberts y cols, 1997). Aunque el patrón general de infección se conoce desde los experimentos clásicos llevados a cabo por Samuel en 1934 en plantas de tomate con TMV, permanecen sin desvelar muchos aspectos de este proceso. Resultados recientes muestran que al menos en *N. benthamiana* infectada con TMV (Cheng y cols, 2000) el virus accede desde las células del mesofilo a las venas menores de la hoja, infectando el floema abaxial, y penetrando en el tallo en el floema externo, desde donde desciende a la raíz. Si bien el proceso de inicio de la ascensión del virus es desconocido, se postula que en la zona basal de la raíz el virus se transloca al floema externo, ascendiendo a la zona superior de la planta que en esos momentos actúa como sumidero. Posteriormente, el virus será descargado desde las venas menores y mediante un movimiento de célula a célula invadirá el resto de la hoja. En estadios tardíos de la infección la totalidad de la planta puede quedar infectada con el virus, siendo desconocidos los procesos que concurren. Se acepta, aunque no ha sido demostrado fehacientemente, que esta invasión se lleva a cabo por el movimiento de célula-a-célula por el sistema vascular, ya sea a través de las células de la túnica, y de éstas al mesofilo, o a otros tipos celulares del tallo, incluido el xilema (rev. en Hull, 2000).

Si bien en el sistema huésped-parásito *N. benthamina*-PMMoV-S, y como se describe en el presente trabajo, el virus se localiza en toda la planta, en la mayoría de las infecciones, la distribución viral es muy desigual. La funcionalidad de los elementos virales, distinta para huéspedes diferentes; las tasas de replicación y movimiento en los estadios iniciales de la infección, la existencia y/o inducción de mecanismos de defensa en la planta, así como factores medioambientales pueden afectar la distribución. Es por ello por lo que la interacción huésped-patógeno podría ser definida como el paradigma de la complejidad biológica.

#### **A.4.- Efecto de la infección viral en la fotosíntesis.**

Una consecuencia del crecimiento en condiciones de estrés biótico o abiótico es la alteración estructural y metabólica de la célula y en concreto del cloroplasto, en el que se desarrolla la fotosíntesis, proceso metabólico primordial de la célula vegetal. De los supercomplejos que participan en la cadena de transporte electrónico fotosintético, las condiciones de estrés afectan principalmente al PSII (Lichtenthaler, 1996).

El estrés abiótico puede producirse por factores medioambientales como son la sequía o el encharcamiento, salinidad, temperaturas extremas, altas intensidades de luz, radiación UV, o la presencia de herbicidas y metales pesados, mientras que el estrés biótico se produce por la infección con patógenos como hongos, virus y bacterias (Balachandran, 1997b).

Respecto a la investigación de las consecuencias de la infección viral en el huésped, hay que reconocer que las herramientas de la biología molecular han hecho posible un gran avance en el conocimiento de los genomas virales y sus mecanismos de replicación, pero no ha existido un incremento paralelo del conocimiento sobre sus efectos en la fisiología de la planta hospedadora. Esto se ve dificultado porque la mayoría de los trabajos se centran en la respuesta de una especie vegetal a la infección por un patógeno concreto, que patógenos próximos evolutivamente pueden causar efectos muy diferentes en el mismo huésped, y que los síntomas en muchos casos dependen en gran medida de las condiciones medioambientales de

cultivo. Dada la complejidad de la interacción virus-cloroplasto, y en general virus-huésped, la gravedad de los síntomas ocasionados depende de factores virales y de la planta, como por ejemplo el estado de desarrollo en el que es infectada y las condiciones medioambientales en las que se encuentre (Dawson, 1992). Un problema añadido en el estudio de los efectos del estrés biótico es que el efecto de éstos no son, en general, homogéneos en la planta ni en el tejido invadido y sin embargo han sido analizados en órganos completos en lugar de en cloroplastos o células específicamente infectadas (Balachandran y col, 1997b). La utilización de nuevas técnicas de imagen como la fluorescencia o la termografía están siendo de una enorme utilidad para el estudio de la heterogeneidad de la hoja infectada (Scholes, 1992; Chaerle y van der Straeten, 2001).

Los síntomas producidos por las infecciones virales provocan en ocasiones grandes pérdidas en la agricultura mundial. Son, en general, inhibición del crecimiento vegetal y disminución en la calidad visual del producto o en su capacidad de conservación. Además, la infección por virus suele aumentar la sensibilidad de la planta a otros factores de estrés bióticos y también abióticos (Balachandran y col., 1994, 1997b).

El desarrollo de los síntomas de la infección viral está asociado a la aparición de cambios en la estructura y funcionalidad del cloroplasto, lo que indica que el proceso fotosintético se afecta durante la patogénesis (Goodman y col., 1986).

El estudio de la interacción virus-huésped desde el punto de vista de la investigación en fotosíntesis amplía nuestros conocimientos de un proceso metabólico esencial del huésped infectado, así como de los mecanismos de defensa del cloroplasto frente a estrés biótico. Esto resulta fundamental para la obtención de plantas resistentes a estos patógenos.

Balachandran y col. (1997b) consideran dos líneas importantes de investigación en fotosíntesis, para clarificar los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de los síntomas que siguen a la infección de la planta por un patógeno. La primera se ocuparía del estudio del equilibrio existente en el huésped entre procesos fotoprotectores, que disipan energía de excitación en exceso no utilizable en la fotosíntesis, y procesos fotoinhibitorios que tienen lugar cuando la capacidad de fotoprotección y los mecanismos antioxidantes de la planta se ven excedidos,

iniciándose la foto-oxidación de los complejos fotosintéticos, fundamentalmente el PSII, y de los lípidos de membrana por una superproducción de radicales libres de oxígeno (van Kooten y col., 1990; Balachandran y col., 1994; Rahoutei y col., 1999). La segunda área investiga los cambios en el metabolismo de los hidratos de carbono y en las relaciones fuente-sumidero de la planta infectada, que tienen lugar como consecuencia de alteraciones en la regulación de la expresión génica (Scholes y col., 1994 y 1996 Herbers y col., 2000). Estos pueden conducir a deficiencias en la síntesis de complejos, enzimas y pigmentos fotosintéticos.

Los cambios más aparentes en el cloroplasto durante el desarrollo de los síntomas de la infección viral son variaciones en el contenido de pigmentos, fragmentación del orgánulo, aparición de grandes vesículas y disminución del tamaño de los grana, aumento del tamaño y número de plastoglobulos, invaginaciones citoplasmáticas y acumulación de fitoferritina y almidón (Conti y col., 1972; Russo y Martelli, 1981; Koiwa y col., 1989; Almási y col., 2001).

La disminución del contenido de clorofila puede ser una inhibición de su síntesis, a su conversión en feofitina por pérdida del ión  $Mg^{2+}$  o a degradación por la clorofilasa los cloroplastos maduros (Bailiss, 1970; Balachandran y col., 1997b; Almási y col., 2000). La disminución en el contenido de clorofilas puede regular a la baja la formación de complejos pigmento – proteína (White y Brakke, 1983; Koiwa y col., 1992; Funayama y col., 1997a y b). Durante la infección viral pueden registrarse también cambios en la síntesis de pigmentos carotenoides y, en ocasiones, en el cociente xantofilas/clorofila (Balachandran y col., 1997b). Algunos de ellos pueden estar asociados a la activación del ciclo de las xantofilas en condiciones de estrés, incrementando la concentración de zeaxantina como mecanismo de fotoprotección. Se sabe que ésta actúa como disipador de energía de moléculas de  $Chl^*$  excitadas y que su presencia puede resultar crítica para la protección del PSII, junto con la degradación y el reemplazamiento de la proteína D1 dañada (Gilmore y col., 1994; Johnson y col., 1994; Gruszecki y col., 1994; Jin y col., 2001).

El efecto de la infección por diversas familias de virus vegetales sobre la cadena de transporte electrónico fotosintético y más concretamente sobre el PSII ha sido señalado por varios autores (Naidu y col. 1984; Hodgson y col., 1989; Reiner y Beachy, 1986, 1989; van Kooten y col., 1990; Gunasinghe y Berger, 1991; Banerjee y

col., 1995) y objeto también de trabajos previos conjuntos de nuestros dos laboratorios EEZ-CIB (Barón y col., 1995; Rahoutei, 2000; Rahoutei y col., 1998, 1999, 2000).

Inicialmente se propusieron dos posibles mecanismos de acción de los componentes virales responsables del efecto patogénico sobre el aparato fotosintético y especialmente el PSII. Uno consiste en la inhibición del transporte electrónico por interacción de algún componente viral, en concreto la CP con este fotosistema (Hodgson y col., 1989; Reinero y Beachy, 1989; Banerjee y col., 1995). Otros autores (Lindbeck y col., 1991; Dawson, 1992) abogan por la interferencia de ciertos componentes virales con procesos tales como la síntesis o el transporte al cloroplasto de proteínas del fotosistema y/o del ciclo de Benson- Calvin codificadas en el núcleo.

En algunos sistemas huésped-parásito estudiados la infección viral causa una reducción de la cantidad de proteínas del PSII, principalmente las relacionados con el OEC (Naidu y col. 1986, Takahashi y Ehara 1991, y Takahashi y col. 1992). El grado de inhibición del PSII depende de las condiciones de crecimiento de la planta, principalmente luminosidad, y de la cepa viral ensayada. Los síntomas virales se acusan e incluso aceleran cuando las plantas infectadas crecen a altas intensidades lumínicas (Balachandran y Osmond, 1994a, b) y se agravan, de forma paralela a la disminución de la actividad fotosintética, cuando las plantas infectadas se cultivan a altas temperaturas (Helms y Wardlaw, 1977).

En nuestros estudios con *N. benthamiana* infectada con distintos tobamovirus (PMMoV, PaMMV y virus con genomas híbridos entre ambos) comprobamos que el OEC, es el principal afectado por la infección viral dentro del PSII. Comprobamos mediante la técnica de termoluminiscencia (TL) que se inducen perturbaciones en el ciclo de los estados S de oxidación del complejo (Rahoutei y col. 1999, 2000; Rahoutei 2000). El análisis de los cambios inducidos en el patrón de proteínas cloroplásticas, revelaba a las proteínas OEC, de 33, 24 y 16 kDa, como las principales afectadas durante la patogénesis, pero de una forma diferencial, detectándose una drástica bajada en los niveles de acumulación de las dos últimas, sin cambios en los de la de 33 kDa (Rahoutei *et al*, 1998, 2000). Para algunos autores (Takahashi *et al*, 1991 y Takahashi y Ehara 1992) la inhibición parcial de la actividad

oxigénica por un descenso diferencial en los polipéptidos OEC podría estar asociada a los procesos moleculares primarios de expresión de síntomas en algunas combinaciones huésped-parásito. También han sido detectados cambios en la acumulación de estas proteínas en plantas sometidas a estrés abiótico (Barón y col., 1995).

Cuando emprendimos la caracterización de las proteínas OEC durante la infección, revelamos la existencia en *N. benthamiana* de familias proteicas para las proteínas OEC de 33 kDa y 23 kDa. Las isoformas de las proteínas de 23 kDa se veían influidas de forma diferencial por la infección (Rahoutei *et al.*, 1998). Un fenómeno similar ha sido descrito en plantas de tabaco infectadas con cucumovirus (Takahashi y Ehara, 1992), indicando la existencia de mecanismos reguladores de la expresión de las proteínas OEC durante la patogénesis.

En el estudio de los factores virales involucrados en el efecto patogénico sobre fotosíntesis, se nos mostró un cuadro complejo: detectamos la presencia de la CP en cloroplastos y PSII aislados de plantas infectadas (Barón y col., 1995; Rahoutei y col., 2000), pero no hubo correlación entre sus niveles de acumulación o su naturaleza y el efecto patogénico sobre fotosíntesis. La inhibición del PSII no parece pues originarse en su interacción directa con la CP, y es factible que otros factores virales (RNA polimerasa, o proteína de movimiento) estén involucrados en los fenómenos observados.

Otra consecuencia importante del estrés biótico es la modificación de las relaciones fuente-sumidero de la planta infectada y por tanto la producción de cambios en la distribución del fotoasimilado (Lucas y col., 1993). Para muchos autores, el continuo aporte de nutrientes al patógeno, que emplea la maquinaria celular del huésped para replicarse, lleva a una alteración en la distribución del fotoasimilado dentro de la planta. Además, la demanda del tejido infectado se incrementa debido a la activación de los mecanismos de defensa y síntesis de proteínas inducidas por el estrés. (Ayes y col., 1996, Balachandran y col., 1997a y b).

Diversos cambios metabólicos se producen en la hoja tras la entrada del patógeno, como acumulación de almidón y azúcares solubles en hoja, elevados niveles de aminoácidos y ácidos libres, incremento en la tasa de respiración y en actividad de las enzimas de las reacciones anapleróticas y descenso de la actividad

fotosintética. El virus desvía los azúcares a la síntesis de aminoácidos y ácidos nucleicos para la traducción y replicación virales, después de las cuales los niveles de estos metabolitos vuelven a los valores normales (Bedbrook y col., 1973). Esto es debido a la gran demanda que tiene el virus de estos metabolitos durante la replicación y la traducción, puesto que la CP viral puede llegar a representar el 50% del contenido proteico total de la célula.

No está claro el mecanismo de acción del virus sobre las actividades de las enzimas fotosintéticas (Havelda y Maule, 2000; Herbers y col., 2000; Scholes y col. 1994; Wright y col., 1995). La acumulación de azúcares en hoja se ha atribuido a problemas en el transporte o a inducción de invertasas de la pared celular y podría llevar a una inhibición –directa o indirecta– de la actividad y los niveles de enzimas del ciclo de Calvin (von Schaewen y col., 1990; Scholes y col., 1994, 1996; Stitt, 1994; Wright y col., 1995; Harrison y col., 1998).

La retroinhibición de la fotosíntesis (Krapp y Stitt, 1995), la regulación de la expresión génica (Herbers y col., 2000) e incluso la represión transcripcional de genes fotosintéticos (Sheen y col., 1990) por azúcares –directa o indirectamente– ha sido documentada por diversos grupos.

Herbers y col. (2000) comprueban en plantas de tabaco infectadas con potyvirus que la pérdida de la actividad fotosintética durante la infección vira, no puede ser únicamente atribuido a un descenso en los niveles de clorofila como defienden algunos autores (Funayama y col., 1997), y que existía una regulación transcripcional de genes como los *cab* de la antena LHCII del PSII y *rbcS* de la RuBisCO, ya en las fases tempranas de la infección. Estos autores proponen también que los azúcares actúen además como amplificadores de las respuestas de defensa durante la interacción planta-patógeno. Klegan y Buchanan (1988) y Scholes y col. (1994) encuentran en plantas que sufren infecciones fúngicas una inhibición de la fotosíntesis asociada a altos niveles de fructosa, glucosa y cambios en la proporción sacarosa/almidón, asociados a descensos en las actividades de la FBPasa, RuBisCO y NADP-GADPH y a cambios en la partición del fotosintato.

Técsi y col. (1994a, 1994b y 1996) han demostrado que la infección del virus del mosaico del pepino en cotiledones de *Cucurbita pepo* produce en las zonas invadidas el aumento en la actividad de enzimas de la glucólisis y la respiración



mitocondrial (fosfofructoquinasa dependiente de ATP, enzima málico dependiente de NAD, PEP carboxilasa, isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD, fumarasa y la cyt c oxidasa) así como en la actividad de enzimas que catalizan reacciones anapleróticas (glucosa-6-P deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa del ciclo de las pentosas fosfato, enzima málico dependiente de NADP y la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP) y de la peroxidasa. Así mismo comprobaron que en los tejidos invadidos también disminuyen las actividades de algunas enzimas fotosintéticas que intervienen en el ciclo de Calvin - Benson como son la RuBisCO y la NADP-GAPDH.

Como consecuencia de la infección viral no solo se afecta la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis. Havelda y Maule (2000) han comprobado que compuestos de bajo peso molecular actúan como moléculas efectoras en la modificación de los niveles de transcripción de otros genes en células de tejido no infectado como los que codifican la peroxidasa, la invertasa, la catalasa, y las PRs.

## **A.5.- Estudio de factores de estrés en fotosíntesis mediante técnicas de imagen**

### **A.5.1.- Principios de fluorescencia. Fluorescencia y estrés.**

La clorofila integrante de los complejos pigmento-proteína que funcionan como antenas en la membrana tilacoidal, absorbe la energía luminosa y transmite la de excitación a los centros de reacción P680 y P700 de los fotosistemas PSII y PSI, respectivamente. Pero parte de esa energía se pierde en procesos disipativos, como son la emisión de fluorescencia y calor. A temperatura ambiente, son fundamentalmente las moléculas de clorofila de las antenas del PSII excitadas tras la absorción de luz, las que emiten fluorescencia en el rojo. Por ello la medida de esta emisión puede aportar una valiosa información sobre el funcionamiento de este fotosistema.



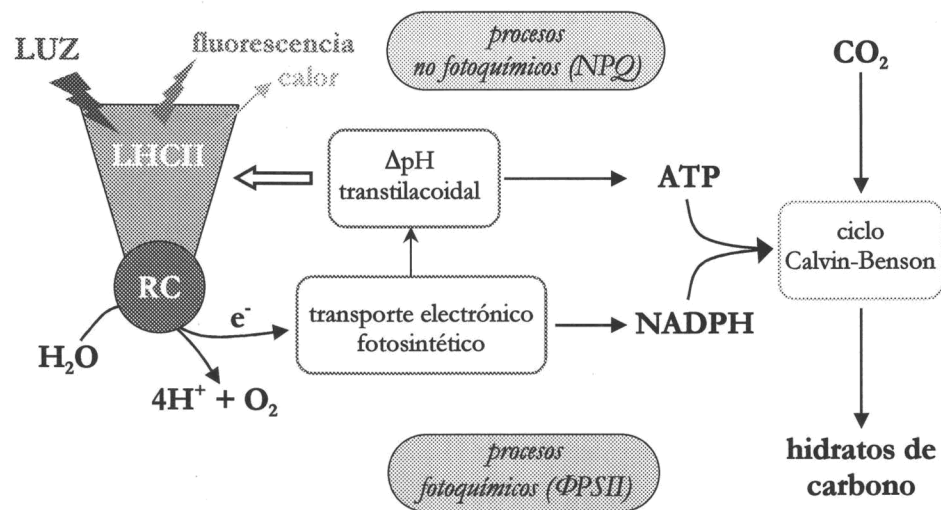


Fig. 14.- Representación esquemática de la transformación de la luz absorbida por las antenas del PSII en los distintos tipos de energía que compiten con la emisión de fluorescencia.

La fluorescencia compite con la transformación de la energía luminosa absorbida en energía química mediante el transporte electrónico (procesos fotoquímicos) y con la disipación por procesos no fotoquímicos (fig. 4) de estos procesos es lo que se conoce como *quenching* fotoquímico ( $q_p$ ) y no fotoquímico ( $q_n$ ), respectivamente. La generación de  $q_n$  es un proceso muy complejo en el que intervienen diversos factores. El más importante es la disipación de energía en forma de calor, cuantificada por  $q_E$  (*quenching* energético) y que depende tanto del gradiente de pH en la membrana tilacoidal generado durante el flujo electrónico, como de la deepoxidación de la violaxantina en zeaxantina en el ciclo de las xantofilas. También existe una menor contribución a  $q_n$  de los procesos de fotoprotección *vs* fotoinhibición originados en el LHCII ( $q_I$ , *quenching* fotoinhibitorio), y de la fosforilación de las proteínas de la antena ( $q_T$ ) (Schreiber y col., 1994; van Wijk y col., 1993).

En condiciones fisiológicas, la mayor parte de la energía solar absorbida es utilizada en fotosíntesis y los procesos no fotoquímicos y la emisión de fluorescencia

funcionan con un bajo rendimiento. Cuando la planta sufre alguno de los numerosos factores de estrés presentes en la Naturaleza, esta situación se invierte en condiciones extremas, ya que se registra una drástica bajada del rendimiento fotosintético y predominan los procesos disipativos, incrementándose la emisión de calor y fluorescencia notablemente (fig. 15) La medida de la fluorescencia roja emitida por la clorofila se convierte así en un parámetro indicativo de la operatividad del proceso fotosintético.

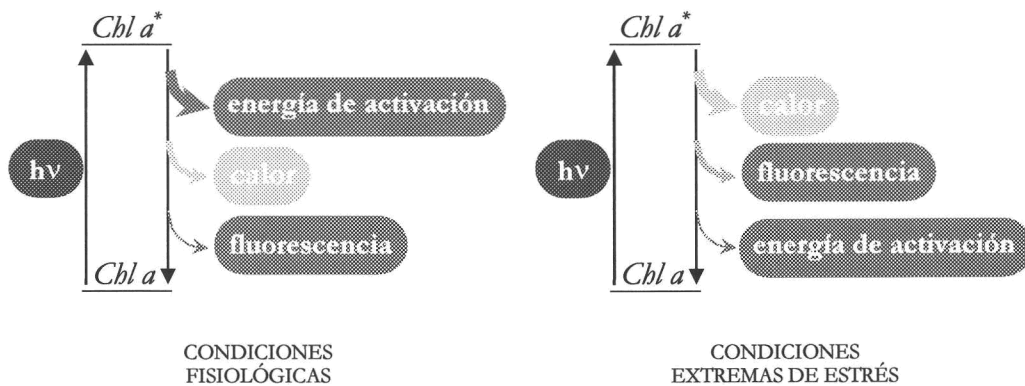


Fig. 15.- Esquema del balance entre fotoquímica, disipación térmica y fluorescencia bajo condiciones fisiológicas y de estrés.

Además el PSII, como detallaremos posteriormente, es una de los principales puntos de acción de numerosos factores de estrés de origen biótico y abiótico en el cloroplasto (Lichtenthaler, 1996; Lichtenthaler y Miede, 1997). Ya que la fluorescencia roja es emitida fundamentalmente por este complejo, su determinación ha facilitado enormemente el estudio de las alteraciones en el PSII inducidas por diversas condiciones adversas para el crecimiento vegetal.

La emisión de fluorescencia no sigue una cinética lineal con respecto al tiempo durante el cual una hoja es iluminada, sino que es muy compleja debido a su dependencia de procesos metabólicos como son la fotoactivación de la antena del PSII, el ciclo de Benson-Calvin, el establecimiento del gradiente de pH transtilacoidal, etc.

Kautsky describió en 1931 la inducción rápida de la fluorescencia si una planta adaptada a la oscuridad es iluminada. Cuando todos los centros de reacción de PSII están abiertos ( $Q_A$  completamente oxidada) la fluorescencia es mínima,  $F_0$ , y cuando están cerrados ( $Q_A$  completamente reducida) es máxima,  $F_M$ . La diferencia entre ambas recibe el nombre de fluorescencia variable,  $F_V$ . Generalmente, una planta sana tiene un valor  $F_V/F_M$  cercano a 0.8 independientemente de la especie (Björkman y Demming, 1987). Sin embargo, cuando está sometida a algún tipo de estrés, tanto biótico como abiótico, este valor disminuye.

Para determinar la contribución de los coeficientes de *quenching* y los procesos fotoquímicos y no fotoquímicos en unas determinadas condiciones de crecimiento y desarrollo de la planta, se desarrolló el método de pulsos de luz saturante (Schreiber y col., 1994). Ya que éste ha sido el protocolo de medida de fluorescencia seguido en el presente trabajo, se detalla ampliamente en el aptdo. C.8.1.3. de *M. y M.*

#### **A.5.2.- La fluorescencia de imagen (FI) como método de detección de estrés temprano. “Ver es creer”**

La medida de la emisión de la fluorescencia de la clorofila en organismos fotosintéticos ha sido en la última década la técnica estrella para determinar la eficiencia fotosintética y diagnosticar la presencia de factores de estrés que llevan a un descenso notable de aquella. Ofrece además las ventajas de ser una técnica no destructiva, precisa y de gran rapidez en las medidas (Lichtenthaler, 1996).

Normalmente estas se realizan en determinados puntos de la superficie foliar, aunque también se han realizado en los últimos años numerosos experimentos en frutos destinados a medir su calidad antes de la salida al mercado. Los fluorímetros más populares son los desarrollados por las firmas Walz (Effeltrich, Alemania) y Hansatech (Norfolk, Reino Unido) y entre ellos, el P.A.M. (Pulse Amplitude Modulation) y el P.E.A. (Plant Efficiency Analyser). A pesar de la excelencia de estos equipos y su demostrada eficacia en diagnóstico de estrés, las medidas puntuales de la fluorescencia no ofrecen una información exacta de cuál puede ser la actividad fotosintética en la hoja completa. Y ello resulta de gran valor en situaciones donde un factor de estrés tiene un efecto no homogéneo y produce síntomas foliares locales,

como puede ser el caso de la infección por patógenos que induce, mosaico, moteado, amarilleamiento de nervaduras, etc.

Por ello, se desarrollaron de forma más reciente los equipos de FI que permiten obtener información espacial de la distribución de la emisión de fluorescencia de la clorofila en hojas y frutos. Hasta hace pocos años no existían versiones comerciales de estos aparatos y distintos grupos de investigación diseñaron sus propios prototipos, a estos trabajos nos referiremos posteriormente. Actualmente, existen en el mercado el Fluorcam de PSI (Photon System Instruments, Barno, República Checa), el Imaging P.A.M. de Walz y el FluorImager de Qubit Systems Inc. Durante el desarrollo de esta Tesis, se puso a punto el prototipo de un equipo de FI diseñado en la Universidad de Limburg en Diepenbeek, Bélgica y que próximamente será comercializado.

Los precedentes/antecedentes de las técnicas de FI podemos encontrarlos en la obtención de imágenes fotográficas mediante la técnica de *fitoluminografía* (Sundböm y Björn, 1977). Pero ha sido la llegada al mercado de las cámaras de vídeo (Charge-Coupled Device) CCD y las nuevas técnicas de digitalización de imágenes las que han hecho posible el análisis en dos dimensiones de la emisión de fluorescencia en vegetales.

Para el análisis de los efectos del estrés vegetal en cultivos y plantas de experimentación dos técnicas fundamentales de FI han sido desarrolladas, diferenciándose en su fuente de iluminación para inducir la fluorescencia, la inducida por luz visible y la inducida por láser (LIF). En el primer caso, la fluorescencia roja es emitida por la clorofila, mientras que por la excitación de la muestra en el rango UV-A a una  $\lambda$  de 355 nm, se detecta emisión de fluorescencia a 4 diferentes longitudes de onda 440, 520, 690 y 740 nm, en las zonas del azul, verde, rojo y rojo lejano. La fluorescencia verde y azul es emitida por diversos fenoles vegetales como los ácidos cinámicos, flavonoles, etc. presentes en la epidermis foliar.

### A.5.2.1.- Fluorescencia de la clorofila

Para su medida la luz de excitación es suministrada por lámparas incandescentes o diodos emisores, lo que permite conseguir intensidades de luz saturante en áreas relativamente grandes y obtener información sobre la cinética de la emisión de fluorescencia mediante el método de pulsos de luz saturante que lleva al análisis de los coeficientes de quenching y se ha descrito anteriormente.

Para la FI se pueden obtener imágenes que den información sobre la eficiencia fotosintética de hojas preadaptadas a la oscuridad durante 15-30 min después de iluminación saturante para obtener  $F_m$  y después de 5 min en el steady-state  $F_s$ ; también puede procesarse  $R_{Fd}$ .

Se pueden obtener imágenes representativas de distintos parámetros fotosintéticos relacionados con la emisión de fluorescencia ( $F_o$ ,  $F_m$ ,  $F_v$ ,  $F_m'$  y  $F_o'$ ) y de otros obtenidos de los anteriores, como eficiencia fotoquímica del PSII y los "quenching" fotoquímico y no fotoquímico (NPQ), que mide la energía disipada como mecanismo de protección del PSII

Trabajando con sus propios prototipos distintos grupos han obtenido una valiosa información sobre distintos sistemas experimentales. Uno de los primeros fue el de Omasa y col. (1987) que trabajó con girasol y pepino. El grupo de Daley (Osmond y col., 1987) analizó los cambios temporales y espaciales en la eficiencia fotosintética de las hojas de plantas sometidas a distintos factores de estrés (Raschke y col. 1990. Osmond y col. 1999) y en particular investigó el efecto de diferentes patógenos vegetales (Osmond y col. 1990, Balachandran y col., 1994). Fenton y Crofts (1990) utilizan un modelo barato de diseño propio para la identificación de mutantes fotosintéticos.

Genty y colaboradores en París, no sólo consiguen un nuevo prototipo sino que definen el parámetro  $\Phi$  (quantum yield o rendimiento cuántico del PSII) para las medidas de imagen (Genty y Meyer, 1995). Ellos captan imágenes de la F en el estado estacionario y durante los pulsos saturantes de luz y a partir de ellas calculan una tercera imagen que representa la distribución espacial de cada parámetro y de aquí  $\Phi$ . De esta forma, han investigado el papel de la conductancia estomática en la

regulación de la fotosíntesis (Bro y col. 1996, Meyer y Genty, 1998; Meyer y Genty, 1999). Trabajos similares han sido realizados por Cardon y col. (1994).

Respecto a estrés biótico, Nilsson (1995) analiza en una revisión los trabajos pioneros hasta esa fecha en análisis de imagen, incluidos los de detección por control remoto, aplicables en patología vegetal. Se mencionan técnicas como radiometría multiespectral, fotografía, videografía, termografía de infrarrojos, control remoto activo y pasivo, LIF, análisis de imagen multiespectral y RMN.

En el estudio del efecto de la infección por patógenos en el aparato fotosintético destaca el prototipo de Chl FI desarrollado por Rolfe y Scholes (1995) con el que han investigado el efecto de hongos patógenos en la maquinaria fotosintética. Analizaron la infección de hojas de roble por *Puccinia coronata* que presentan áreas localizadas de infección que se expanden con el progreso de ésta y dan lugar a un patrón heterogéneo de alteraciones fotosintéticas evidente en las imágenes de  $\Phi$  y NPQ que cambian a lo largo del proceso de infección, pudiéndose distinguir también a través de ellas zonas infectadas e incluso islotes verdes al final de la infección (fig. 16a). Cuando se siguió la infección de *Arabidopsis thaliana* por *Albugo candida* (Chou y col. 2000), se registró una disminución en la tasa de fotosíntesis estrictamente en las regiones foliares invadidas por el hongo, que se correspondía con un aumento en NPQ cuando se iluminaban las plantas a irradiancia por encima de  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , de forma que la energía no usada en fotosíntesis se ha perdido en procesos fotoquímicos (fig. 16b). El aumento en NPQ lo atribuyen a uno de sus componentes, el quenching energético  $q_E$  que depende del gradiente de protones en la membrana tilacoidal que podría verse afectado o a una reducida actividad del ciclo de Calvin, lo que conduciría a una reducción en la demanda de ATP y NADP y a una disminución del gradiente transmembrana e incremento de NPQ (Ruban y Horton, 1995), efecto más evidente a intensidades lumínicas moderadas y altas. Cuando se usaron imágenes cuantitativas del parámetro  $\Phi_{II}$  x intensidad lumínica, que tiene una correlación lineal con la asimilación de  $\text{O}_2$ , se comprobó que el descenso en la tasa de fotosíntesis se relaciona espacial y temporalmente con las zonas invadidas por el hongo, mientras las zonas libres de éste no presentan alteraciones fotosintéticas.

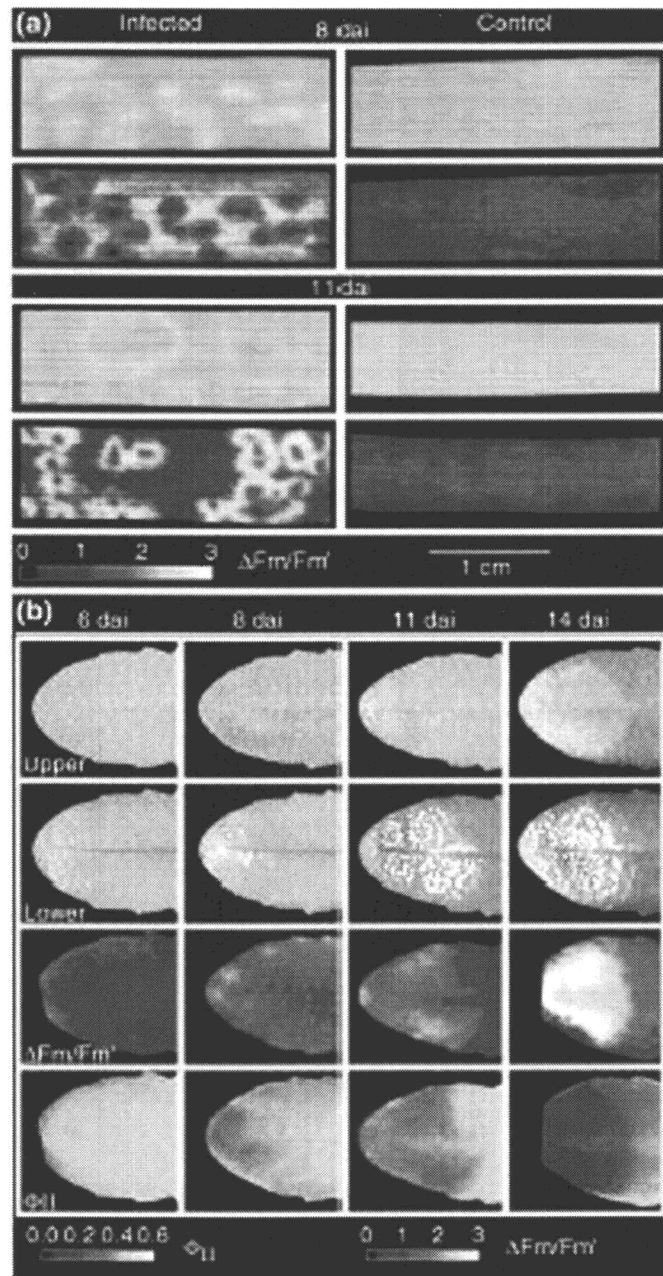


Fig. 16.- (a) Fotografías (fila superior) e imágenes de NPQ (fila inferior) de hojas de roble infectadas por *Puccinia coronata* a 8 y 11 días post-infección. (b) Fotografías (filas superiores) e imágenes de NPQ y  $\phi$  (fila inferior) de hojas de *Arabidopsis* infectadas con *Albugo candida* a distintos días post-infección (d.a.i).



En hojas infectadas, se distinguen en las imágenes de  $\Phi$  y NPQ tres zonas perfectamente diferenciadas si estudiamos la cinética de inducción de estos parámetros, destacando un anillo en torno a la zona de pústulas en que  $\Phi$  fue inducida más rápidamente que en las hojas control, lo que se corresponde normalmente con áreas de alta actividad metabólica, lo que también muestran las imágenes de starch-printing.

Recientemente este sistema de imagen se ha aplicado a escala microscópica mejorando la profundidad de foco para obtener mediante el desarrollo de nuevos algoritmos un mapa topológico de la hoja a partir de imágenes de FI tomadas en distintos planos de enfoque (Rolfe y Scholes, 2002).

Peterson y Aylor (1995) y Ning y col. (1995) han utilizado también la FI para estudios similares. Los primeros investigaron hojas de *Phaseolus vulgaris* infectadas con el hongo *Uromyces appendiculatus* y obtuvieron imágenes de la fluorescencia en el steady-state que predecían de forma clara la extensión de lesiones que apenas eran incipientes. Estas aparecen como puntos de alta fluorescencia que crecen radialmente a la vez que el micelio del hongo crece y aparecen síntomas visuales.

Ning y col. (1995) demuestran la utilidad de un equipo de fabricación propia para la medida de FI y diagnóstico del estrés por congelación, tratamientos herbicidas y hongos patógenos. Analizando hojas de *Torreya taxifolia* (yew) infectadas por *Pestalotiopsis*, comprueban que hojas todavía no invadidas por el hongo muestran alteraciones en los parámetros de fluorescencia inducidos por las toxinas fúngicas antes de la aparición de síntomas.

El desarrollo muy reciente de equipos portátiles está permitiendo un screening en campo de plantas susceptibles y resistentes al patógeno, y el diagnóstico temprano ha permitido en ocasiones hasta la inducción local de mecanismos de resistencia en el vegetal (Chaerle y van de Straeten, 2001).

Otros trabajos son los de Oxborough y Baker con un nuevo instrumento de FI montado en un microscopio de fluorescencia que permitía obtener imágenes de ésta a nivel celular y subcelular, incluidos cloroplastos (1997a) y aquellos que tratan de resolver distintos componentes de los análisis de "quenching" (1997b). Siebke y Weiss (1995) estudian las oscilaciones diurnas en la apertura estomática de plantas de



*Glechoma hederacea* y obtienen los correspondientes patrones foliares de asimilación de CO<sub>2</sub> mediante las imágenes de distintos parámetros de fluorescencia de la Chl.

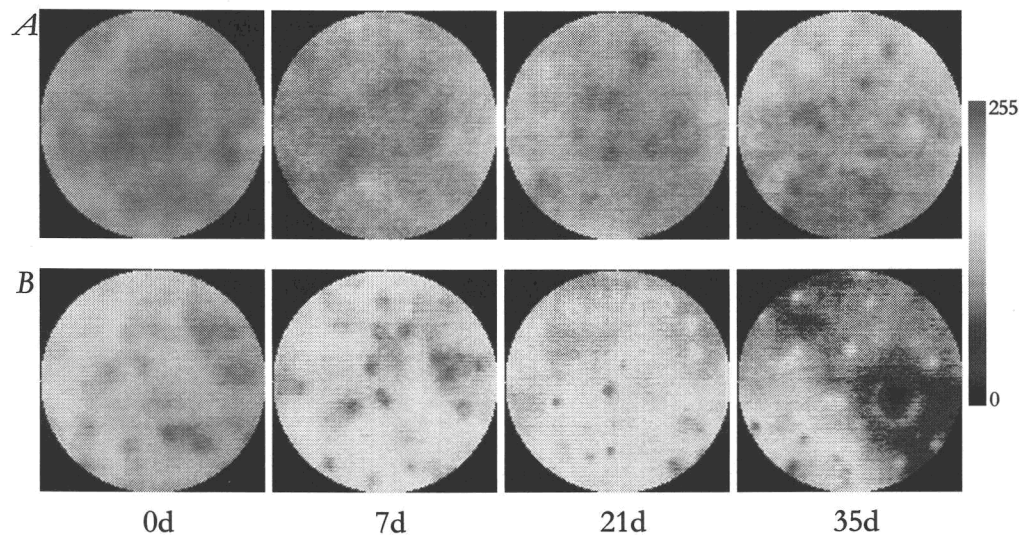


Fig.17.- Imágenes de fluorescencia roja de manzanas Golden Delicious sudafricana sanas (A) y afectadas por "bitter bit" a distintos días de almacenamiento, antes de que las segundas desarrollen ningún síntoma aparente (Imágenes cedidas por C. Huybrechts y R. Valcke).

Aunque los equipos de FI han sido diseñados principalmente para medidas en tejidos verdes con una alta concentración de clorofila, su extrema sensibilidad permite también las medidas en superficie de frutos que contienen cloroplastos activos. En el caso de análisis de calidad de fruto los trabajos son menos abundantes, siendo prácticamente los pioneros los de Abbot (1999). Más recientemente, Ciscato (2000) demostró en su estudio de Tesis Doctoral que FI resultaba muy prometedora para el análisis de calidad del fruto antes de su comercialización y realizó incluso pruebas con redes neurales, de cara a utilizar esta técnica en la maquinaria de selección de frutos. FI permite predecir futuros daños en la superficie de la fruta durante el proceso de maduración, incluyendo los inducidos por infecciones por patógenos. Trabajando con distintas variedades de manzana demuestran que se puede realizar un diagnóstico presintomático de la calidad del fruto, definiendo qué

imagen de parámetro fotosintético medido en la piel de un fruto, a lo largo de su almacenamiento, puede correlacionarse de forma más adecuada con la calidad de éste (fig. 17). Con un equipo portátil de diseño propio han realizado además en campo el seguimiento de la infección por *Erwinia amylovora* en perales y manzanos españoles, belgas y sudafricanos.

El grupo de L. Nedbal ha modificado asimismo el FluorCam usando luz modulada como luz de excitación, a semejanza del Imaging-PAM (Nedbal y col. 2000). Los trabajos de Nedbal y col. (2000) con cítricos confirman la bondad de la técnica para su uso en fruto. En la fig. 18 se muestra un ejemplo de esto en limones infectados con el hongo *Penicillium digitatum*.

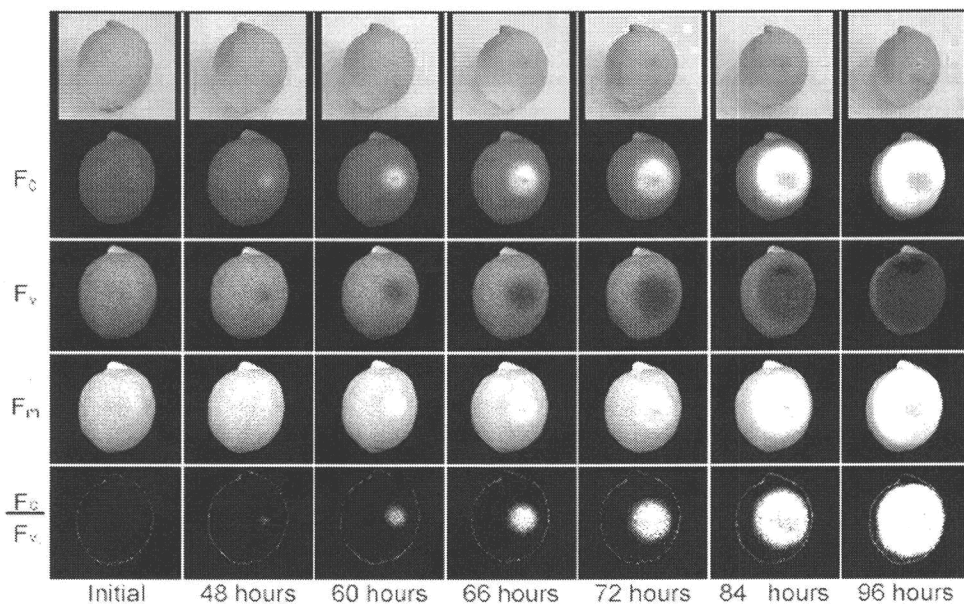


Fig. 18.- Medida de distintos parámetros de FI a distintos días de almacenamiento en limones infectados mediante punción en la piel con *P. digitatum*.

### A.5.2.2.- Fluorescencia multispectral

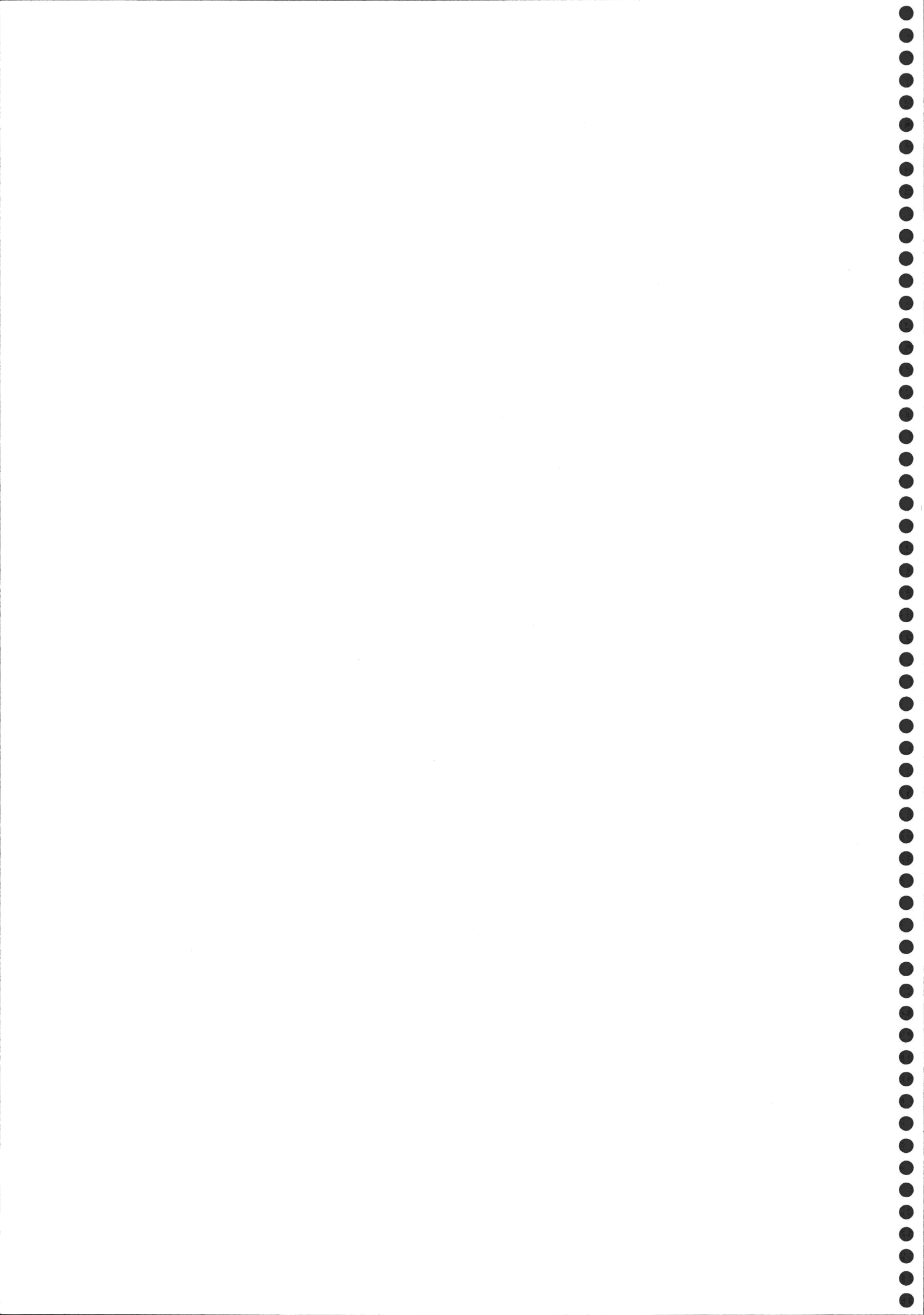
Mediante la excitación de una hoja en el rango UV-A a una  $\lambda$  de 355 nm, se detecta emisión de fluorescencia a 4 diferentes longitudes de onda, 440, 520, 690 y 740 nm, en las zonas del azul, verde, rojo y rojo lejano. La fluorescencia en el rojo es emitida por la clorofila como anteriormente señalamos, la verde y azul por diversos fenoles vegetales como los ácidos cinámicos, flavonoles, etc. presentes en la epidermis foliar. La emisión de estos distintos tipos de fluorescencia no es homogénea en la hoja, la verde-azul es particularmente alta en la zona de nervios foliares mientras que la roja y del rojo lejano es más intensa en el resto del mesófilo. Con estos fundamentos, los grupos de Lichtenthaler y Sowinska (Karlsruhe-Estrasburgo) han diseñado un equipo LIF (Laser induced fluorescence) que ha demostrado su eficacia en la detección de distintos tipos de estrés biótico y abiótico y han postulado asimismo que las imágenes digitales obtenidas del cociente entre la emisión de fluorescencia a las distintas longitudes de onda, como son las correspondientes a azul/rojo (F440/F690), azul/rojo lejano (F440/F740) y rojo/rojo lejano (F690/F740) son muy sensibles a variaciones en las condiciones ambientales y de crecimiento de las plantas, constituyendo un buen marcador de estrés. El tipo de estrés que se infringe a una planta y la respuesta de ésta condicionan qué parámetro de fluorescencia o cociente cambia, aumentando o disminuyendo (Lichtenthaler y Miehe 1997). Las imágenes de fluorescencia y los cocientes LIF permitían un análisis de cambios en la emisión de fluorescencia inducidos por distintas situaciones de estrés y que se manifestaban como gradientes dentro de la hoja, cambios locales o siguiendo determinadas zonas de la anatomía foliar, todo ello en un estadio muy temprano previo a la aparición de síntomas. Así pudo estudiarse el efecto del estrés hídrico, por temperatura y de ambos estreses combinados con el lumínico en plantas de *Rhododendron* (Lang y col. 1996). La captación de herbicidas por la planta y la consiguiente disminución de la actividad fotosintética, pudo visualizarse también por el sistema LIF. El diuron, un inhibidor del transporte electrónico en el PSII, inducía cambios en la emisión de fluorescencia roja fundamentalmente asociados a los nervios foliares donde el herbicida se expandía (Lichtenthaler et al 1996, Lichtenthaler et al., 1997), fácilmente visible en las imágenes del parámetro conocido como índice de vitalidad  $R_{Fd}$  (Lichtenthaler y Rinderle, 1998; Babani y Lichtenthaler 1996). Deficiencias nutricionales (Fe, Mn, Zn, N) fueron también diagnosticadas con

el mismo sistema, siguiendo el mismo protocolo (Heisel y col. 1996) El sistema LIF puede trabajar también a larga distancia permitiendo desarrollar medidas de la emisión de clorofila por teledetección, de aplicación en agricultura, bosques e investigación ambiental (Sowinska y col. 1996). Permiten además una administración controlada de nutrientes fitosanitarios (herbicidas, fungicidas, insecticidas). A partir del equipo LIF (laser-FIS), costoso por el uso del láseres, los mismos equipos han diseñado uno más compacto y económico, flash-lamp induced fluorescence imaging system (FL-FIS) usando lámparas de Xenon para la luz de excitación. Con él se ha seguido el descenso de la actividad fotosintética por estrés hídrico en plantas de judía mediante la obtención de imágenes correspondientes a  $R_{Fd}$  y  $Fm/Fs$ . Buschmann y Lichtenthaler (1997) resumen en una revisión el efecto de otros factores de estrés en la fluorescencia de las 4 bandas de color mencionadas. Los tratamientos foto inhibitorios en zonas concretas de hojas de maíz producían una bajada de la fluorescencia de la clorofila en el rojo y el rojo lejano, mientras que la fluorescencia verde-azul no cambiaba en esas zonas. Plantas de tabaco irradiadas con luz UV-A mostraban una bajada de la fluorescencia en el rojo y el infrarrojo (F690, F740), mientras que la fluorescencia azul y verde F440, F520 incrementa respecto a los controles, de forma más marcada en la segunda, cambio probablemente relacionados con la producción de flavonoides u otros productos del metabolismo secundario. Usando imágenes de parámetros de F a las distintas longitudes de onda, podían diferenciarse hojas expuestas al sol y a la sombra o aquellas hojas con distinta concentración de clorofila en una misma planta, así como el haz y el envés de una hoja o las zonas verdes y cloróticas de una hoja variegada.

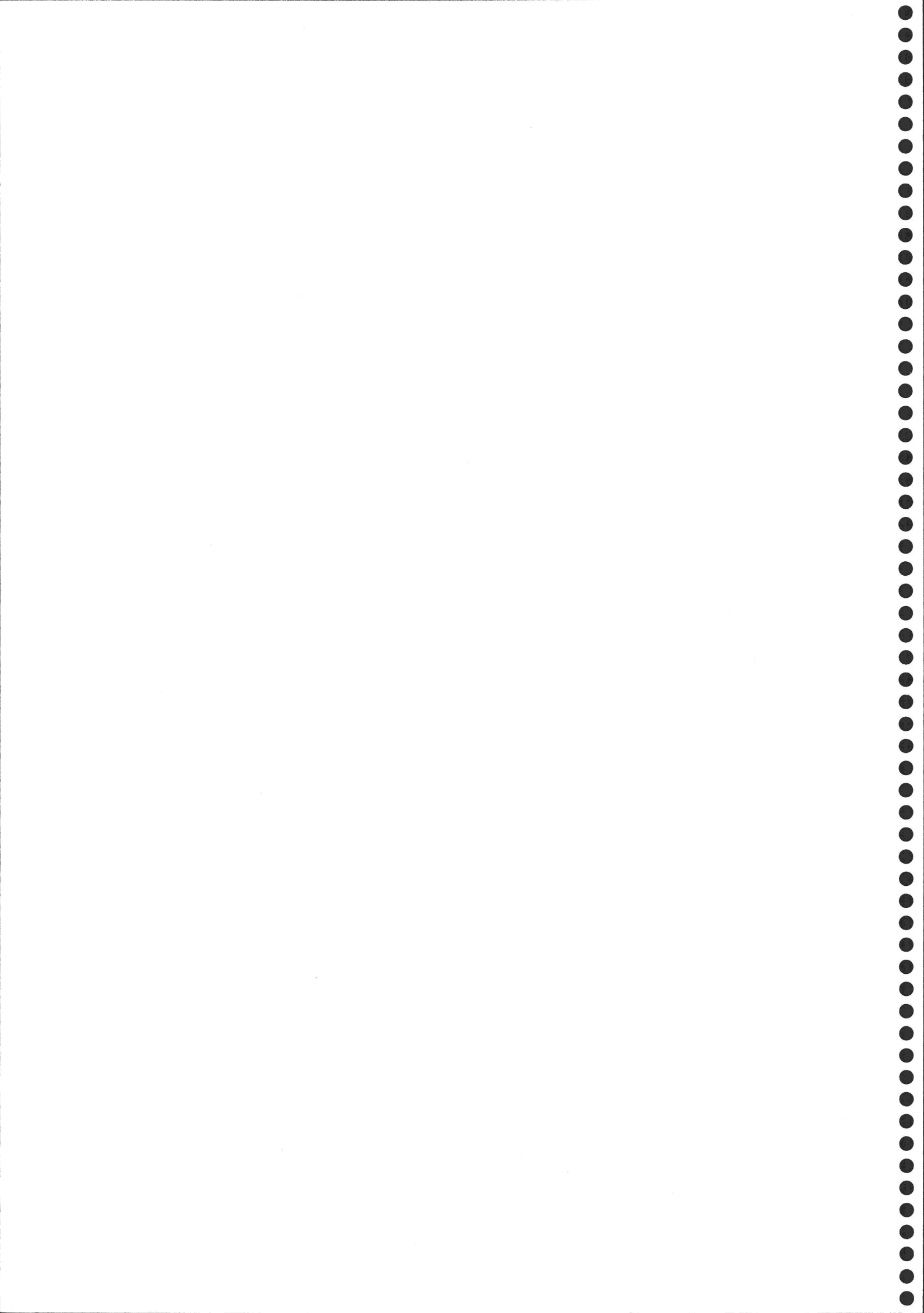
Estudiando infección por patógenos se obtuvieron imágenes de fluorescencia en el rojo-infrarrojo y verde-azul de hojas de tabaco infectadas por mosca blanca que muestran la última distribuida fundamentalmente en los nervios foliares y la primera en el resto del mesófilo. Aparecen también puntos brillantes de F verde-azul debido a la síntesis de compuestos fenólicos o estilbenos como defensa frente a la infección (Buschman y Lichtenthaler, 1997). Cuando se investigaron hojas de *Phaseolus vulgaris* atacadas por ácaros, se comprobó que hay un incremento notable de la F azul, menos acusado en la verde con el consiguiente incremento en F440/F690 y la F en el rojo e infrarrojo F690/F740 decrecen en menor grado.

Otras técnica de imagen como la termografía, donde se detectan incrementos locales en temperatura por detección con cámara de infrarrojos asociados a la producción de ácido salicílico, han permitido también la visualización preS de las interacciones virus-planta (Chaerle y col., 1999; Chaerle y col., 2001; Chaerle y van de Straeten, 2000). La asociación de ambas técnicas, FI y termografía, permitirá en un futuro cercano enormes avances en el diagnóstico del estrés vegetal. Los grupos de Valcke y van de Straeten (<http://www.plantgenetics.rug.ac.be/~lacha>) ya han construido un equipo robotizado con estas características.

Históricamente cambios tempranos inducidos por el estrés vegetal eran detectados por técnicas bioquímicas y moleculares que llevaban a la destrucción de la muestra. Las técnicas de imagen permitirán un diagnóstico (monitorización) rápido y presintomático para el manejo de cosechas en una agricultura de precisión. Ello permitirá el rastreo de cultivos para la búsqueda de mutantes tolerantes a estrés. En el laboratorio facilitará el aislamiento de genes inducidos preSmente. La fluorescencia multiespectral facilitará estudios del metabolismo secundario en plantas que sufren de estrés. Y el conjunto de técnicas FI podrán ser aplicadas desde la escala microscópica hasta por control remoto en la agricultura del siglo XXI (Chaerle y van de Straeten, 2001).



~ OBJETIVOS (OBJECTIVES) ~



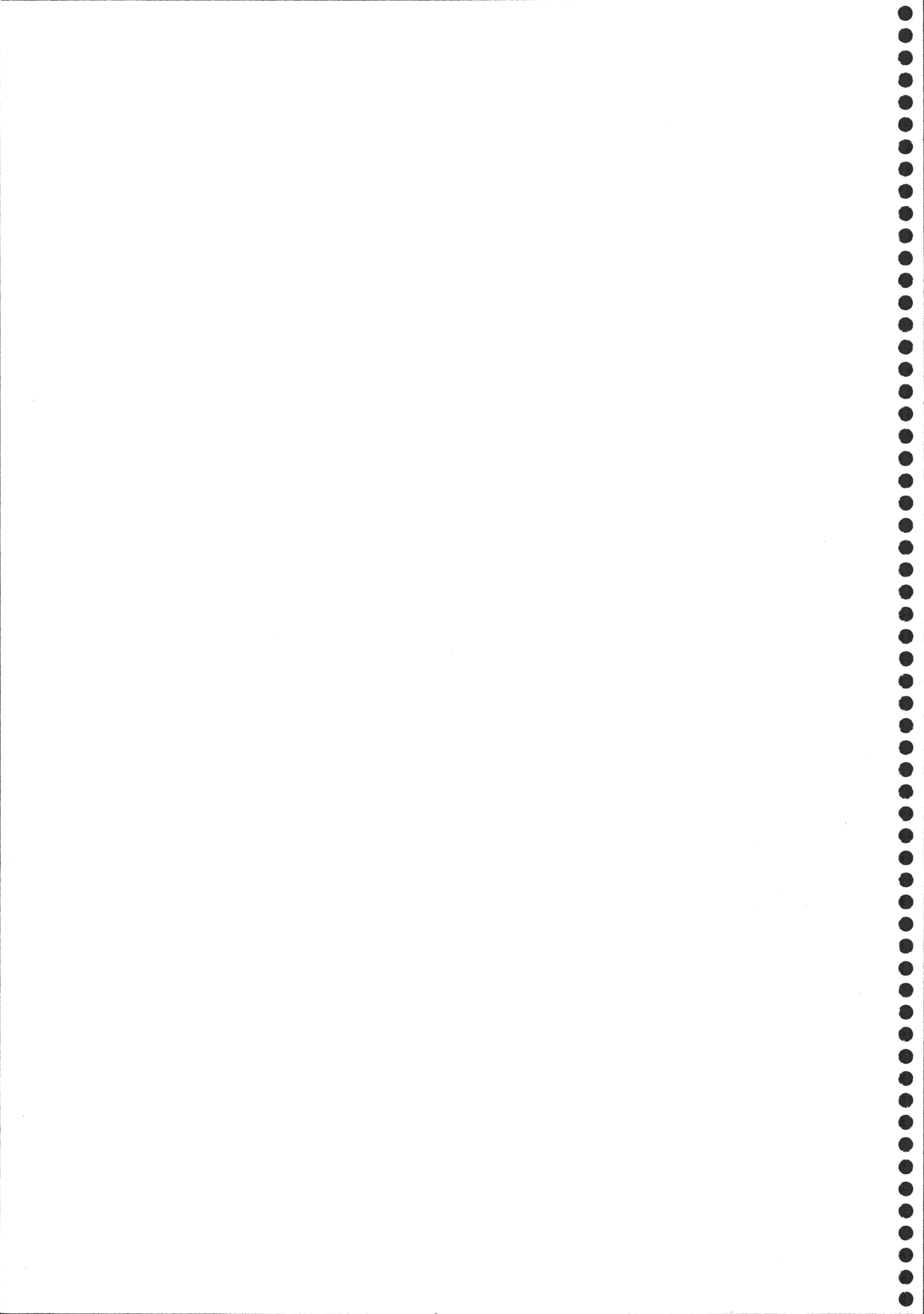


Los objetivos perseguidos en el desarrollo de esta Tesis Doctoral han sido:

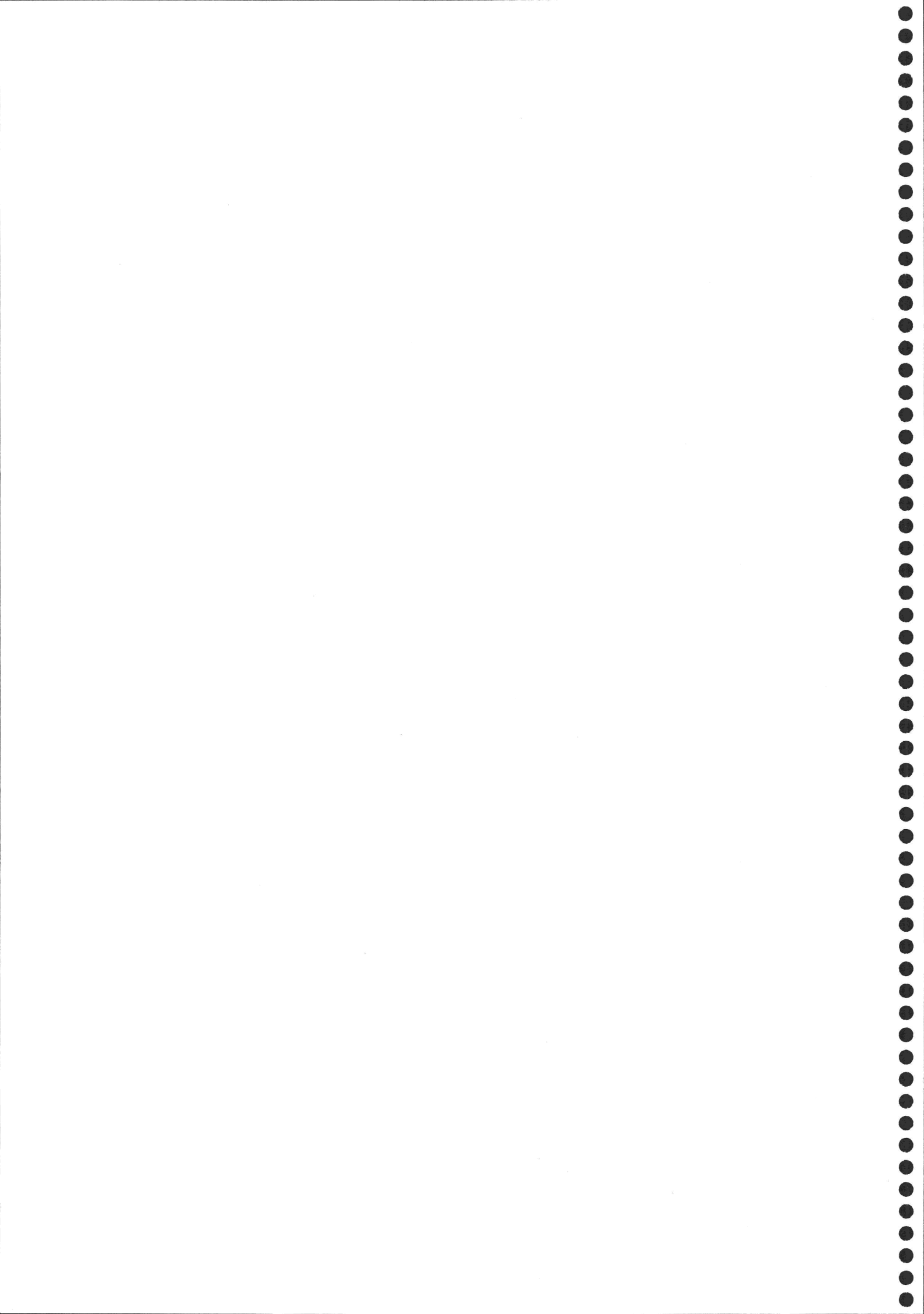
- 1.- Clonación y caracterización de los genes *psbO*, *psbP* y *psbQ* codificantes de las proteínas del OEC en *N. benthamiana*.
- 2.- Identificación y estudio de las familias multigénicas que codifican las proteínas OEC y caracterización de las correspondientes familias proteicas en *N. benthamiana*.
- 3.- Análisis del efecto de la infección viral por PMMoV-S y PMMoV-I en la biosíntesis de las proteínas del OEC en plantas de *N. benthamiana* infectadas.
- 4.- Seguimiento mediante FI de los cambios inducidos en la actividad del PSII y en el aparato fotosintético por la infección por PMMoV-S y PMMoV-I. Análisis de mecanismos de defensa del cloroplasto frente a estrés biótico.
- 5.- Investigación de los cambios en la ultraestructura del cloroplasto en plantas de *N. benthamiana* infectadas con PMMoV-S y PMMoV-I.

The aims of this work were:

- 1.- Cloning and characterization of genes *psbO*, *psbP* y *psbQ* codifying for OEC proteins in *N. benthamiana*.
- 2.- Identification and study of the multigene families codifying for the OEC proteins, and characterization of the corresponding protein families in *N. benthamiana*.
- 3.- Analysis of alterations in the OEC protein biosynthesis induced by PMMoV-S and PMMoV-I infection in *N. benthamiana* plants.
- 4.- Screening by mean of FI of changes on PSII induced by the infection with PMMoV-S y PMMoV-I. Analysis of chloroplast defence mechanisms against biotic stress.
- 4.- Characterization of ultrastructural changes on chloroplast of *N. benthamiana* plants infected by PMMoV-S and PMMoV-I.



*~ MATERIAL Y MÉTODOS ~*



### C.1.- Material biológico. Hospedador experimental y virus.

Como modelo experimental de interacción compatible huésped-parásito se utilizó el sistema *Nicotiana benthamiana* y los tobamovirus del moteado suave del pimiento, el aislado en Sicilia (Italia) denominado PMMoV-I, y el aislado en Almería (España), llamado PMMoV-S, descritos por Wetter y col. (1984) y Alonso y col. (1989), respectivamente.

Las plantas de *N. benthamiana* se mantuvieron en cámaras de cultivo tipo ASL, Microclimat a una temperatura de 25°C / 20°C (día / noche) con una humedad relativa del 80%, un fotoperiodo de 16 h e iluminación de 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Fueron inoculadas en las tres primeras hojas, cuando tenían 5 - 6 completamente formadas (ver fig. 19), con 50  $\mu\text{l}$  de una suspensión conteniendo 50  $\mu\text{g/ml}$  de los virus purificados en tampón de inoculación (fosfato sódico 20 mM a pH 7.0). Para facilitar

la infección, se utilizó como abrasivo carborundo (Csi 600, Carlo Erba). Como control de los experimentos se utilizaron siempre plantas sanas tratadas en paralelo con tampón de inoculación.

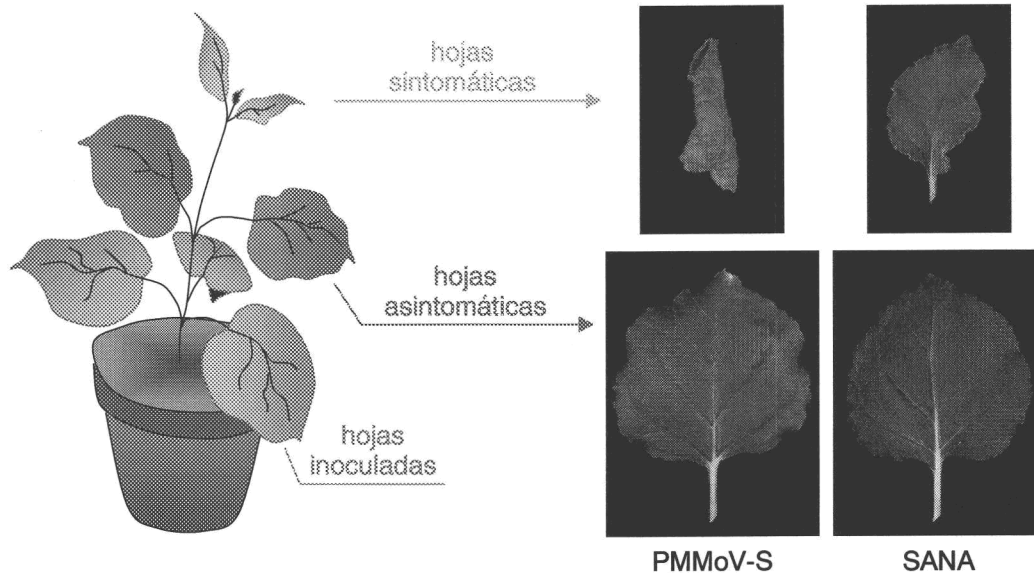


Fig. 19.- Representación esquemática de los distintos tipos de hoja de *N. benthamiana* a lo largo de la infección. Las fotografías corresponden con hojas S y AS de plantas inoculadas con PMMoV-S a 21 d.p.i. (izquierda) y las hojas equivalentes en una planta sana de la misma edad (derecha).

Para los distintos ensayos distinguimos entre hojas asintomáticas (AS) y sintomáticas (S) (ver fig. 19). Las primeras, ya formadas en el momento de la infección, no desarrollan síntomas visuales, frente a las hojas jóvenes que aparecen después y presentan un enrollamiento muy acusado a partir de 4 ó 6 días después de la inoculación. Los controles en plantas sanas corresponden a hojas jóvenes y viejas (de edad similar). En la infección de *N. benthamiana* con PMMoV-I la planta tiene la capacidad de recuperarse a partir de los 23 - 25 d.p.i. de los síntomas en las hojas jóvenes y éstas aparecen sin curvar y más pigmentadas incluso que las correspondientes hojas control. Por tanto, para un adecuado seguimiento del

desarrollo de la infección con los dos virus, las tomas de muestra en todos los ensayos realizados a lo largo de este trabajo tuvieron lugar a 7, 14, 21 y 28 d.p.i.

## **C.2.- Preparación de muestras en electroforesis**

### **C.2.1.- Preparación de fracciones cloroplastídicas**

#### **C.2.1.1.- Obtención de membranas tilacoidales**

Se sigue el procedimiento de Ford y Evans (1983) con algunas modificaciones. El tejido vegetal es homogeneizado en un tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.4, sacarosa 300 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM en una proporción 1/4 (m/v). La mezcla se filtra a través de dos capas de gasa de nylon para eliminar los restos de tejido y se centrifuga 15 min a 3000 g en centrífuga Sorvall refrigerada a 4°C. El sedimento se lava con el mismo tampón y se suspende en una solución hipotónica,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, a la que se añade igual volumen de un tampón MES-NaOH 5 mM a pH 6.5, NaCl 15 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM, para centrifugar a 3000 g durante 10 min. El sedimento de membranas tilacoidales se conserva en tampón MES-NaOH 50 mM pH 6.5, sacarosa 400 mM, NaCl 15 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM

#### **C.2.1.2.- Obtención de preparaciones enriquecidas en PSII**

Se realiza según el método descrito por Berthold y col. (1981) y posteriormente modificado por Arellano y col. (1994) para la eliminación de contaminaciones nucleares. La suspensión de membranas tilacoidales con una concentración de 2 mg/ml de chl, es solubilizada con Tritón X-100 al 20% (p/v) en MES-NaOH 5 mM a pH 6.5, NaCl 15 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM en proporción 25:1 (mg Tritón X-100 / mg chl) y manteniendo la muestra a 4°C protegida de la luz. Pasados 20 min en agitación, se centrifuga 5 min a 12000 g y el sobrenadante se vuelve a centrifugar 30 min a 40000 g. El sedimento se suspende en tampón MES-NaOH 5 mM a pH 6.5, NaCl 15 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM, se vuelve a centrifugar y finalmente es resuspendido en este mismo tampón.

### C.2.1.3.- Método de eliminación selectiva de polipéptidos OEC de preparaciones de PSII

Para obtener las tres proteínas del OEC del PSII se siguió el método descrito por Ljungberg y col. (1986 a y b) consistente en tratar preparaciones de PSII con una concentración de chl de 1 mg/ml con un volumen equivalente de tampón Tris-HCl 1.6 M a pH 8.4 y agitar en oscuridad 20 min a 4°C. Tras una centrifugación de 30 min a 40000 g, se recoge el sobrenadante con las proteínas OEC, que puede concentrarse posteriormente por liofilización y, tras la suspensión en agua destilada, conservarse a - 80°C.

### C.2.1.4.- Determinación de clorofila

Para medir la concentración de chl en muestras cloroplásticas, se realiza una extracción en acetona al 80% y se mide espectrofotométricamente la absorbancia de la solución a 652 nm. Los cálculos se realizan según Lichtenthaler (1987)

$$C \text{ (mg/ml)} = \frac{27.8 \cdot DO_{652} \cdot \text{volumen}}{\text{factor de dilución}}$$

### C.2.2.- Extracto total de hoja

Para obtener extracto total de hoja, se homogeneizan muestras de 100 mg en tubos eppendorf con nitrógeno líquido y la ayuda de varillas para tubo eppendorf y se solubilizan las proteínas con tampón de carga de electroforesis monodimensional (Tris-HCl 62.5 mM a pH 6.8, SDS 4%, β-mercaptoetanol 2%, glicerol 20% y azul de bromofenol 0.02%).

### C.3.- Análisis electroforético de proteínas

Para el análisis electroforético, tanto de extractos totales de hoja como de preparaciones cloroplásticas, hemos utilizado básicamente la electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida en presencia de SDS según Laemli



(1970) y la electroforesis bidimensional (2D) siguiendo el protocolo de O'Farrell y col. (1977).

### C.3.1.- Análisis electroforético monodimensional

Esta técnica se ha utilizado para una primera aproximación al análisis del patrón polipeptídico, para el desarrollo de la segunda dimensión en la electroforesis 2D y como paso previo a la transferencia de proteínas a PVDF o nitrocelulosa.

Se utilizaron los equipos Mini-Protean y Protean X 2i ambos de Bio-Rad con tamaños de gel de 6x8 cm y 14x16 cm, respectivamente. La composición del gel es idéntica en ambos casos. Para el gel separador, acrilamida 15%, bisacrilamida 0.4%, SDS 0.1%, urea 4 M, Tris-HCl 375 mM a pH 8.8, TEMED 0.05 % y PSA 0.1% y para el gel concentrador, acrilamida 5%, bisacrilamida 0.13%, Tris-HCl 125 mM a pH 6.8, SDS 0.1%, TEMED 0.05% y PSA 0.1%. El tampón de desarrollo de la electroforesis es Tris 25 mM, glicina 190 mM y SDS 0.1%.

Las muestras se solubilizan incubándolas 5 min a 95°C y 20 min a 37°C en tampón de carga Tris-HCl 62.5 mM a pH 6.8, SDS 4%,  $\beta$ -mercaptoetanol 2% y glicerol 20%. En el caso de preparaciones cloroplastídicas se suele cargar el equivalente a 8  $\mu$ g de chl, mientras que en el caso de extracto total de hoja se carga el equivalente a 1 mg de tejido.

La electroforesis se desarrolla en el caso de los geles pequeños a un voltaje constante de 100 V durante aproximadamente dos horas mientras que para los geles grandes se usa un amperaje constante de 30 mA. durante unas 14 horas. Finalizada la electroforesis, los geles se tiñen en una solución de azul Coomassie (Brilliant Blue R 250, Sigma) al 0,01% en metanol:ácido acético:agua (40:10:50) durante 15 min y se decoloran en metanol:ácido acético:agua (40:10:50).

### C.3.2.- Análisis electroforético bidimensional

La electroforesis bidimensional consiste en una separación secuencial de los polipéptidos primero en una dimensión según su punto isoeléctrico, denominada isoelectroenfoque (IEF), y después en una segunda según su tamaño (SDS-PAGE).

### C.3.2.1.- Preparación de la muestra

La preparación de las proteínas para la primera dimensión depende del tipo de muestra del que se parta:

#### a) Membranas tilacoidales:

La solubilización de la muestra se realiza siguiendo esencialmente el protocolo de Schuster y Davis (1983) con modificaciones que a continuación se detallan. Se suspenden 200  $\mu$ l de membranas con una concentración de Chl de 250  $\mu$ g/ml en igual volumen de tampón de extracción (sacarosa 0.7 M, Tris 0.5 M, 30 mM HCl, EDTA 50 mM, KCl 0,1, 2-mercaptoetanol y PMSF 2 mM) para homogenizarlas y posteriormente incubarlas durante 10 min a 4°C. Se añaden 400  $\mu$ l de fenol saturado en Tris-HCl 1 M a pH 6,8, se agita vigorosamente durante 10 min a temperatura ambiente y tras una centrifugación de 10 min a 20000 rpm en microcentrífuga, se separan la fase acuosa de la fenólica y ésta se vuelve a tratar hasta tres veces con igual volumen de la solución acuosa. Por último, las proteínas se precipitan de la fase fenólica a - 20°C durante 12 horas con 5 volúmenes de acetato amónico 0.1 M en metanol. Tras centrifugar 10 min a 20000 rpm, el sedimento sufre tres lavados con acetato amónico 0.1 M en metanol y uno con acetona fría, seguidos de centrifugación en las condiciones anteriores. La muestra así obtenida se seca en corriente de nitrógeno y se solubiliza durante 1 h a 37°C en el tampón de carga para IEF urea 9.2 M, CHAPS 3.5% (p/v), NP-40 1%, PMSF 2 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2%, y anfolitos (Bio-Rad) al 5% (2.5% rango de pH 3-10, 1.5% pH 4-6 y 1% pH 5-7).

#### b) Proteínas OEC:

La solución de proteínas OEC, unos 100  $\mu$ l de la preparación anterior, obtenida a partir de partículas enriquecidas en PSII según se describe en el aptdo. C.2.1.2., se precipita a 4°C durante 10 min con 8 volúmenes de acetona fría, se centrifuga 10 min a 20000 rpm en microcentrífuga y el sedimento resultante se seca bajo corriente de nitrógeno. Finalmente la muestra se resuspende en el tampón de carga para IEF ya descrito.

### C.3.2.2.- Primera dimensión (IEF)

El protocolo original es de O'Farrell y col. (1977). La primera dimensión se desarrolla en geles de poliacrilamida en disco que polimerizan en tubos de cristal con un diámetro interno de 2.5 mm y 10 cm de longitud. La composición de estos geles es acrilamida 5%, bisacrilamida 0.13%, urea 9.5 M, CHAPS 3.5%, NP-40 1.5 %, anfolitos 5% (2.5% rango de pH 3-10, 1.5% pH 4-6 y 1% pH 5-7), PSA 0.1 % y TEMED 0.1%.

Una vez cargadas las muestras se cubren con una solución 5 M de urea. El IEF se desarrolla siguiendo un programa de tres fases de voltaje constante: 30 min a 200 V, 30 min a 300 V, 15 h a 400 V y 1 h a 800 V. La solución del ánodo es NaOH 50 mM y la del cátodo es H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM. Finalizado el IEF, los geles se incuban durante 30 min y con dos cambios de la solución a temperatura ambiente en una solución de equilibrado del pH que sirve también de tampón de carga de la segunda dimensión (Tris-HCl 50 mM a pH 6.8, urea 6 M, glicerol 30%, SDS 4%, DTT 1% y azul de bromofenol 0.02%). Tras este paso, los geles de disco pueden ser usados inmediatamente para la segunda dimensión o congelados a - 20°C inmersos en el mismo tampón de equilibrado. En ambos casos antes de su uso se incuban a temperatura ambiente durante 1 h con el mismo tampón renovado, que se cambia cada 30 min.

### C.3.2.3.- Segunda dimensión

Se lleva a cabo en las condiciones descritas en el aptdo. C.3.1. Previamente se deposita el gel en disco en el espacio que normalmente corresponde a los pocillos y que se ha cubierto con una capa fina de agarosa al 0.8% en tampón Tris-HCL 125 mM pH 6.8, SDS 0.1%, para facilitar su adhesión. Este mismo tampón prepara las proteínas para que puedan correr la segunda dimensión en geles de poliacrilamida al 15% (descritos en el apartado C.3.1.).

### C.3.3.- Detección de proteínas por tinción de plata

La detección de las proteínas se realiza según Blum y col. (1987) con pequeñas modificaciones. Los geles se fijan 1 h en una solución de metanol 50%, ácido acético 12% y formaldehído 0.0185%, seguido de tres lavados de 20 min, dos con etanol al 50% y uno con etanol al 30%. Tras una incubación de 1 min en una solución de tiosulfato sódico 0.02% (p/v), se lavan varias veces con agua destilada para eliminar el exceso de esta sal. Finalmente, se incuban 30 min en oscuridad en  $\text{AgNO}_3$  12 mM y formaldehído 0.03%, para lavar con agua destilada y revelar con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.6 M, formaldehído 0.0185% y tiosulfato sódico 0.0004 %. La reacción se detiene con una solución de metanol 50% y ácido acético 12% (v/v).

### C.3.4.- Transferencia electroforética de proteínas a membrana de nitrocelulosa (western blotting). Inmuno-revelado

La transferencia de las proteínas separadas por electroforesis mono o bidimensional se llevó a cabo a membranas de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore) para posterior inmunodetección de las proteínas de interés. Se siguió el método original de Towbin y col. (1979). Una vez desarrollada la electroforesis, el gel correspondiente y la membrana de nitrocelulosa se equilibran en el tampón de transferencia Tris 25 mM, glicina 190 mM y metanol 20% y la transferencia se realizó en un equipo Bio-Rad (Trans Blot Cell, Munich) en cubeta refrigerada a 4°C a intensidad de corriente constante de 250 mA durante 1.5 h.

Para el inmuno-revelado se incubaba la membrana de nitrocelulosa en PBSA durante 30 min y posteriormente con el anticuerpo primario deseado diluido en PBSA, 16 h a 4°C. Tras tres lavados de 15 min de la membrana en PBS, se incubaba 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario preparado en PBSA (1:1000 si se trata de anticuerpo conjugado a peroxidasa (anti-rabbit IgG, SIGMA) ó 1:5000 si es GARPO (Pharmacia)), ambos conjugados a peroxidasa. Antes del revelado, se lava de nuevo la membrana tres veces durante 15 min con PBST. Con el primer anticuerpo secundario el inmuno-revelado se llevó a cabo mediante una reacción coloreada, para lo que el revelado se realiza sumergiendo la membrana en una solución en PBS de 2-propanol al 20%, 4-cloro-1-naftol al 0.08% y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.0003%.

Cuando la señal tiene suficiente intensidad se para la reacción con agua. Cuando se utilizó el segundo anticuerpo secundario el revelado se realizó por una reacción de quimioluminiscencia con ECL (Pharmacia), siguiendo las instrucciones del proveedor. En este caso la reacción enzimática produce un compuesto luminiscente detectado mediante películas sensibles a rayos X (Hyperfilm, Pharmacia).

### C.3.5.- Secuenciación del extremo N-terminal de proteínas

Una vez finalizada la electroforesis tal y como se ha descrito en el apartado C.3.4. de *M. y M.*, se procede a la transferencia de las proteínas separadas a membranas de PVDF (Sequi-Blot PVDF, Bio-Rad) para posteriormente secuenciar su extremo N-terminal. El protocolo de transferencia es similar al descrito en el apartado anterior, con dos modificaciones sustanciales: La membrana de PVDF se equilibra previamente en metanol puro y todos los disolventes utilizados en el tampón de transferencia o soluciones de tinción y destinción, como metanol y ácido acético, deben tener grado de pureza para HPLC. Transferidas las proteínas son localizadas por tinción suave (1 min) con una solución al 50% en metanol, 0.1% azul Coomassie (Brilliant Blue R-250, Sigma) y 10% ácido acético (HPLC). Posteriormente se lava la membrana con una solución metanol:ácido acético:agua (50:10:40) y finalmente se recortan las manchas correspondientes a las proteínas deseadas para iniciar el protocolo de secuenciación.

La microsecuenciación del extremo N-terminal de las proteínas seleccionadas se llevó a cabo mediante la reacción de degradación de Edman.

### C.4.- Impronta de hojas

Esta técnica consiste en la impresión del tejido a estudiar en una membrana de nitrocelulosa o PVDF. La detección de proteínas puede llevarse a cabo mediante anticuerpos específicos o por actividad enzimática. La localización del virus dentro de la hoja se realiza mediante el uso de un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína de la cápsida de los dos tobamovirus utilizados en este trabajo dada su homología en secuencia y estructura. Este anticuerpo, obtenido a partir de virus

purificado de planta, dio señales inespecíficas que fueron eliminadas por reabsorción del suero con un extracto acetónico total de hoja y tallo de plantas jóvenes de *N. benthamiana*.

En nuestro caso, se realizaron impresiones en membranas de nitrocelulosa de hojas completas, S y AS, de plantas infectadas con PMMoV-I y S y las correspondientes sanas. Una vez hecha la impresión de las hojas y secas las membranas, se lavan estas 15 min con tampón L1 (Tris-HCl 0.1 M a pH 8.0, Tween 20 0.3%) y se bloquean 30min en tampón B (BSA 0.25 %, gelatina 0.25%, Tris-HCl 0.1 M a pH 8.0, Tween 20 0.3%). Posteriormente se incuban 16 h con el anticuerpo primario específico de la cápsida del virus a una concentración adecuada en tampón B, se hacen 3 lavados de 10 min en tampón L1 fresco y se incuban 1 h con el anticuerpo secundario (GARPO, Sigma), que está conjugado con fosfatasa alcalina, en una dilución 1:5000 en tampón B. Se lavan 10 min en tampón L1 fresco, dos veces 15 min en tampón L2 fresco (Tris-HCl 0.1 M a pH 8.0, Tween 20 0.3%, SDS 0.05%) y 10 min en L1 para eliminar el SDS. Después se equilibran 10 min en tampón para la fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM a pH 9.5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) y se revela con un volumen de este tampón, un tercio de volumen de solución de NBT al 5% en DMF al 70% y un sexto de solución de BCIP al 5% en DMF al 100%. La reacción coloreada se detiene con agua.

### **C.5.- Electroelución de proteínas**

Este proceso se empleó para recuperar las proteínas de los geles tras realizar la electroforesis en la forma que se detalla en el aptdo. C.3.1., con la finalidad de obtener posteriormente sus respectivos anticuerpos. Las bandas correspondientes a cada una de las proteínas de interés son cortadas, troceadas y electroeluídas mediante un equipo de Bio-Rad modelo 422, siguiendo el protocolo de Matsudaira (1987) y se utiliza tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 190 mM y SDS 0.1%) para aplicar una corriente de 15 mA por muestra a eluir. Se usan membranas con un tamaño de poro de 3,5 kDa.

Los polipéptidos se recuperan en un volumen aproximado de 1 ml y cada solución es dializada en NaHCO<sub>3</sub> 0.2 M, SDS 0.02% a 4°C para eliminar compuestos tóxicos para el animal de experimentación.

### C.6.- Obtención de anticuerpos policlonales

Para la obtención de anticuerpos policlonales específicos para las proteínas de PsbO y PsbP fueron inoculadas en conejo, previamente emulsionadas en coadyuvante. PsbO se inyectó en la pata vía intramuscular mientras que PsbP fue inyectada en el cuello vía subcutánea. Posteriormente, el suero resultante de la sangría total de los animales fue titulada.

### C.7.- Clonación de secuencias de cDNA

#### C.7.1.- Oligonucleótidos utilizados

La numeración de los oligonucleótidos utilizados hace referencia a las colecciones del laboratorio de la Dra. Isabel García Luque y son los siguientes:

101: 5' TACCACTACAATGGATG 3'

102: 5' AGATGGTGCACGATGCA 3'

110: 5' CCAAGGCCT<sub>18</sub> 3'

lsu5: 5' ATGGCCACAACGTATGGACCGA 3'

lsu3: 5' ACCAGACATACGTAACGCTTTTGC 3'

33a: 5' GAAGGTGTTCCAAAACGT 3'

33b: 5' CGCTCACCACCAGGAAGCTGAACTG 3'

24a: 5' CTGCAGATGCTGCTTATGGAGAAGC 3'

24b: 5' GATTCAAATCCACCCTCTGAATCAGT 3'

24c: 5' CAAGCTGGTGACAAGAGATGG 3'

24d: 5' GTGCATAAAAAGCACAACCTCATATGCTTAC 3'

24e: 5' AGAGGGGGGAGAACTAAGTACATAC 3'

24f: 5' TGCTTTAGGCCAAGCTCAATACTC 3'

16a: 5' AACTCGGATGAGGCAAGGGACTT 3'

16b: 5' GGGCTGTTCTTGGTCTTTGCTGCATGG 3'

F24: 5' CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC 3'

R24: 5' AGCGCATAACAATTTACACAGGA 3'

NUP: 5' AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT 3'

UPN: 5' CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT 3'

### C.7.2.-Manipulación de *E. coli*

Para la clonación y la multiplicación de los distintos plásmidos se han utilizado las cepas DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983): *supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) DE(*argF-lac*)169 y SURE (Stratagene): e14<sup>-</sup>(McrA<sup>-</sup>)  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171 *endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5* (Kan<sup>r</sup>) *uvrC* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>Z* $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>d</sup>)]<sup>c</sup>.

#### C.7.2.1.- Medios de cultivo, mantenimiento y crecimiento

Las bacterias transformadas con los distintos plásmidos fueron crecidas a 28°C en medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook y col., 1989), suplementado con ampicilina (50-100  $\mu$ g/ml). El crecimiento en medio sólido se llevó a cabo en placas de Petri en medio LB que contenía 1,8% de agar.

#### C.7.2.2.- Obtención de bacterias competentes y transformación

Se han seguido dos protocolos diferentes para la transformación de *E. coli*, mediante choque térmico y electroporación.

En el primer caso, la preparación de las células competentes se llevó a cabo según se describe en Inoue y col. (1990). Para la transformación, las células competentes se incuban con el plásmido 30 min en hielo, un minuto a 42°C y se siembran en placa sobre medio LB-agar.



Para la preparación de células electrocompetentes, una colonia bacteriana aislada se hace crecer en 10 ml de medio LB a 28°C durante 12 horas. Posteriormente, 0.5 ml de este cultivo se utilizan para inocular 500 ml de medio LB sin NaCl y se deja crecer hasta que la absorbancia a 600 nm sea 0.4 - 0.5. Las bacterias se recogen por centrifugación durante 15 min a 2600 g a 4°C, y el precipitado se suspende en 450 ml de glicerol al 10% estéril. Se repite la centrifugación tres veces, suspendiendo el precipitado sucesivamente en 250, 10 y 2 ml de glicerol al 10%. Finalmente, la suspensión bacteriana se alicuota en 50 µl y se conserva a - 80°C.

La transformación con el DNA plasmídico se llevó a cabo por electroporación en un aparato Bio-Rad Gene Pulser, utilizando unas condiciones de 2.2 kV, 25 µF y 200 Ω para cubetas de 0.4 mm de espesor.

### **C.7.3.- Preparación y análisis de ácidos nucleicos**

#### **C.7.3.1.- Purificación de DNA plasmídico**

La purificación de los plásmidos a pequeña escala se llevó a cabo por el método de lisis alcalina descrito por Sambrook y col. (1989).

Para cultivos superiores a 200 ml de medio de cultivo, los plásmidos fueron purificados por cromatografía mediante el "Plasmid Midi kit" de QUIAGEN, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

#### **C.7.3.2.- Purificación de DNA genómico de planta**

El DNA de *N. benthamiana* fue extraído del tejido aéreo de plantas jóvenes. Para ello, el tejido fue triturado en presencia de nitrógeno líquido, y se le añaden 2 ml/g de tejido de un tampón que contenía NaCl 1.4 M, CTAB al 2%, EDTA 20 mM,

Tris-HCl 100 mM a pH 8.0 y  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.2% para incubar a 60°C durante 30 min. A continuación se realizan dos extracciones consecutivas con un volumen de cloroformo:isoamilalcohol (24:1), centrifugando cada vez durante 10 min a 3000 g, y recogiendo la fase acuosa. El DNA se recoge de esta fase acuosa por precipitación con 0.7 volúmenes de isopropanol durante 12 - 16 horas a temperatura ambiente, y posterior centrifugación a 7000 g durante 5 min. El precipitado se lava con etanol frío al 70% y se vuelve a centrifugar. El pellet es secado a temperatura ambiente y se suspende en 0.9 ml agua/g tejido. Posteriormente, se le añade RNAasa A-libre de DNAasa (100  $\mu$ g/ml) y se incuba durante 30 min a 37°C. El DNA se recoge por precipitación con un volumen de acetato amónico 3 M a pH 7.7, y dos volúmenes de etanol 100% frío. Se centrifuga durante 20 min a 7000 g y se lava el precipitado con etanol al 70%, acetato sódico 0.3 M a pH 6.0, y después con etanol al 70%, para suspender en agua destilada y volver a precipitar el DNA con 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M a pH 4.8 y 2 de etanol al 100%. El precipitado se resuspende en agua y se limpia de proteínas, extrayendo dos veces con un volumen de fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1). Después se precipita el DNA con 0.11 volúmenes de acetato sódico 3 M a pH 4.8, y dos de etanol 100%, y el precipitado se resuspende en agua y se cuantifica.

#### **C.7.3.3.- Extracción de RNA total de plantas**

El RNA total de plantas fue extraído según el método de Logeman y col. (1987). Adicionalmente, y con el fin de eliminar azúcares de las muestras, a la solución de RNA purificado se le añaden 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M a pH 5.3 y se incuba durante 20 min en hielo. Se centrifuga 10 min a 15000 g en microcentrífuga, se recoge el sobrenadante y el RNA se precipita con 2.5 volúmenes de etanol al 100%. Tras incubarse a - 20°C, el RNA se recoge por centrifugación a 20000 g durante 10 min, se le añaden 0.5 ml de etanol al 70% y se centrifuga a 20000 g durante 5 min para suspender finalmente el precipitado en agua desionizada estéril.

#### C.7.3.4.- Análisis electroforético de DNA

Las muestras de DNA fueron analizadas por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 0.8 ó 1.2%, dependiendo del tamaño del fragmento a analizar, y que contenían bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Las muestras fueron diluidas con 0.1 volúmenes de tampón de carga (EDTA 50 mM a pH 8.0, azul de bromofenol 0.1%, xilencianol 0.1% y glicerol 50%) antes de ser colocadas en el gel. Como tampón de electrodos se utilizó TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM a pH 8.0) y el voltaje aplicado fue de 5 V/cm, dependiendo de los objetivos de la electroforesis. Las bandas fueron visualizadas mediante iluminación con UV.

#### C.7.3.5.- Purificación de DNA de geles de agarosa

La elución de fragmentos de DNA de geles de agarosa, una vez separados mediante electroforesis, se llevó a cabo mediante congelación-descongelación en presencia de fenol. Para ello, la banda de agarosa que contenía la banda de interés (Seakem GTG agarose, BMA) se trituró en presencia de fenol saturado en Tris en proporción 1:1. A continuación el homogeneizado se congeló a -70°C durante 5 - 10 min, y se centrifugó a 20000 g durante 15 min. Se recogió la fase acuosa y se sometió a dos extracciones consecutivas con fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25::24:1). Posteriormente, se le añadieron 0.11 volúmenes de tampón acetato sódico 3 M a pH 4.8 y dos volúmenes de etanol 100%, y se mantuvo durante al menos dos horas a -20°C. El DNA fue recogido por centrifugación y suspendido en agua desionizada estéril.

#### C.7.3.6.- Cuantificación de ácidos nucleicos

Las concentraciones de los ácidos nucleicos se determinaron espectrofotométricamente, aplicándole los coeficientes de extinción molar  $\epsilon_{260}$  de 25 (Kaper y col., 1971) para ácidos nucleicos monocatenarios y de 21 para los bicatenarios (Billeter y col., 1966).

### C.7.3.7.- Tratamiento enzimático del DNA

La manipulación enzimática del DNA con enzimas de restricción u otras enzimas modificadoras, se llevó a cabo siguiendo protocolos bien establecidos (Sambrook y col., 1989), así como las instrucciones de las casas proveedoras de las enzimas.

### C.7.3.8.- Amplificación de DNA mediante PCR

La amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador (GeneAmp PCR System 2440, Perkin Elmer) como se describe en Tenllado y col. (1994), utilizando las DNA polimerasas Taq (PROMEGA) o AmpliTaq (Roche). Las temperaturas de anillamiento en cada reacción fueron ajustadas en función de las temperaturas de fusión de los cebadores empleados. Como moldes hemos utilizado:

- plásmidos
- cDNA de una genoteca de *N. benthamiana*, clonada en el vector pACT2, que nos fue cedida por el Dr J. Bol, Wageningen (Holanda).
- cDNA obtenido por transcripción inversa de 0,5 µg de RNA total extraído de plantas de *N. benthamiana* sana, utilizando como cebador el oligonucleótido 110 y la enzima transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV RT), según se describe en Tenllado y col (1994).

En otros casos, la amplificación del DNA se llevó a cabo usando el SMART™ RACE Amplification kit, de Clontech, siguiendo las instrucciones recomendadas por el proveedor. Como molde para la reacción del cDNA se utilizaron 1 µg de RNA total extraído de plantas de *N. benthamiana* sanas, el oligonucleótido 110 y la enzima SuperScript II RNAasa H transcriptasa inversa (Gibco BRL). Para la PCR, se utilizó la DNA polimerasa Advantage 2 (Clontech).

Para confirmar las secuencias amplificadas se obtuvieron réplicas procedentes de sucesos independientes de PCR.

### C.7.3.9.- Clonación de DNA obtenido por PCR

Las bandas de DNA obtenidas por PCR fueron clonadas en el vector pGEM-T Easy, una vez purificadas de geles de agarosa, utilizando el kit pGEM-T Easy System (Promega), siguiendo las instrucciones del proveedor.

### C.7.3.10.- Selección y análisis de clones recombinantes

La selección de plásmidos recombinantes se realizó por el análisis del tamaño del inserto, mapa de restricción con enzimas adecuadas, y secuenciación. En algunos casos los plásmidos fueron seleccionados mediante análisis de Southern (apdo. C.7.3.11) o por hibridación de colonias.

Para la hibridación de colonias se siguió el protocolo descrito en Sambrook y col. 1989). Las colonias fueron transferidas a una membrana de nylon (Hybond-N, Pharmacia), fijándose el DNA a la membrana mediante irradiación con 120 mJ de luz UV en un aparato UV Stratalinker (Cultek).

Como sondas utilizamos fragmentos de DNA marcados por incisión ambulatoria "nick translation" con [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP, que fueron obtenidas mediante el kit Rediprime II (Pharmacia) y purificadas por columna de Sephadex G-25 (Quick Spin, Roche) en las condiciones recomendadas por los proveedores. Cuando utilizamos estas sondas de DNA marcadas radiactivamente, se siguió el protocolo descrito en Sambrook y col. 1989. Para ello, las membranas, una vez fijado el DNA, se incuban 1-2 horas a 65°C en solución de hibridación (SSC 6x, Denhardt 5x, SDS 0.1% y 100  $\mu$ g/ml DNA de esperma de salmón desnaturalizado) y se hibrida 16 horas a 65°C con la sonda específica en la solución de hibridación. A continuación se lavan dos veces en SSC 6x, SDS 0.1%, tres veces en SSC 2x, SDS 0.1%, y una vez en SSC 0.1x y 0.1% SDS. Todos los lavados se realizaron a 65°C durante 30 min cada uno. Una vez secas las membranas, éstas se exponen a películas sensibles a rayos X (Hyperfilm, Pharmacia).

En otros casos usamos sondas de DNA marcadas con digoxigenina-11-dUTP, que fueron sintetizadas usando el kit DIG-High Prime (Roche). Para la detección de las señales de hibridación por luminiscencia usamos el kit DIG luminiscence

detection (Roche). Las membranas fueron prehibridadas e hibridadas a 42°C en presencia de formamida al 50% en las condiciones recomendadas por el proveedor (Roche).

#### **C.7.3.11.- Detección de secuencias de DNA por hibridación (Análisis de Southern)**

Para el análisis de Southern de fragmentos de PCR, o de los productos de digestión de plásmidos recombinantes, los ácidos nucleicos fueron separados en geles de agarosa al 1.2%-TAE como se describe en el aptdo. C.7.3.4, antes de ser transferidos a membranas de nylon (Hybond-N, Pharmacia).

Para el análisis del DNA genómico, 10 µg de DNA fueron digeridos con 30 U de las enzimas de restricción Eco RV, Hind III y Xba I a 37 °C. Pasadas 16 h, se añaden otras 30 U de cada enzima y 20 µg de RNAasa A libre de DNAasas y se incuban durante 7 h. Las mezclas de digestión fueron separadas electroforéticamente en un gel del 1.2% de agarosa en tampón TAE con un voltaje constante (2.5 V/cm) durante 14 horas. Terminada la electroforesis se tiñe el gel en una solución de 1 µg/ml de bromuro de etidio en agua estéril durante 30 min y se destiñe en agua otros 30 min, antes de ser visualizado en presencia de luz UV. Posteriormente, el gel se ilumina con luz UV durante 5 min, y el DNA se desnaturaliza incubando el gel dos veces en solución de desnaturalización (NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M) durante 30 min. A continuación se incuban dos veces durante 30 min en solución de neutralización (NaCl 1.5 M y Tris 0.5 M a pH 7.4) y finalmente se equilibra el gel en SSC 20x durante 30 min. A continuación el DNA se transfiere por capilaridad a una membrana de Hybond-N (Pharmacia), como se describe en Sambrook y col. (1989).

El DNA transferido se fija a la membrana por irradiación con luz ultravioleta (120 mJ) en un UV Stratalinker (Cultek). Posteriormente, las membranas fueron hibridadas con sondas de DNA marcadas con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP o con digoxigenina-11-dUTP, en las condiciones descritas en el aptdo. C.7.3.10. de *M. y M.*

### C.7.3.12.- Detección de secuencias de RNA por hibridación (Análisis de Northern)

Para el análisis de Northern, las muestras de RNA (5 µg) se desnaturalizan a 55°C durante 15 min en presencia de MEN (MOPS 2 mM, acetato sódico 5 mM, EDTA 1 mM a pH 7.0), formamida 40%, formamida 12% y bromuro de etidio 0.06 mg/ml. A continuación se fraccionan en geles de agarosa al 1.5% en tampón MEN y formaldehído al 16%, utilizando como tampón de electroforesis MEN y aplicándosele una corriente de 7 V/cm. Una vez visualizados por iluminación con UV, los RNAs fueron transferidos por capilaridad a membranas de nylon (Hybond-N, Pharmacia), según se describe en Sambrook y col. (1989), y fijados a la membrana por irradiación con luz UV (120 mJ) en un aparato UV Stratalinker (Cultek).

Para la hibridación con sondas de DNA radiactivas, cuya obtención se describe en el aptdo. C.7.3.10, las membranas se incuban durante 1-2 h. a 42°C en solución de prehibridación (50% formamida, SSC 6x, SDS 0,5%, Denhardt's 5x y 100 µg/ml de DNA desnaturalizado de esperma de salmón) y se hibridan con la sonda específica de DNA durante 16 horas a 42°C en la solución de hibridación (formamida 50%, SSC 6x, SDS 0.5%, sulfato de dextrano 500 al 3.3%, y 100 µg/ml DNA desnaturalizado de esperma de salmón). Una vez hibridadas, las membranas son lavadas dos veces en solución SSC 2x, SDS 0.1% durante 15 min a temperatura ambiente en SSC 0.2x, SDS 0.1% durante 15 min a 48°C y por último en SSC 0.2x y 0.1% SDS durante 15 min a 58°C. Se dejan secar y se exponen en películas sensibles a rayos X (Hyperfilm, Pharmacia).

En otros casos usamos sondas de RNA marcadas con digoxigenina, que fueron sintetizadas usando el kit DIG-High Prime (Roche). Para la detección de las señales de hibridación por luminiscencia usamos el kit DIG luminiscence detection (Roche). Las membranas fueron prehibridadas e hibridadas a 42°C en presencia de formamida al 50% en las condiciones recomendadas por el proveedor (Roche).

Por último, también se obtuvieron sondas de DNA marcadas con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP mediante PCR. Para ello se utilizó como molde para la reacción 50 ng de plásmido conteniendo el fragmento que se desea utilizar como sonda y como cebadores los universales. Terminada la reacción, el fragmento sintetizado se purificó

en columnas de Sephadex G-25 (Quick Spin, Roche) y se hibridaron en las condiciones ya descritas anteriormente.

### C.7.3.13.- Sondas utilizadas

Las sondas utilizadas para analizar la acumulación de los mRNAs que codifican las proteínas del OEC fueron marcadas con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP tal y como se detalla en el aptdo. C.7.3.10 de *M. y M.*.

Las secuencias marcadas para la detección de los mRNAs Las secuencia utilizadas fueron los insertos de los clones p33-I-3P para el mRNA psbO, p24-II-3P para el pcbP y p16-I-3P para el psbQ. Para el estudio del genoma de *N. benthamiana* por Southern blot para *psbo*, *psbP* y *psbQ* se utilizaron como sondas los mismos fragmentos marcados, y como patrón de longitud de banda el fago  $\lambda$  digerido con EcoRI y HindIII.

Las sondas utilizadas para la detección de los mRNA *rca*, *gox*, *lhcb1* y *rbcL* se corresponden con las secuencias codificante del cDNA clonado en *N. benthamiana* como se detalla en el aptdo. C.7.3.9 de *M. y M.*.

Las sondas para la detección de los mRNA *psaK* y *rbcS* fueron obtenidas a partir un fragmento de cDNA correspondiente a su secuencia codificante; Y la secuencia marcada utilizada para la detección del mRNA *psbA*, correspondiente a un fragmento de su secuencia codificante y cedida por el Dr. R. Picorel.

El análisis de la acumulación de RNA viral se realizó utilizando como sonda un fragmento de cDNA, obtenido por PCR como se indica en el aptdo. C.7.3.9 de *M. y M.* y marcado con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP, correspondiente al fragmento del RNA genómico de PMMoV-S que incluye la región codificadora de la proteína de la cápsida (CP) y el extremo 3'-NC. Fue posible la utilización de la misma secuencia marcada como sonda para la detección del RNA de PMMoV-S y PMMoV-I debido a la alta homología de secuencia existente entre ambos en esta región.



### C.7.3.14.- Determinación de las secuencias nucleotídicas

Las secuencias nucleotídicas de los plásmidos recombinantes y de los fragmentos de PCR fueron determinadas en el servicio de secuenciación del CIB (CSIC) con un secuenciador automático de DNA (ABI PRISM 377, Applied Biosystem) y el "Big Dye reaction kit terminator" (Perkin Elmer). Como cebadores de las reacciones de secuenciación se utilizaron los oligonucleótidos universales F24 y R24 para obtener las secuencias contenidas en el vector pGEM-T Easy, y los oligonucleótidos 101 y 102, para establecer las secuencias insertadas en pACT2.

### C.7.3.15.- Análisis de las secuencias

Para el análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas deducidas se utilizaron los programas McMolly Folder, BLAST y BLASTX (Altschul y col., 1990), y CLUSTAL-W (Higgins y col., 1994).

## C.8.- Técnicas de imagen

### C.8.1.- FI

#### C.8.1.1.- Aparato de medida de la FI

El sistema con el cual se realizaron las medidas de FI, desarrollado por M. Ciscato en la Universidad de Limburg (Bélgica), y minuciosamente descrito en su Tesis doctoral (2000) es similar al descrito por Balachandran y col. (1994) y está constituido por las unidades de excitación, imagen, y control (fig. 20):

- *unidad de excitación*: Permite la iluminación de la muestra a dos intensidades lumínicas distintas, la de luz actínica emitida por una lámpara de xenon de 150 W, y otra saturante que se consigue con un conjunto de cuatro lámparas también de xenon de 250 W. Los dos tipos de iluminación permiten discriminar los componentes del *quenching* de la fluorescencia. Todas ellas están provistas de un mecanismo de disipación de calor, y de un filtro con una solución saturada de  $\text{CuSO}_4$  que permite

que sólo las longitudes de onda inferiores a 650 nm, a la que absorben las clorofilas de la antena del PSII (LHC-II), incidan en la muestra. La luz es conducida a través de cables de fibra óptica desde las lámparas hasta el interior de la cámara oscura donde se sitúa la muestra, de forma que se consigue una distribución uniforme de luz incidente en un área de aproximadamente 10 cm de diámetro y una intensidad máxima para la luz actínica de  $220 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y de  $1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para la luz saturante.

- *unidad de imagen:* consiste en una cámara de vídeo CCD en blanco y negro (Sony XC-75) equipada con un filtro B+W 092 (Schneider Optics Inc., Haupage, NY, USA), que permite la captación de la luz en la región del rojo lejano-infrarrojo cercano en la cual emite fluorescencia el PSII. La cámara, dentro de un rango específico, tiene una respuesta lineal a la intensidad lumínica, de forma que la intensidad de la señal de vídeo en un área concreta de la imagen se puede correlacionar con la intensidad de la luz recibida por el detector, y en el caso de la fluorescencia sería proporcional a la intensidad de ésta emitida por la muestra. Esto permite al sistema realizar medidas cuantitativas; pero para obtener valores numéricos de las intensidades luminosas es necesario convertir la señal analógica de la cámara en digital, lo que lleva a cabo la unidad de control. El uso combinado de un filtro azul para la luz incidente y otro rojo para la captación de luz evita la interferencia en la medida de la luz reflejada por la superficie de la muestra que falsearía la medida de luz emitida por ésta. La luz procedente de la unidad de excitación, induce la fluorescencia de la chl que es captada por la unidad de imagen.

- *unidad de control:* consiste en un ordenador personal con un procesador Intel Pentium III que trabaja bajo el sistema operativo Linux y controla automáticamente el sistema gracias a un programa desarrollado por el diseñador del equipo llamado Grabix y que consta de dos módulos escritos en lenguaje C. El primero controla las lámparas por medio de un convertidor AD/DA, y el segundo controla la cámara, generando imágenes en escala de grises y guardándolas en archivos de 640x480 pixels tipo raw, que se corresponden con un área de 8.5 x 6.4 cm.

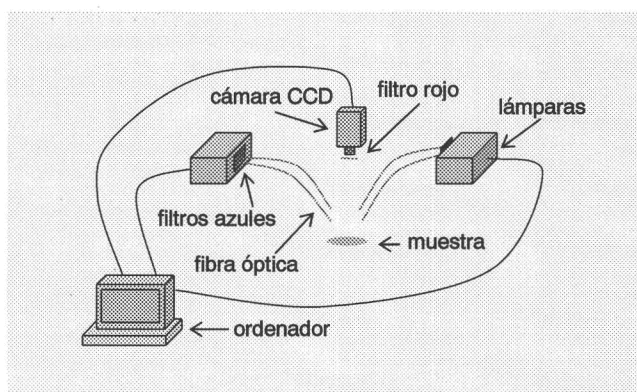


Fig. 20.- Esquema del sistema de medida de FI desarrollado en la Universidad de Limburg (Bélgica) por M. Ciscato (2000).

Para medir una hoja concreta se introduce la planta completa en una cámara opaca en cuyo interior están también la cámara CCD y el extremo distal de las fibras ópticas de la unidad de iluminación de forma que, con la ayuda de un soporte móvil, se coloca la hoja de interés en la posición adecuada bajo el sistema de iluminación y a la distancia correcta del objetivo de la CCD para que la imagen quede enfocada.

#### C.8.1.2.- Procesamiento de datos de FI

Cada uno de los píxeles que componen una imagen de fluorescencia tiene un valor que representa la intensidad de fluorescencia emitida por la zona de muestra correspondiente. Por tanto, si operamos píxel a píxel con estas imágenes reales podemos obtener otras virtuales que representan los distintos parámetros de fluorescencia. Así las imágenes adquiridas por el sistema necesitan ser procesadas digitalmente para dar una interpretación cuantitativa de ellas. El procesamiento de imágenes se ha llevado a cabo con el programa, KhorosPro2001 (Khoral Research Inc., Albuquerque NM, USA) que funciona bajo Linux y permite el diseño de tareas automáticas de procesamiento y análisis de imágenes.

Antes de operar con las imágenes de fluorescencia para calcular los parámetros deseados, es necesario corregir previamente:

- *el ruido de fondo de la cámara digital.* Para corregir la señal de fondo intrínseca de la CCD a todas las medidas de fluorescencia se les sustrae una imagen tomada con las luces apagadas.
- *la heterogeneidad de la intensidad de la luz incidente.* Las fibras ópticas que conducen la luz incidente están dispuestas de forma que se consigue, en la zona de enfoque de la CCD, una superficie de unos 10 cm de diámetro en la que se considera que la intensidad de luz es la misma. Pero para corregir la pequeña diferencia de intensidad dependiente de la distancia al centro del área a las imágenes de fluorescencia  $F'_s$  se les resta una imagen tomada con sólo la luz actínica encendida (backgroundS), mientras que a las imágenes de  $F'_{Mf}$  se les resta otra tomada con todas las lámparas operativas (backgroundM).

### C.8.1.3.- Protocolo de medida

Las medidas se realizaron siguiendo el método de análisis de coeficientes de quenching, en el que se somete a la muestra vegetal previamente adaptada a la oscuridad, situación en la cual los procesos fotoquímicos y no fotoquímicos están inactivos, a un pulso de luz saturante con el que se consigue que la  $Q_A$  totalmente oxidada se reduzca por completo, alcanzando la fluorescencia su valor máximo,  $F_M$ . Segundos después se ilumina la muestra con una luz actínica y se somete a sucesivos pulsos de luz saturante obteniendo una gráfica como la de la fig. 21.

La diferencia entre los valores de fluorescencia máxima  $F_M$  y  $F'_M$  se debe a la disipación de energía en forma de calor mientras que la diferencia entre  $F'_M$  y el valor de fluorescencia en el estado estacionario ( $F_s$ ) se debe a la conversión de la energía absorbida en energía química (procesos fotoquímicos). Por tanto se pueden determinar los correspondientes valores de quenching fotoquímico y no fotoquímico respectivamente como:

$$q_P = \frac{F'_M - F_t}{F'_M - F_0} \qquad q_N = \frac{F_M - F'_M}{F_M - F_0}$$

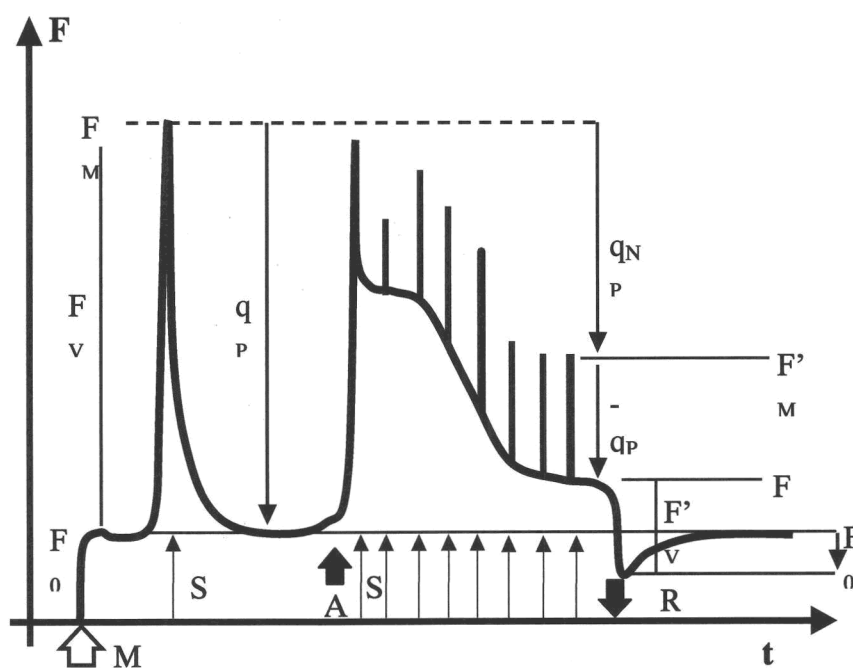


Fig. 21.- Cinética de inducción de la fluorescencia por el método de los pulsos saturantes.

Dado que la inducción de la fluorescencia tiene lugar en unos pocos milisegundos, solo con aparatos muy precisos y suficientemente rápidos puede medirse  $F_0$ . En estos casos solo se puede calcular una aproximación de estos parámetros. Considerando que  $F_s$  es prácticamente igual a  $F_0$  el rendimiento cuántico del PSII, o lo que es lo mismo, la proporción de energía absorbida por el PSII que es utilizada en el transporte electrónico fotosintético puede ser calculado (Genty y col., 1989) como:

$$\Phi_{\text{PSII}} = \frac{F'_M - F_s}{F'_M}$$

Este  $\Phi$  es directamente proporcional a la tasa de fijación de  $\text{CO}_2$  utilizada como indicador del rendimiento de la fotosíntesis.

Teniendo en cuenta la misma aproximación, se considera que el quenching no fotoquímico puede calcularse, según Bilger y Björkman (1990), como:

$$\text{NPQ} = \frac{F_M - F'_M}{F'_M}$$

En nuestro caso se obtuvieron imágenes para los parámetros  $\Phi$  y NPQ de hojas S, AS y de las correspondientes en plantas control de plantas a 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24 y 28 d.p.i. Las medidas de la fluorescencia se realizaron con una luz actínica de  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , que en el primer segundo se suplementa con un pulso de luz saturante de  $1300 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  para obtener la imagen correspondiente a  $F_M$ . A partir de este momento se somete la muestra a una serie de pulsos saturantes de luz a 2, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240, y 300 segundos. Para el análisis de los coeficientes de quenching se toman imágenes sucesivas antes y durante cada uno de los pulsos de luz (Scholes y Rolfe, 1996) correspondientes a los parámetros  $F$  y  $F'_M$ . De esta forma se consiguen una serie de 23 imágenes para cada muestra, la correspondiente a  $F_M$  más dos por cada uno de los pulsos de luz saturante, que serán procesadas para el cálculo de NPQ y  $\Phi$ .

En algunos casos, hemos definido en las imágenes regiones de interés (RI) del tamaño de  $10 \times 10$  pixels correspondiente a  $1,78 \text{ mm}^2$  para calcular en esa zona el valor medio del parámetro de que se trate u obtener cinéticas de éste a lo largo del tiempo de medida. El valor de fluorescencia de cada RI es calculado como la media aritmética de los valores de cada píxel y normalizado con respecto a la diferencia entre el valor de  $F_M$  a  $t = 1 \text{ seg}$  y  $F_S$  a  $t = 300 \text{ seg}$ .

Cada punto de la gráfica es la media aritmética del valor del parámetro en un total de nueve RIs resultantes de considerar la hoja equivalente en tres plantas, y en cada hoja tomar tres repeticiones. Por tanto, cada valor presentado es la media del valor de 900 pixels, o lo que es lo mismo, 900 medidas de fluorescencia para una zona definida.

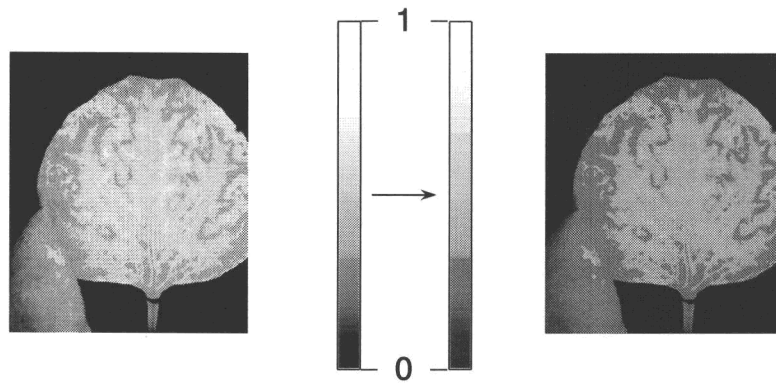


Fig. 22.- Imagen de hoja AS a 17 d.p.i. de planta inoculada con PMMoV-I correspondiente al NPQ en escala de grises y en escala de falsos colores (seudo-SA de Khoros).

Para hacer apreciables pequeñas diferencias espaciales a lo largo de la hoja, la escala de grises (256 tonos de gris) de las imágenes que representan los distintos parámetros calculados no resulta adecuada. Por ellos, de las distintas escalas de falsos colores disponibles en Khoros se ha seleccionado el seudo-SA llamado así por la revista *Scientific American*. En la fig. 22 se comparan la escala de grises con la de falsos colores.

### C.8.2.- Microscopía electrónica

Las muestra se fijan en glutaraldehído 0.2% en un tampón Na - PIPES 50 mM a pH 7.5 que se infiltra en el tejido mediante vacío, y al que se añade verde de malaquita al 0.1% (p/v) que tiñe los tejidos que han sido correctamente infiltrados. El proceso se realiza a 4°C durante una noche, para lavar después tres veces durante 30 min en tampón Na-PIPES 50 mM pH 7.5 y fijar nuevamente con tetróxido de osmio al 2% en tampón cacodilato sódico 0.2 M. Pasadas dos o tres horas se realizan tres lavados de 5 min en tampón cacodilato sódico 0.2 M y finalmente las muestras se incuban 16 h en una solución al 2% acetato de uranilo en agua destilada.

Las muestras se incluyeron en una resina hidrofóbica tipo Spurr. Para ello previamente se deshidrató gradualmente el tejido mediante incubaciones de 20 min

en soluciones de etanol con porcentajes en agua gradualmente crecientes (30, 50, 70, 90%) a temperatura ambiente. La deshidratación termina con 4 incubaciones de 30 min en etanol absoluto. Posteriormente la muestra se incuba con óxido de propileno 100% durante 1 h con un cambio de solución, de cara a facilitar su inclusión en la resina.

La resina Spurr se prepara mediante la siguiente mezcla: 20 g dióxido de vinilciclohexeno (ERL 4206), 10.5 g DER737, 52 g anhídrido nonenilsuccínico (NSA) y 0.8 g dimetilaminoetanol (DMAE) La inclusión de la muestra se lleva a cabo a temperatura ambiente con dos incubaciones de 1 h en óxido de propileno : spurr en la proporción 2:1 (m/m) seguidas de una incubación de 16 h en óxido de propileno : spurr en la proporción 1: (m/m) en agitación. Escogen las muestras para analizar y se colocan en un molde que se rellena con la resina y se deja polimerizar durante 16 h en un horno a 70°C.

La muestras incluidas quedan listas para hacer los cortes ultrafinos para el microscopio electrónico de transmisión.

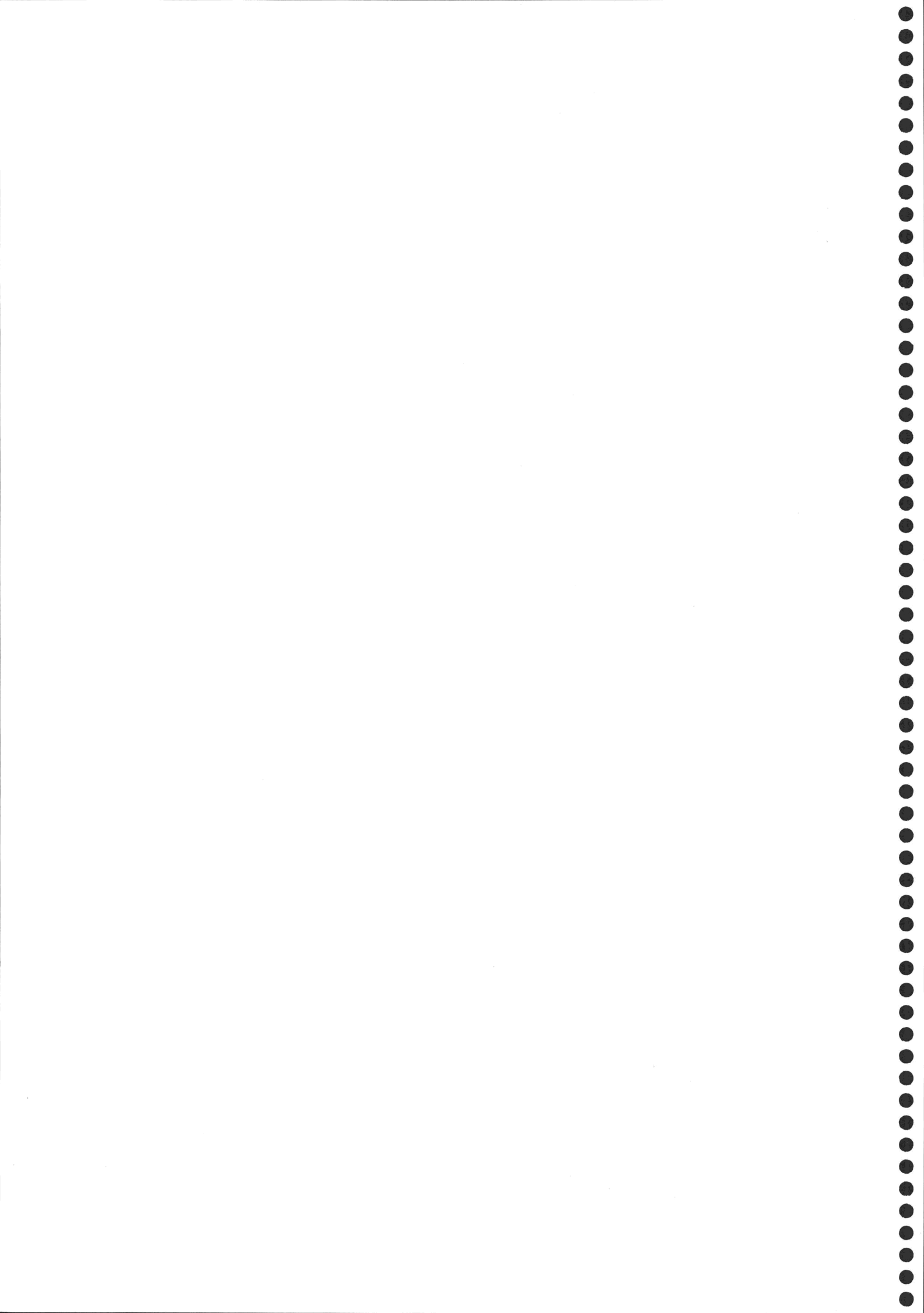


~ *RESULTADOS* ~

UNIVERSIDAD DE GRANADA

02 MAYO 2003

COMISION DE DOCTORADO



#### D.1.- Sintomatología

Hemos estudiado el efecto de la infección viral en el aparato fotosintético utilizando como modelo experimental el sistema huésped-parásito plantas de *Nicotiana benthamiana*-virus del moteado suave del pimiento.

Para ello, las plantas fueron inoculadas con virus purificados de PMMoV-S o PMMoV-I, como se describe en el apartado C.1 de *M y M*.

En el estadio en el que usamos las plantas de *N. benthamiana* para ser infectadas, éstas desarrollan los primeros síntomas tras 6 u 8 días de ser inoculadas con cualquiera de las cepas virales. Éstos consisten en un fuerte enrollamiento hacia abajo de las hojas superiores que se desarrollan con posterioridad a la inoculación (llamadas hojas S). Por el contrario, las hojas que estaban desarrolladas en ese momento no presentan síntomas en el periodo de infección estudiado (denominadas hojas AS) (fig. 23).

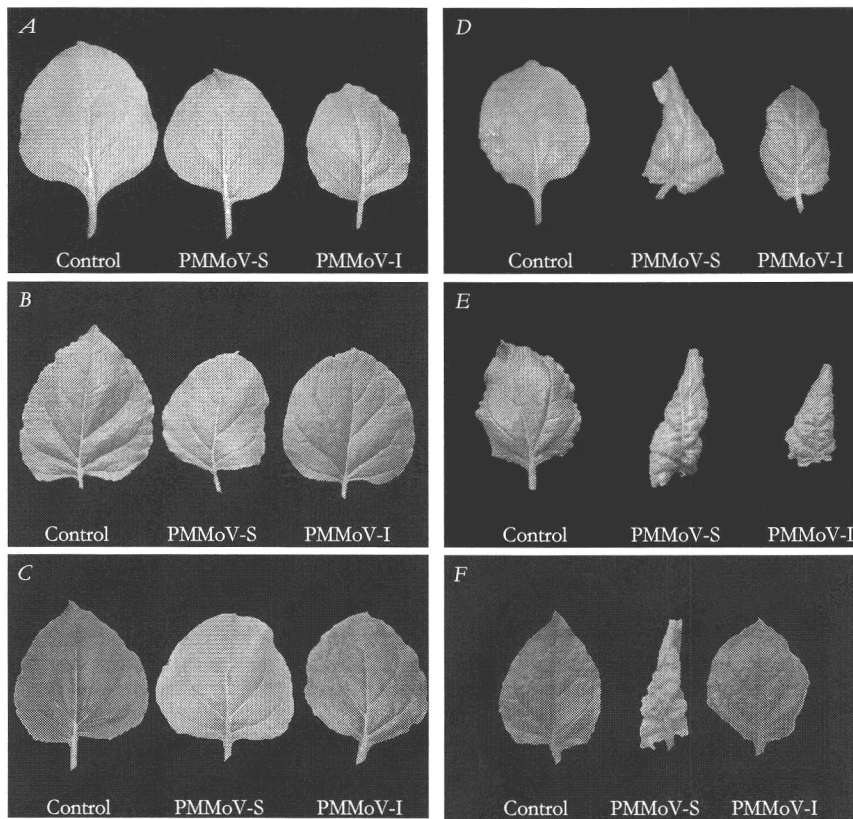
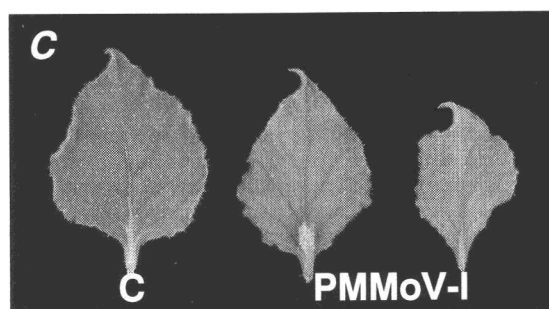
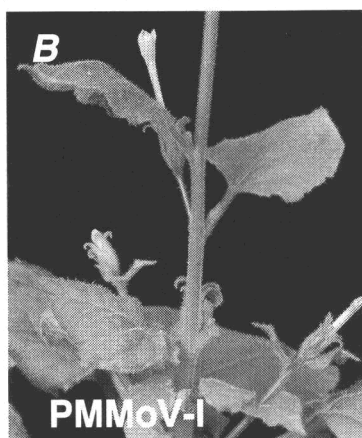
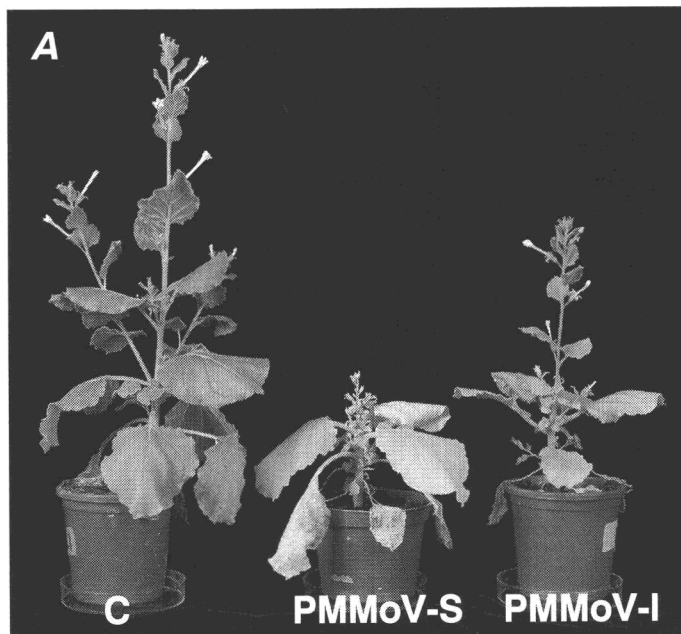


Fig. 23.- *Sintomatología: hojas de plantas de N. benthamiana sanas e inoculadas con PMMoV-S y PMMoV-I a lo largo de la infección. A, B y C son hojas AS y D, E y F hojas S, a 7, 14 y 28 d.p.i. respectivamente.*

Fig. 24.- (en la página siguiente) *A: Sintomatología de plantas N. benthamiana de infectadas con PMMoV-S y PMMoV-I a los 28 d.p.i.. B: Detalle de la zona de inicio de la recuperación de los síntomas en plantas infectadas con PMMoV-I. C: Hojas recuperadas de estas plantas.*



Además, las plantas infectadas muestran una inhibición del crecimiento de los entrenudos, así como del tamaño de las hojas jóvenes, aunque el número de éstas no se ve afectado con respecto al de las plantas control. Este efecto es muy acusado a partir de los 14 d.p.i., y es más evidente en el caso de la infección por el PMMoV-S.

Posteriormente, las plantas inoculadas con PMMoV-S desarrollan progresivamente una clorosis generalizada (fig. 24A). Por el contrario, las plantas inoculadas con PMMoV-I comienzan a desarrollar un proceso de recuperación de los síntomas en la zona apical a partir de los 22 - 24 d.p.i., coincidiendo con la aparición de los escapes florales. Esta recuperación, completa a los 28 d.p.i., consiste en un crecimiento normal de los entrenudos, de forma que las plantas llegan a alcanzar a veces la altura de las plantas control. Además, las hojas desarrolladas en este periodo no presentan enrollamiento, y su tamaño es algo menor que las correspondientes hojas de las plantas sanas. En algunos casos muestran síntomas de mosaico muy atenuado (fig. 24A y B).

Basándonos en la gravedad de los síntomas, podemos considerar, por tanto, que PMMoV-S es más virulento que PMMoV-I.

## **D.2.- Determinación de la secuencia aminoacídica de la región N-terminal de las isoformas minoritarias de PsbP**

Cuando se analizan preparaciones de membranas tilacoidales de plantas sanas de *N. benthamiana* mediante electroforesis bidimensional, y posterior inmunodetección con anticuerpos específicos de la proteína PsbP del OEC, según se describe en los aptdos. C.3.2 y C.3.4 de *M. y M.*, se detectan cinco manchas bien definidas (fig. 25) que dan reacción positiva. Estas manchas se han denominado A, B, B', C, y D, siguiendo la nomenclatura previa (Rahoutei y col., 2000).

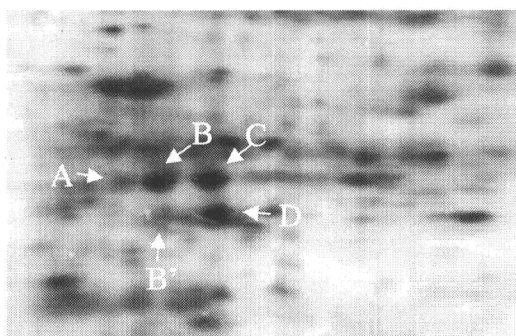


fig. 25: Tinción con plata de preparaciones de membranas tilacoidales de plantas de *N. benthamiana* analizadas por electroforesis bidimensional (A) e inmunodetección (B) de la proteína PsbP del OEC. Se indican las posiciones de las 5 manchas (A, B, B', C, y D) que reaccionan con los anticuerpos específicos

<i>A. thaliana</i>	(O49344)	AYGEAANVFGKPKKN
<i>S. Olaracea</i>	(P12302)	AYGEAANVFGKPKKN
<i>N. tabacum</i>	(Q40457)	AYGEAANVFGKPKKN
<i>C. sativus</i>	(Q9SLQ8)	AYGEAANVFGKPKSN
<i>L. esculentum</i>	(P29795)	AYGEAANVFGKPKEN
<i>S. tuberosum</i>	(P93566)	AYGEAANVFGKPKEN
<i>N. tabacum</i> (A)	(Q43363)	AYGEAANVFGKPKEN
<b><i>N. benthamiana</i> (D)</b>		AYGEAANVFGKPKQN
<i>N. tabacum</i> (B)	(Q04126)	AYGEAANVFGKPKQN
<i>N. tabacum</i> (F)	(Q04125)	AYGEAANVFGKPKQN
<b><i>N. benthamiana</i> (A/B/B' /C)</b>		AYGEAANVFGKPKTD
<i>N. tabacum</i> (2AF)	(Q04127)	AYGEAANVFGKPKTD
<i>A. thaliana</i>	(Q42029)	AYGEAANVFGKPKTN
<i>P. sativum</i>	(P16059)	AYGEAANVFGKAKTN
<i>N. tabacum</i>	(Q40458)	AYGEAANVFGKAKTN

fig. 26: Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de la región N-terminal de las proteínas maduras de PsbP de *N. benthamiana*, y de otras especies vegetales. Las posiciones conservadas se marcan sobre fondo verde, las substituciones aminoacídicos conservativas sobre azul, las semiconservativas sobre rojo y las no conservativas sobre amarillo. Las isoformas de *N.t.* son las clonadas por Hua y col. (1992).

Al inicio de nuestro trabajo, ya se había determinado la secuencia aminoacídica de la región N-terminal (Rahoutei, 2000) de las tres manchas mayoritarias B, C y D, por lo que consideramos necesaria la determinación de la secuencia aminoacídica de las otras dos manchas, antes de proceder a la caracterización de sus mRNAs.

La secuenciación de la región N-terminal de las manchas A y B' la llevamos a cabo según se detalla en el aptdo. C.3.5 de *M. y M.*, y pudimos establecer la secuencia de los 15 primeros residuos.

La comparación de las secuencias aminoacídicas obtenidas (fig. 26) muestra que ambas comparten la misma secuencia N-terminal, que a su vez es idéntica a la de las manchas B y C, y por tanto distinta a la de D.

En la figura 26 se muestra el alineamiento de las secuencias de los extremos N-terminal de las isoformas de PsbP de *N. benthamiana* con las correspondientes secuencias de otras especies de plantas superiores, disponibles en las bases de datos, según el programa CLUSTALW 1.82. En este alineamiento múltiple comprobamos que las posiciones 1-11 y la 13 están conservadas en todas las secuencias aminoacídicas consideradas.

Por otro lado, se puede observar que la secuencia del extremo N-terminal de las manchas A, B, B' y C de *N. benthamiana* coincide con la de la isoforma 2AF de *N. tabacum* (Hua y col., 1992), mientras que la secuencia obtenida para las mancha D coincide con la de las isoformas B y F de esta planta (Hua y col., 1992). Ambas secuencias se diferencian en un cambio no conservativo Gln-Thr en la posición 14 y un cambio semiconservativo Asn-Asp en la posición 15.



### D.3.- Clonación de los genes que codifican las proteínas constituyentes del OEC. Análisis de sus secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas

#### D.3.1.- Clonación de *psbO*. Análisis de las secuencias de cDNA y aminoacídicas deducidas

##### D.3.1.1.- Estrategia de clonación de los cDNAs correspondientes a *psbO*

Con el fin de obtener los cDNAs correspondientes al gen *psbO*, se utilizó el cebador *33a* (aptdo. C.7.1 de *M. y M.*, 27 y fig. 28), cuya secuencia corresponde a los 18 nt codificadores del extremo amino de las proteínas maduras PsbO de *N. benthamiana*. El cebador se diseñó a partir de la secuencia nucleotídica deducida de las secuencias aminoacídicas de dichas proteínas (Rahoutei, 2000), y de las secuencias nucleotídicas disponibles en las bases de datos (X64349 de *N. tabacum* y A60731 de *N. sylvestris*).

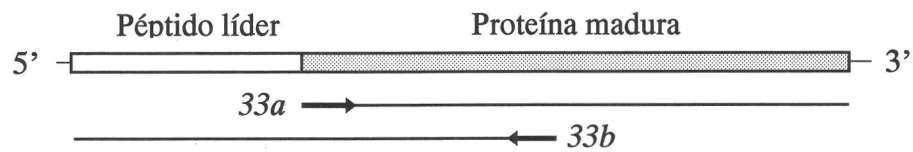


Fig. 27: Esquema de organización de los cDNA correspondientes a *psbO*. Las secuencias líder y 3'-NC se representan con líneas. La región codificadora del péptido señal y de la proteína madura se representa con rectángulos. La posición de los oligonucleótidos *33a* y *33b* se muestran con flechas.

La amplificación mediante PCR de la genoteca de cDNA de *N. benthamiana* (aptdo. C.7.3.8 de *M. y M.*), utilizando como cebadores los oligonucleótidos *33a* y 102 ó 110 (aptdo. C.7.1 de *M. y M.*), dio lugar a una banda de cDNA diferentes. La clonación de estas bandas y el posterior examen de las secuencias nucleotídicas de los clones obtenidos (clones 3' en la tabla 2) mostró que correspondían a cuatro secuencias diferentes de cDNA. Éstas fueron identificadas como codificantes de la proteína PsbO mediante BLAST por alineamiento con las secuencias depositadas en las bases de datos.

		33-I		33-II	
Clones 5'	Molde	cDNA 5'RACE		cDNA 5'RACE	
	Cebadores	33b y NUP		33b y NUP	
	Clones	p33-I-5A	p33-I-5B	p33-II-5A	p33-II-5B
	Tamaño (pb)	671	670	645	623
Clones 3'	Molde	Genoteca cDNA ( <i>N. b.</i> )		Genoteca cDNA ( <i>N. b.</i> )	
	Cebadores	33a y 102	33a y 110	33a y 102	33a y 110
	Clones	p33-I-3A	p33-I-3B	p33-II-3A	p33-II-3B
	Tamaño (pb)	876	867	876	869
Tamaño (pb)		1169		1151	

		33-III		33-IV	
Clones 5'	Molde	cDNA 5'RACE		cDNA 5'RACE	
	Cebadores	33b y NUP		33b y NUP	
	Clones	p33-III-5A	p33-III-5B	p33-VI-5A	p33-VI-5A
	Tamaño (pb)	640	500	640	644
Clones 3'	Molde	Genoteca cDNA ( <i>N. b.</i> )		Genoteca cDNA ( <i>N. b.</i> )	
	Cebadores	33a y 102	33a y 110	33a y 102	33a y 110
	Clones	p33-III-3A	p33-III-3B	p33-VI-3A	p33-VI-3B
	Tamaño (pb)	844	866	906	908
Tamaño (pb)		1114		1171	

Tabla 2: Esquema de los clones parciales de los cDNAs de *psbO* de *N. benthamiana*. Se muestran los clones analizados para establecer las secuencias nucleotídicas de *psbO*, su tamaño, así como los cebadores y el molde de cDNA utilizados para su obtención.

Para obtener la secuencia 5' del cDNA se diseñó el cebador *33b* (aptdo. C.7.1 de *M. y M.*, fig. 27 y fig. 28), situado en una zona conservada de las secuencias anteriores, a 368 pb de la posición correspondiente al oligonucleótido *33a* (fig. 27 y fig. 28). Utilizando este cebador, y mediante 5'-RACE, como se detalla en el aptdo. C.7.3.8 de *M. y M.*, se amplificó una única banda de cDNA. De la determinación y el análisis de las secuencias nucleotídicas de los clones obtenidos (clones 5' en la tabla 2) se deduce la existencia de cuatro secuencias parciales codificadoras de cuatro péptidos señal más el extremo amino de la proteína madura correspondiente. El solapamiento de estas secuencias con las anteriormente descritas permitió completar las secuencias nucleotídicas de las regiones codificadoras de cuatro proteínas PsbO.

#### D.3.1.2.- Análisis de las secuencias nucleotídicas de los distintos cDNAs de *psbO*

Las secuencias completas de los fragmentos de cDNA examinados se muestran en la fig. 28.

La secuencia *33-I* tiene un tamaño de 1170 pb. Desde su extremo 5', contiene 48 pb de la región líder, un marco de lectura abierta de 999 pb, y 123 pb correspondientes a la región 3'-NC. La secuencia *33-II* contiene 1153 pb: 22 pb de la secuencia líder, una región codificadora de 999 pb, y una región 3'-NC de 132 pb. La secuencia *33-III* posee un total de 1116 pb, de los cuales 17 nt corresponden a la región líder, 1002 pb a la secuencia codificante y 97 pb la región 3'-NC. Y, por último, la secuencia *33-IV* contiene 1146 pb que incluyen 23 pb de la secuencia líder, 1002 pb de la codificante y 159 pb de la 3'-NC.

En todos los casos los primeros 255 pb del marco de lectura abierta codificarían el péptido señal. La existencia de la cola de poli-A en el extremo 3' de las cuatro secuencias nos permite concluir que en los cuatro casos poseemos la región 3'-NC de los correspondientes mRNAs.

Si comparamos la secuencia nucleotídica de *33-I* con respecto a *33-II* vemos que en la primera se han podido secuenciar 26 pb más de la secuencia líder. *33-I* tiene

una delección de los últimos 9 pb de la región 3'-NC. Y en la región codificante tiene 11 sustituciones silenciosas, dos sustituciones nucleotídicas que dan lugar a un cambio aminoacídico conservativo y tres que dan lugar a cambio semiconservativo. Entre ambas hay un grado de identidad es del 95%.

La secuencia *33-I* con respecto a *33-III* tiene secuenciadas 31 pb más en la región de la secuencia líder, y en el extremo 3'-NC presenta dos delecciones de dos bases y una de una base además de una inserción de 11 pb 7 posiciones después del codón de terminación otra inserción de 11 pb antes de la cola de poli-A. En la RC se diferencian en 91 mutaciones silenciosas, 11 sustituciones nucleotídicas que dan lugar a cambio aminoacídico conservativo, 10 a cambio semiconservativo y 2 a cambio no conservativo. Además *33-I* respecto a *33-III* tiene una sustitución C→G en la posición 998 que resulta en la mutación ópalo, y la sustitución A→G en la posición 1001, codificando una proteína con un residuo menos de longitud. El grado de identidad de estas dos secuencias nucleotídicas es del 83,4%.

La comparación de *33-I* con *33-IV* revela que para la secuencia líder han sido secuenciados 25 pb más, y en el extremo 3'-NC presenta dos delecciones de una base, una de dos, una inserción de 11 pb 7 posiciones después del codón de terminación, y una de 47 pb antes de la cola de poli-A. En la región codificadora *33-I* tiene con respecto a *33-IV* 90 sustituciones silenciosas, 9 sustituciones que dan lugar a cambio aminoacídico conservativo, 7 que dan lugar a cambio semiconservativo, y 2 a cambio no conservativo. Además presenta las sustituciones sustitución C→G en la posición 998 que resulta en la mutación ópalo, y la sustitución A→G en la posición 1001, codificando una proteína con un residuo menos de longitud. El grado de identidad entre ambas secuencias es de 82,3%.

Se han secuenciado para la secuencia líder de *33-II* cinco bases más que para la de *33-III*. Además, *33-II* tiene en su extremo 3'-NC dos delecciones de dos bases, una inserción de 11 bases, una de una base y una de 20 respecto a *33-III*. Si la comparamos con esta misma secuencia, *33-II* tiene en su región RC 83 sustituciones silenciosas, 14 sustituciones no silenciosas que dan lugar a cambios aminoacídicos conservativos, y semiconservativos y 2 no conservativos. También presenta las sustituciones C→G en la posición 998 y A→G en la posición 1001 dando lugar a un

acortamiento en un residuo en la longitud de la proteína codificada. El grado de identidad entre ambas es del 84,9%.

Si comparamos las secuencias nucleotídicas *33-II* y *33-IV* vemos que en la secuencia líder se ha secuenciado una base más. Y en el extremo 3'-NC *33-II* tiene dos deleciones de una base, dos de una y una deleción de 38 bases antes de la cola de poli-A. Además una inserción de 11 bases. En la RC *33-II* tiene 90 sustituciones silenciosas, 12 cambios nucleotídicos que dan lugar a cambios aminoacídicos conservativos, 4 a cambios semiconservativos, y 2 a cambios conservativos. *33-II* también presenta las sustituciones en las posiciones 998 y 1001 responsables de que codifique una proteína con un residuo menos en el extremo C-terminal. El grado de identidad entre *33-II* y *33-IV* es de 84,2%.

Por último, comparamos la secuencia *33-III* con la *33-IV*. La secuencia líder de *33-III* tiene 6 pb más que *33-IV*, y en su extremo 3'-NC se diferencia de ella en una inserción de una base y en una deleción de 60 bases antes de la cola de poli-A. En la secuencia de la RC se diferencian en 20 mutaciones silenciosas, 2 sustituciones que dan lugar a cambio aminoacídico conservativo, 3 a cambios semiconservativos y 2 a cambios conservativos. Entre ambas el porcentaje de identidad es del 92,3%.

En la figura 28 se presenta el alineamiento múltiple de estas secuencias nucleotídicas. Para facilitar su examen, éstas han sido numeradas asignando la posición 1 a la adenina del codón de inicio de la traducción. El alineamiento muestra que la región líder del mRNA y la 3'-NC son las zonas del mRNA con mayor variabilidad en secuencia y también en longitud.

Dentro de la región codificadora, podemos observar una mayor variabilidad en la zona que codifica al péptido señal. Así, de un total de 132 posiciones mutadas presentes en los marcos de lectura abierta hay 104 que son silenciosas y 29 que producen cambio en el significado del codón. De estas 28 posiciones, 14 ocurren en los primeros 255 pb, codificantes del péptido señal. En seis de las 14 dan lugar a sustituciones conservativas de la secuencia aminoacídica (posiciones 8, 91, 153, 157, 162 y 202), siete a semiconservativas (posiciones 7, 59, 61, 97, 103, 143 y 197), y una produce un cambio no conservativo (posición 89). De las otras 14 posiciones dentro

de la región codificante de la proteína madura, en las que encontramos mutaciones no silenciosas, 9 dan lugar a sustituciones conservativas (281, 354, 366, 402, 471, 675, 841, 883 y 998), 3 a sustituciones semiconservativas (263, 452 y 544) y solo 2 mutaciones provocan sustitución no conservativa en la secuencia aminoacídica (posiciones 365 y 755) (fig. 28).

Por último, y al final de los marcos de lectura abierta, se producen dos sustituciones nucleotídicas en las secuencia 33-III y 33-IV. Una sustitución G→C en la posición 998 produce el cambio del codón de parada UGA por el triplete UCA que codifica serina. A continuación, la sustitución G→A en la segunda base del triplete siguiente (UGG→UAG) resulta en un codón de terminación. Ambas sustituciones hacen que estas dos secuencias 33-III y 33-IV codifiquen sendos polipéptidos con un residuo aminoacídico más que las otras dos (33-I y 33-II).

33-I	AGAAACAGAGAGGAGAAGAAGACTT		13
33-II	-----	-----	13
33-III	-----	-----	13
33-IV	-----AC	-----G	13
33-I	ACAAGCAGCTGCTACTCTTATGCA	CCAAACAAGGTTGGTGTTC	73
33-II	-----	-----	73
33-III	-----	-----	73
33-IV	-----	-----G	73
33-I	CTTGCAGTTGAA	-----	133
33-II	-----	-----	133
33-III	-----	-----	133
33-IV	-----	-----	133
		x	
33-I	TAGCC	-----	193
33-II	-----	-----	193
33-III	-----	-----	193
33-IV	-----	-----	193
33-I	-----	-----	253
33-II	-----	-----	253
33-III	-----	-----	253
33-IV	-----	-----	253
		33a	
33-I	-----	-----	313
33-II	-----	-----	313
33-III	-----	-----	313
33-IV	-----	-----	313
33-I	-----	-----	373
33-II	-----	-----	373
33-III	-----	-----	373
33-IV	-----	-----	373
		x	
33-I	-----	-----	433
33-II	-----	-----	433
33-III	-----	-----	433
33-IV	-----	-----	433
33-I	-----	-----	493
33-II	-----	-----	493
33-III	-----	-----	493
33-IV	-----	-----	493
33-I	-----	-----	553
33-II	-----	-----	553
33-III	-----	-----	553
33-IV	-----	-----	553
		33b	
33-I	-----	-----	613
33-II	-----	-----	613
33-III	-----	-----	613
33-IV	-----	-----	613
33-I	-----	-----	673
33-II	-----	-----	673
33-III	-----	-----	673
33-IV	-----	-----	673
33-I	-----	-----	733
33-II	-----	-----	733
33-III	-----	-----	733
33-IV	-----	-----	733
33-I	-----	-----	793
33-II	-----	-----	793
33-III	-----	-----	793
33-IV	-----	-----	793
		x	



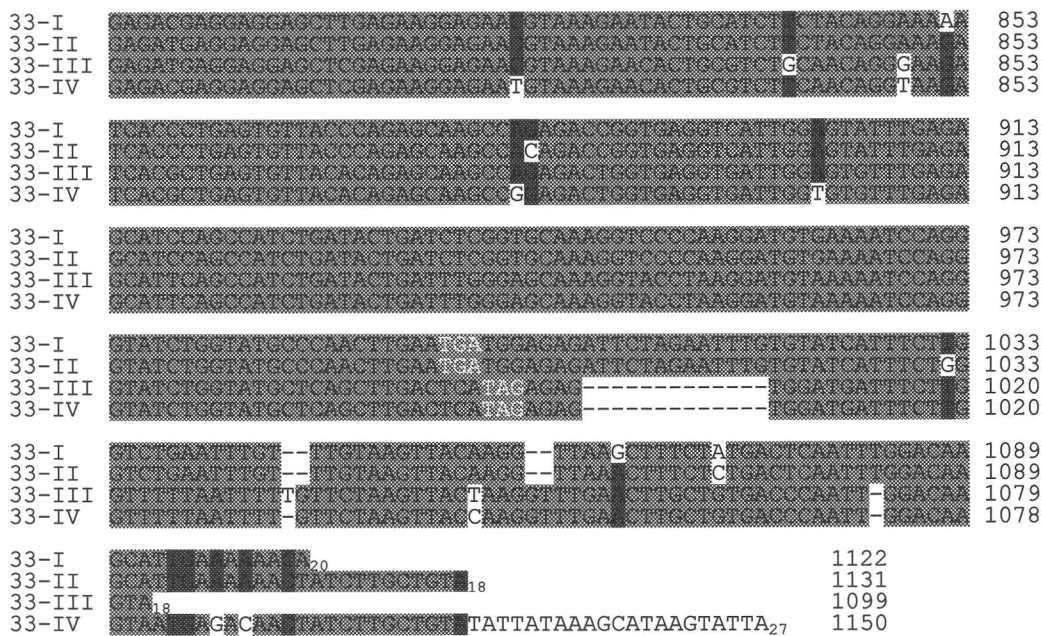


fig. 28 Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de los cDNAs que codifican los isoformas de PsbO de *N. benthamiana*. Las posiciones sombreadas en verde están conservadas en todas las secuencias, en azul conservadas en el 75% y en rojo en el 50%. Se marcan la posición de los cebadores 33a y 33b (flechas), los codones de iniciación (verde) y terminación (amarillo), el codón que codifica el primer residuo de la secuencia madura (azul), así como las sustituciones que originan cambios no conservativos en la secuencia aminoacídica (x).



### D.3.1.3.- Análisis de las secuencias aminoacídicas deducidas de los distintos cDNAs de *psbO*

El análisis de las secuencias aminoacídicas deducidas de las correspondientes nucleotídicas mostró que los cDNAs de *33-I* y *33-II* codifican un polipéptido de 332 aa cada uno, constituidos por un péptido señal en el extremo amino de 85 aa y una proteína madura de 247 aa. Los cDNAs de *33-III* y *33-IV* codifican otros dos polipéptidos de 333 aa. El péptido señal de estos últimos también tiene una longitud de 85 aa y la proteína madura en ambos casos tiene 248 aa. Para facilitar su análisis se ha asignado la posición +1 al primer residuo aminoacídico de la proteína madura.

En la siguiente tabla (tabla 3) se indican la longitud de cada una de las secuencias de la proteína PsbO de *N. benthamiana* obtenidas (del péptido señal más la proteína madura), así como sus pesos moleculares calculados y sus puntos isoeléctricos (pI) teóricos.

	<b>33-I</b>	<b>33-II</b>	<b>33-III</b>	<b>33-IV</b>
<b>longitud del precursor (aa)</b>	332	332	333	333
<b>longitud del péptido señal (aa)</b>	85	85	85	85
<b>longitud proteína madura (aa)</b>	247	247	248	248
<b>masa (precursor)</b>	26.628,9 (35.198,8)	26.641,9 (35.197,8)	26.799,1 (35.436,1)	26.773,0 (35.345,0)
<b>pI (precursor)</b>	5,05 (5,63)	5,04 (5,61)	4,94 (5,41)	4,94 (5,41)

Tabla 3.- Características de los polipéptidos PsbO de *N. benthamiana*. Se muestran los datos correspondientes al precursor, entre paréntesis, y los de la proteína madura.

33-I	IAVSLQAAATLMOPTKVGVAAPARNNIQLPSAOSVCKAPGVEPAAARLTCSLQTELEKDLAQ	-16
33-II	IAVSLQAAATLMOPTKVGVAAPARNNIQLPSAOSVCKAPGVEPAAARLTCSLQTELEKDLAQ	-16
33-III	IAASLQAAATLMOPTKVGVSAPARNNIQLPSAOSVCKAPGVEPAAARLTCSLQTELEKDLAQ	-16
33-IV	IAASLQAAATLMOPTKVGVSAPARNNIQLPSAOSVCKAPGVEPAAARLTCSLQTELEKDLAQ	-16
33-I	CTDAK VAGPALATSALVVSAGANAEGYPRRLTDEIQSKTYMEVKGKGTANOCPTIEG	35
33-II	CTDAK VAGPALATSALVVSAGANAEGYPRRLTDEIQSKTYMEVKGKGTANOCPTIEG	35
33-III	CTDAK VAGPALATSALVVSAGANAEGYPRRLTDEIQSKTYMEVKGKGTANOCPTIEG	35
33-IV	CTDAK VAGPALATSALVVSAGANAEGYPRRLTDEIQSKTYMEVKGKGTANOCPTIEG	35
33-I	STAFKPKGNATKFCLEPTSETVKAESVNNHAPPDQYFKIMTRLTLYLDEIEGPFV	95
33-II	STAFKPKGNATKFCLEPTSETVKAESVNNHAPPDQYFKIMTRLTLYLDEIEGPFV	95
33-III	STAFKPKGNATKFCLEPTSETVKAESVNNHAPPDQYFKIMTRLTLYLDEIEGPFV	95
33-IV	STAFKPKGNATKFCLEPTSETVKAESVNNHAPPDQYFKIMTRLTLYLDEIEGPFV	95
33-I	SDGTVXFEEKDGDIDYAAVTVOLPCCGERVPELFTIKQLVAGGKPEFSGCEFLVPSYRGS	155
33-II	SDGTVXFEEKDGDIDYAAVTVOLPCCGERVPELFTIKQLVAGGKPEFSGCEFLVPSYRGS	155
33-III	SDGTVXFEEKDGDIDYAAVTVOLPCCGERVPELFTIKQLVAGGKPEFSGCEFLVPSYRGS	155
33-IV	SDGTVXFEEKDGDIDYAAVTVOLPCCGERVPELFTIKQLVAGGKPEFSGCEFLVPSYRGS	155
33-I	LDPKGRGGSYDINAVALPAGGRGDEEELKENVKNTASSTGKITLSVTQSKPETGEV	215
33-II	LDPKGRGGSYDINAVALPAGGRGDEEELKENVKNTASSTGKITLSVTQSKPETGEV	215
33-III	LDPKGRGGSYDINAVALPAGGRGDEEELKENVKNTASSTGKITLSVTQSKPETGEV	215
33-IV	LDPKGRGGSYDINAVALPAGGRGDEEELKENVKNTASSTGKITLSVTQSKPETGEV	215
33-I	VFESTQPSDIDLGAKYPKDVKTCGIWYAOI	247
33-II	VFESTQPSDIDLGAKYPKDVKTCGIWYAOI	247
33-III	VFESTQPSDIDLGAKYPKDVKTCGIWYAOI	248
33-IV	VFESTQPSDIDLGAKYPKDVKTCGIWYAOI	248

fig. 29: Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas deducidas de los cDNAs de las isoformas de la proteína PsbO de *N. benthamiana*. La región correspondiente al péptido señal se muestra subrayada. Las posiciones conservadas se marcan en verde y las sustituciones conservativas en azul, las semiconservativas en rojo y las no conservativas en amarillo.

Si comparamos las secuencias aminoacídicas por parejas vemos que 33-I se diferencia de 33-II en dos cambios conservativos en el péptido señal, y un cambio semiconservativo y dos conservativos en la secuencia de la proteína madura, guardando con ella un grado de identidad y de homología del 99%. De 33-III se diferencia en el péptido señal en 5 cambios aminoacídicos conservativos y 7 semiconservativos, y en la secuencia madura en 6 cambios conservativos, 3 semiconservativos y 2 conservativos y posee un residuo menos en el extremo C-terminal. El grado de identidad entre ambas secuencias maduras es del 96% y el de homología del 98%. Y respecto a 33-IV tiene en el péptido señal 4 cambios aminoacídicos conservativos, 4 semiconservativos y uno no conservativo. Y en la secuencia madura presenta 5 cambios conservativos, 3 semiconservativos y 1 no

conservativos, además de un residuo menos en el extremo C-terminal. El porcentaje de identidad entre las secuencias maduras de 33-I y 33-IV es del 96% mientras que el de homología es del 98%.

La secuencia aminoacídica deducida 33-II se diferencia de 33-III en el péptido señal en 6 cambios conservativos y 5 semiconservativos, mientras que en la secuencia de la proteína madura difieren en 8 cambios conservativos, 2 semiconservativos y 2 no conservativos, y posee un residuo menos en el extremo C-terminal. Entre ambas secuencias maduras hay un porcentaje de identidad del 95% y uno de homología del 98%. Además, la secuencia 33-II tiene, con respecto al péptido señal de 33-IV, 5 cambios conservativos, 2 semiconservativos y uno no conservativo. Con respecto a esta misma secuencia, 33-II tiene en la proteína madura 7 cambios conservativos, 2 semiconservativos y 1 no conservativo. El grado de homología entre las dos secuencias maduras es del 96% y el de homología del 97%.

Finalmente, las secuencias aminoacídicas de 33-III y 33-IV difieren en el péptido señal en 1 cambio aminoacídico conservativo, tres semiconservativos y uno no conservativo, y en la secuencia de la proteína madura en 1 cambio conservativo y 1 no conservativo. Por tanto el grado de identidad entre ambas y también el de homología, es del 99%.

En la fig. 30 se muestra el alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas obtenidas en *N. benthamiana* con las de otras plantas superiores disponibles en las bases de datos. En ella podemos comprobar que las secuencias de las cuatro isoformas de *N. benthamiana* son muy similares entre sí y con la única secuencia conocida de *N. tabacum*. En cuanto a la secuencia del péptido líder (en torno a los primeros 80 aa), vemos que sus dos dominos funcionales descritos están bastante bien conservados, sobre todo el segundo (LTD) y la secuencia reconocida por la proteasa del lumen que procesa el precursor a proteína madura (aptdo. A.2.5 de *Introducción*). La secuencia madura de la proteína psbO de todas las especies consideradas, incluidas las de *N. benthamiana*, está altamente conservada. Comprobamos que las secuencias descritas en la bibliografía como regiones importantes en la unión a PSII y/o función del OEC se encuentran también muy conservadas en las cuatro isoformas de *N. benthamiana*.



N. b. 33-I	SSFLDPKGRGGSTGYDNAVALPAGGRGDEEELEKENVKNTASSTGKITLSVTQSKPETGE	298
N. b. 33-II	SSFLDPKGRGGSTGYDNAVALPAGGRGDEEELEKENVKNTASSTGKITLSVTQSKPETGE	298
N. tabacum	SSFLDPKGRGGSTGYDNAVALPAGGRGDEEELQKENVKNTSSSTGKITLSVTQSKPETGE	298
N. b. 33-III	SSFLDPKGRGGSTGYDNAVALPAGGRGDEEELEKENVKNTASATGKITLSVTQSKPETGE	298
N. b. 33-IV	SSFLDPKGRGGSTGYDNAVALPAGGRGDEEELEKENVKNTASSTGKITLSVTQSKPETGE	298
L. esculentum	SSFLDPKGRGGSTGYDNAVALPAGGRGDEEELQKENVKNTASLTGKITLSVTQSKPETGE	295
S. tuberosum	SSFLDPKGRGGSTGYDNAVALPAGGRGDEEELQKENVKNTASLTGKITFTVTKSNPQTGE	298
S. oleracea	SSFLDPKGRGGSTGYDNAVALPAGGRGDEEELQKENNKVASSKGTITLSVTSSKPETGE	296
P. sativum	SSFLDPKGRGASTGYDNAVALPAGGRGDEEELGKENNKSAASSKGTITLSVTQTKPETGE	294
A. thaliana.2	SSFLDPKGRGGSTGYDNAVALPAGGRGDEEELSKENVKNTAASVGEITLKITKSKPETGE	297
A. thaliana.1	SSFLDPKGRGGSTGYDNAVALPAGGRGDEEELVHENVKNTAASVGEITLKITKSKPETGE	298
B. gymnorrhiza	SSFLDPKGRGGSTGY DNAVALPAGGRGDEEELTKENIKNTSSSTGKITLSVTKSKPETGE	297
F. agrestis	SSFLDPKGRGGSAGYDNAVALPAGGRGDEEELVKENIKDVSSSTGKITLSVTKSKPETGE	295
O. sativa	SSFLDPKGRGGSTGYDNAVALPAGGRGDEEELAHENVKNTASSTGNITLSVTKSKPETGE	299
T. aestivum	SSFLDPKGRGGSTGYDNAGALPRGGGDEEELAKENVKNTASSTGNITLSVTKSKPETGE	291
	*****:*:* ** ** * ***** ** * .: : * ** : * .: : * **	
N. b. 33-I	VIGVFESIQPSDSDLGAKVPRDVKIQGIWYAQLE--	332
N. b. 33-II	VIGVFESIQPSDSDLGAKVPRDVKIQGIWYAQLE--	332
N. tabacum	VIGVFESIQPSDSDLGAKVPRDVKIQGIWYAQLE---	331
N. b. 33-III	VIGVFESIQPSDSDLGAKVPRDVKIQGIWYAQLDS-	333
N. b. 33-IV	VIGVFESIQPSDSDLGAKVPRDVKIQGIWYAQLDS-	333
L. esculentum	VIGVFESIQPSDSDLGAKVPRDVKIQGIWYAQLE--	329
S. tuberosum	VIGVFESIQPSDSDLGAKTPKDVKIQGIWYAQLES-	333
S. oleracea	VIGVFQSLQPSDSDLGAKVPRDVKIEGVVWYAQLEQQ	332
P. sativum	VIGVFESIQPSDSDLGAKAPRDKVQGIWYAQLES-	329
A. thaliana.2	VIGVFESLQPSDSDLGAKVPRDVKIQGVWYGQIE--	331
A. thaliana.1	VIGVFESLQPSDSDLGAKVPRDVKIQGVWYGQLE--	332
B. gymnorrhiza	VIGVFESLQPSDSDLGAKVPRDVKIQGIWYAQLDS-	332
F. agrestis	VIGVFESIQPSDSDLGSKAPKDVKIQGIWYAQLE--	329
O. sativa	VIGVFESVQPSDSDLGAKVPRDVKIQGVWYAQLE--	333
T. aestivum	VIGVFESVQPSDSDL--EAPRDKVQGIWYAQLESN	325
	*****:*:****** :*****:*:***	

Fig. 30.- Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas deducidas de los polipéptidos PsbO de *N. benthamiana* con las de otras especies vegetales.

### D.3.2.- Clonación de psbP. Análisis de las secuencias de cDNA y aminoacídicas deducidas

#### D.3.2.1.- Estrategia de clonación de los cDNAs correspondientes a psbP

Para la amplificación por PCR de los cDNAs que codifican la proteína PsbP se diseñó un primer cebador (24a) (aptdo. C.7.1 de *M. y M.*) basándonos en las secuencias nucleotídicas deducidas del extremo amino terminal de las proteínas maduras de *N. benthamiana* (ver apartado D.2 de *Resultados*) y de las secuencias de *N. tabacum* disponibles en las bases de datos (X64347, X64348, X62426, X62427, X55354 y X58909). La secuencia de 24a contiene 11 nt de la región codificadora del

péptido señal y los siguientes 14 nt de la región N-terminal de la proteína madura. Utilizando los cebadores 24a y 110 y como molde la genoteca de *N. benthamiana*, según se detalla en el apartado C.7.3.8 de *M. y M.*, se amplificaron 4 bandas de cDNA de 700, 500, 300 y 200 bp. Todas ellas se clonaron y mediante el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas se tuvo que las dos bandas más pequeñas eran productos inespecíficos de la PCR y que las dos más grandes eran dos secuencias distintas (clones 3' en las tablas 4a y 4b), identificadas como cDNA del mRNA de psbP por comparación mediante BLAST con las secuencias de las bases de datos.

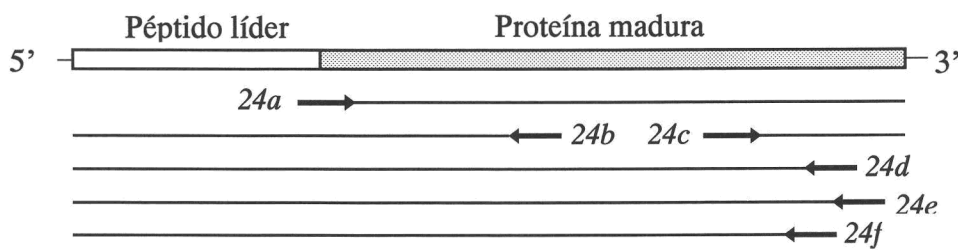


Fig. 31.- Esquema de la organización genética del mRNA de psbP. Las secuencias líder y 3'-NC se representan con líneas. La región codificadora del péptido señal y de la proteína madura se representa con rectángulos. La posición de los oligonucleótidos 24a, 24b, 24c, 24d, 24e y 24f se muestran con flechas.

Para, por un lado completar estas dos secuencias en sentido 5', y por otro amplificar otras secuencias de cDNA correspondientes a este gen que posiblemente existieran en *N. benthamiana*, se optó por el diseño de un segundo cebador localizado 300 pb por debajo de la zona complementaria al oligonucleótido 24a (ver figs. 31 y 32), en una región altamente conservada en las dos secuencias ya obtenidas y en las de *N. tabacum* disponibles en las bases de datos. Con este cebador denominado 24b y mediante 5'-RACE, como se detalla en el aptdo. C.7.3.8 de *M. y M.*, se amplificaron 2 bandas de cDNA. De su clonación y análisis se obtuvieron cuatro secuencias (clones 5', tablas 4a y 4b). Tres de ellas eran distintas entre sí. Dos solapaban con las amplificadas por 24a y la otra era desconocida.



Algunas de las secuencias obtenidas con este cebador *24b* no contenían el extremo 5' codificante del péptido señal, debido posiblemente a inestabilidad del mRNA o a una fuerte estructura secundaria que dificulta la actividad de la transcriptasa inversa con la que se obtiene el cDNA. Para evitar este inconveniente de la técnica de RACE, se procedió al diseño de un tercer cebador *24c* (fig. 24), que amplificara en sentido 3' del mRNA. Su secuencia está 75 pb antes del codón de parada de la traducción, en una zona muy conservada en las secuencias de *N. benthamiana* amplificadas con el cebador *24a* y en las de *N. tabacum*. No se encontró una zona altamente conservada en la región de solapamiento de los insertos de los clones 5' y 3' adecuada para el diseño del nuevo cebador. En general, clones que contengan las secuencias amplificadas por el cebador *24c* se llamarán 3P. Si en *N. benthamiana* el extremo 3'-NC del mRNA es la de mayor variabilidad, como ocurre con las de *N. tabacum*, la clonación con este nuevo cebador de las secuencias 3'-NC permitiría el diseño de un cebador específico para cada una de las isoformas encontradas con el que amplificarlas en sentido 5' para obtener la secuencia codificante completa. Utilizando como molde el cDNA obtenido con la transcriptasa inversa de AMV a partir de mRNA de *N. benthamiana* (aptdo. C.7.3.8 de *M. y M.*) y como cebadores *24c* y 110, se amplificaron dos bandas. Tras la clonación de ambas se obtuvieron plásmidos que contenían secuencias que solapaban con las dos amplificadas con *24a* y varias repeticiones de una secuencia desconocida.

Basándonos en la divergencia de estas tres secuencias de la región 3'-NC se diseñó un cebador específico para cada una de ellas (figs. 31 y 32). Estos cebadores fueron *24d*, *24e* y *24f* y amplifican, en sentido 3'-5' del mRNA, la secuencia codificante completa más las secuencias parciales de las dos regiones NC. Utilizando como molde la genoteca de cDNA de *N. benthamiana* (aptdo. C.7.3.8 de *M. y M.*) se obtuvieron varias bandas de cDNA, concretamente 5 con el cebador *24d*, otras 5 con el cebador *24e* y 6 con el cebador *24f*. En cada caso se identificó una única banda como cDNA de *psbP* mediante southern blot como se detalla en el aptdo. C.7.3.10 de *M. y M.* Los clones obtenidos a partir de las bandas seleccionadas se han denominado clones 5P. De su secuenciación y análisis se deduce que estos clones contienen cuatro secuencias distintas de cDNAs correspondiente a *psbP*.

		24-I	24-II		
Clones 5'	Molde	cDNA 5'RACE	cDNA 5'RACE		
	Cebadores	24b y NUP	24b y NUP		
	Clones	p24-I-5A	p24-II-5A	p24-II-5B	
	Long. (nt)	208	594	730	
Clones 3'	Molde	Genoteca cDNA ( <i>N. b.</i> )	Genoteca cDNA ( <i>N. b.</i> )		
	Cebadores	24a y 110	24a y 110		
	Clones	p24-I-3A	p24-II-3A		
	Long. (nt)	867	876		
Clones 3P	Molde	cDNA AMV-RT	cDNA AMV-RT		
	Cebadores	24c y 110	24c y 110		
	Clones	p24-I-3P.A	p24-II-3P.A	p24-II-3P.B	
	Long. (nt)	197	246	288	
Clones 5P	Molde	Genoteca cDNA ( <i>N. b.</i> )	Genoteca cDNA ( <i>N. b.</i> )		
	Cebadores	24d y 101	24fy 101		
	Clones	p24-I-5P.A	p24-I-5P.B	p24-II-5P.A	p24-II-5P.B
	Long. (nt)	919	862	887	910
Long. total (nt)		1006	1038		

Tabla 4a.- Esquema de los clones parciales de los cDNAs de *psbP* 24-I y 24-II de *N. benthamiana*. Se muestran los clones analizados para establecer las secuencias nucleotídicas de *psbP*, su tamaño, así como los cebadores y el molde de cDNA utilizados para su obtención.



		24-III		24-IV	
Clones 5'	Molde	cDNA 5'RACE		cDNA 5'RACE	
	24b y NUP	24b y NUP		24b y NUP	
	p24-III-5A	-		p24-III-5A	-
	291	-		291	-
Clones 3'	Molde	Genoteca cDNA ( <i>N. b.</i> )		Genoteca cDNA ( <i>N. b.</i> )	
	24a y 110	24a y 110		24a y 110	
	-	-		-	
	-	-		-	
Clones 3P	Molde	cDNA AMV-RT		cDNA AMV-RT	
	24c y 110	24c y 110		24c y 110	
	p24-C-3P.A	p24-C-3P.B		p24-C-3P.A	p24-C-3P.B
	298	305		298	305
Clones 5P	Molde	Genoteca cDNA ( <i>N. b.</i> )		Genoteca cDNA ( <i>N. b.</i> )	
	24e y 101	24e y 101		24e y 101	
	p24-III-5P.A	p24-III-5P.B	p24-III-5P.A	p24-III-5P.B	p24-II-5P.B
	856	910	856	910	910
Long. total (nt)		1085		1087	

Tabla 4a.- Esquema de los clones parciales de los cDNAs de psbP 24-III y 24-IV de *N. benthamiana*. Se muestran los clones analizados para establecer las secuencias nucleotídicas de psbP, su tamaño, así como los cebadores y el molde de cDNA utilizados para su obtención.

Para obtener las secuencias completas de los cDNAs (secuencia parcial de la secuencia líder más las completas de la región codificante y de la 3'-NC) han de solaparse los insertos contenidos en los clones 5P con los de los clones 3P (tablas 4a y 4b).

#### D.3.2.2- Análisis de las secuencias nucleotídicas de los distintos cDNAs de *psbP*

Las secuencias completas de los cDNAs analizados, *24-I*, *24-II*, *24-III* y *24-IV*, se muestran alineados en la fig. 32.

La isoforma *24-I* tiene una longitud total de 1006 pb. La región codificadora tiene 798 pb, la secuencia parcial de la secuencia líder 83 pb y la región 3'-NC 125 pb. La isoforma *24-II* está constituida por 52 pb de secuencia líder, más 798 pb de región codificadora y más 188 pb de región 3'-NC, que suman un total de 1038 pb. La región codificante de la isoforma *24-III* tiene 807 pb. Su región 3'-NC tiene 236 pb y la secuencia parcial de la secuencia líder 42 nt, haciendo un total de 1085 nt. Finalmente, la secuencia *24-IV* posee 1087 pb de los cuales los primeros 44 pb forman parte de la secuencia líder, 807 pb constituyen el marco de lectura abierta y 236 pb la región 3'-NC.

Para facilitar el análisis de las secuencias, éstas han sido numeradas asignando la posición +1 a la primera base del codón de iniciación de la traducción.

La secuencia nucleotídica *24-I* tiene un grado de homología del 87% con la secuencia *24-II*. Respecto a las zonas no codificantes, se han podido secuenciar 31 pb más de la secuencia líder en *24-I*, y en la región 3'-NC se diferencia por tres inserciones, de 34, 11 y 18 pb. En la región codificante, presentan 12 mutaciones silenciosas y 10 no silenciosas, de las cuales 5 dan lugar a cambio aminoacídico conservativo, 4 a cambio semiconservativo, y solo uno a un cambio no conservativo.

Entre las secuencias *24-I* y *24-III* hay un grado de homología del 72%. De la primera se han secuenciado 41 pb más en la secuencia líder, y la región 3'-NC difiere en 6 deleciones de 56, 11, 18, 13, 3 y 18 pb, y una inserción de 2 bases. En el marco abierto de lectura presentan 66 sustituciones silenciosas y 54 no silenciosas: 31 dan

lugar a cambio aminoacídico conservativo, 11 a semiconservativo y 12 a no conservativo.

El grado de homología entre *24-I* y *24-IV* es del 73,2%. La secuencia líder de *24-I* posee 39 pb más secuenciados que la misma región de *24-IV*. En su región 3'-NC, *24-I* presenta inserciones y deleciones con respecto a las de *24-IV* idénticas a las ya descritas en la comparación con *24-III*. Las regiones codificantes de *24-I* y *24-IV* presentan 57 sustituciones silenciosas y 49 no silenciosas: 29 dan lugar a cambio aminoacídico conservativo, 11 a cambio semiconservativo y 10 a cambio no conservativo.

La secuencia nucleotídica *24-II* guarda un grado de homología del 76,9% con la secuencia *24-III*. Ha sido posible la secuenciación de 10 pb más en su secuencia líder y en la región 3'-NC presenta cuatro deleciones (de 22, 11, 13 y 3 pb) y una inserción (de 2 pb). En el marco de lectura abierta presenta 76 mutaciones silenciosas y 55 no silenciosas. De ellas, 32 dan lugar a cambio aminoacídico conservativo, 10 a cambio semiconservativo y 13 a cambio no conservativo.

Entre *24-II* y *24-IV* hay un porcentaje de homología del 76,8%. La secuencia parcial de la zona líder de *24-II* posee 8 pb más que la correspondiente de *24-IV*, y en la región 3'-NC también difieren en cuatro deleciones (de 22, 11, 13 y 3 pb) y una inserción (de 2 pb). En la región codificante presentan 60 sustituciones silenciosas y 54 no silenciosas de las cuales 32 provocan cambios aminoacídicos conservativos, 9 semiconservativos y 13 no conservativos.

Finalmente, comparamos las secuencias *24-III* y *24-IV*. Entre ellas hay un grado de homología del 96,2%. La secuencia de la secuencia líder de *24-III* posee 2 pb más, y la secuencia 3'-NC es idéntica. Las regiones codificantes de ambas secuencias presentan 10 mutaciones silenciosas, 5 que dan lugar a cambios aminoacídicos conservativos, 1 a un cambio semiconservativo, y 2 a no conservativos.

Los marcos de lectura abierta de las secuencias *24-I* y *24-II*, con respecto a los de *24-III* y *24-IV*, presentan en la zona codificante del péptido señal, cinco deleciones de 1, 2, 3, 7 y 3 pb, además de una deleción de un base, no afectándose la fase de lectura de la zona codificante de la proteína PsbP madura.



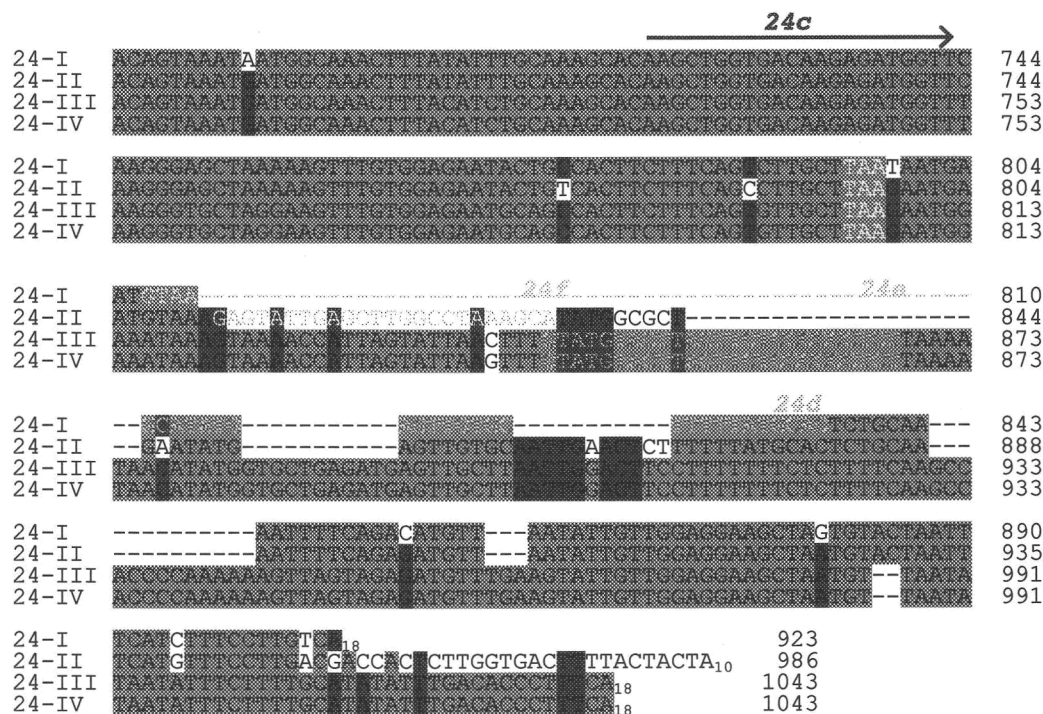


Fig. 32.- Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de los cDNAs que codifican los isoformas de PsbP de *N. benthamiana*. Las posiciones sombreadas en verde están conservadas en todas las secuencias, en azul conservadas en el 75% y en rojo en el 50%. Se marcan: los codones de iniciación (verde) y terminación (amarillo), el codón que codifica el primer residuo de la secuencia madura (azul), las sustituciones no conservativas (x), y los cebadores utilizados.

En las isoformas 24-I y 24-II, el péptido señal está codificado en la región 1-237 y en las otras dos en la región 1-246. Desde la posición 238 ó 247 en cada caso y hasta el codón de parada de la traducción, se codifica la secuencia de la proteína madura.

En el alineamiento múltiple de las cuatro secuencias de cDNA obtenidas para *psbP* en *N. benthamiana*, mostrado en la fig. 32, se comprueba que existe una alta variabilidad en ellas, mayor aun en las regiones líder y 3'-NC. En la región codificante existen 57 posiciones que presentan sustituciones silenciosas y 69 no silenciosas. En

la región que codifica el péptido señal hay 12 posiciones que presentan sustituciones que dan lugar a cambios aminoacídicos conservativos, 7 que dan lugar a cambios semiconservativos, y otras 7 en la que la mutación produce un cambio no conservativo. En la región que codifica la proteína madura hay 23 posiciones en las que podemos encontrar mutaciones que dan lugar a cambios aminoacídicos conservativos, 5 que dan lugar a cambios semiconservativos y 17 a no conservativos. En la fig. 32 se marcan las posiciones en las que encontramos sustituciones que dan un cambio no conservativo de la secuencia aminoacídica.

#### **D.3.2.3.- Análisis de las secuencias aminoacídicas deducidas de los distintos cDNAs de *psbP***

En las secuencias aminoacídicas deducidas de todos los cDNAs obtenidos la proteína madura de PsbP tienen 186 aa, aunque la longitud del péptido señal depende de la isoforma: los de 24-I y 24-II tienen 79 aa mientras que los de 24-III y 24-IV tienen 82 aa. Las secuencias han sido numeradas asignando la posición +1 al primer residuo aminoacídico de la proteína madura. Las características de cada una de las isoformas proteicas (longitud, peso molecular calculado y pI teórico) se resumen en la tabla 5.

Si comparamos entre sí las cuatro secuencias aminoacídicas deducidas de los cDNAs obtenidos correspondientes a *psbP* de *N. benthamiana*, vemos que no son secuencias altamente conservadas. Así, 24-I y 24-II tienen un grado de identidad del 92% muy similar al de homología (93%). Entre ellas existen 4 cambios conservativos y 3 semiconservativos en el péptido señal, y uno conservativo, uno semi y uno no conservativo en la secuencia de la proteína madura.

	24-I	24-II	24-III	24-IV
<b>longitud del precursor (aa)</b>	265	265	268	268
<b>longitud del péptido señal (aa)</b>	79	79	82	82
<b>longitud proteína madura (aa)</b>	186	186	186	186
<b>peso molecular (kDa) (precursor)</b>	20265,5 (28503,0)	20350,6 (28717,3)	20095,3 (28589,9)	20107,3 (28579,8)
<b>pI (precursor)</b>	5,27 (8,31)	5,10 (7,67)	5,28 (6,83)	5,28 (7,65)

*Tabla 5.- Secuencias aminoacídicas deducidas de las cuatro secuencias de cDNA obtenidas para psbP: longitud, peso molecular y pI de la proteína madura. Los valores correspondientes a su precursor figuran entre paréntesis.*

Comparando 24-I con 24-III, que presentan un grado de identidad del 76% y el de homología del 86%, vemos que entre ambas existen, en la secuencia del péptido señal, 8 cambios aminoacídicos conservativos, y semiconservativos y 5 no conservativos. Y en la secuencia de la proteína madura tienen 23 cambios conservativos, 4 semiconservativos y hasta 6 no conservativos.

Esta secuencia 24-I guarda con la 24-IV también un 76% de identidad pero un 84% de homología. Entre ambas hay, en la secuencia del péptido señal, 6 cambios conservativos, 7 semiconservativos y 4 no conservativos; y en la secuencia de la proteína madura 23 cambios conservativos, 4 semiconservativos y 6 no conservativos.

Entre 24-II y 24-III hay un 74% de identidad y un 82% de homología. En sus péptidos señales encontramos 10 cambios aminoacídicos conservativos, 4 semiconservativos y 5 no conservativos, mientras que en las secuencias de las proteínas maduras vemos 22 cambios no conservativos, 5 cambios semiconservativos



y 8 no conservativos. *24-II* y *24-IV* también tienen un 74% de identidad y un 82% de homología y ambos péptidos señales se diferencian en un cambio aminoacídico semiconservativo menos que *24-II* y *24-III*. En la secuencia madura tienen el mismo número de cambios que esta última pareja.

Finalmente, comparamos las secuencias aminoacídicas deducidas para *24-III* y *24-IV*. Éstas son las secuencias más parecidas, con un 93% en identidad de secuencia y un 94% en homología. Sus péptidos señales difieren en 3 cambios conservativos, 1 semiconservativo y 2 no conservativos, y las secuencias proteicas maduras en solo 2 cambios aminoacídicos conservativos.

Además de las sustituciones ya detalladas, en la secuencia correspondiente al péptido señal de *24-I* y *24-II* encontramos con respecto a la del péptido señal de *24-III* y *24-IV* dos deleciones, una de 1 aa (entre las posiciones -66 y -65 de *24-I* y *24-II*) y otra de 3 aa (entre sus posiciones -56 y -55), y una inserción de 1 aa en su posición -46 (fig. 33).

En la fig. 33 se muestra el alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas deducidas de las isoformas de PsbP obtenidas. En ella se comprueba que en la secuencia del péptido señal existen en un total de 24 posiciones con algún tipo de cambio aminoacídico. Si tomamos como modelo la secuencia *24-I* encontramos que *24-II* posee 4 cambios conservativos (posiciones -29, -27, -13 y -10) y solo uno no conservativo (posición -30); *24-III* presenta 9 cambios conservativos (en -73, -67, -61, -36, -31, -26, -25, -17 y -10), 8 semiconservativos (en -66, -62, -58, -52, -47, -35, -30 y -29) y 4 no conservativos (en -64, -60, -59 y -54); *24-IV* presenta 6 cambios conservativos (en -73, -67, -36, -31, -26 y -17), 7 semiconservativos (en -66, -62, -58, -52, -35, -30 y -29) y 4 no conservativos (en -61, -60, -59 y -54) (fig. 33).

En la región codificante de la proteína madura existen cambios aminoacídicos conservativos en 23 posiciones (15, 20, 30, 32, 42, 49, 55, 59, 62, 63, 74, 79, 86, 90, 113, 116, 119, 139, 148, 153, 173, 179 y 185); encontramos cambios semiconservativos en 10 posiciones (14, 37, 73, 94, 106, 118, 122, 125, 128 y 180); y no conservativos en solo 3 posiciones (19, 110 y 120), indicadas en la fig. 33.



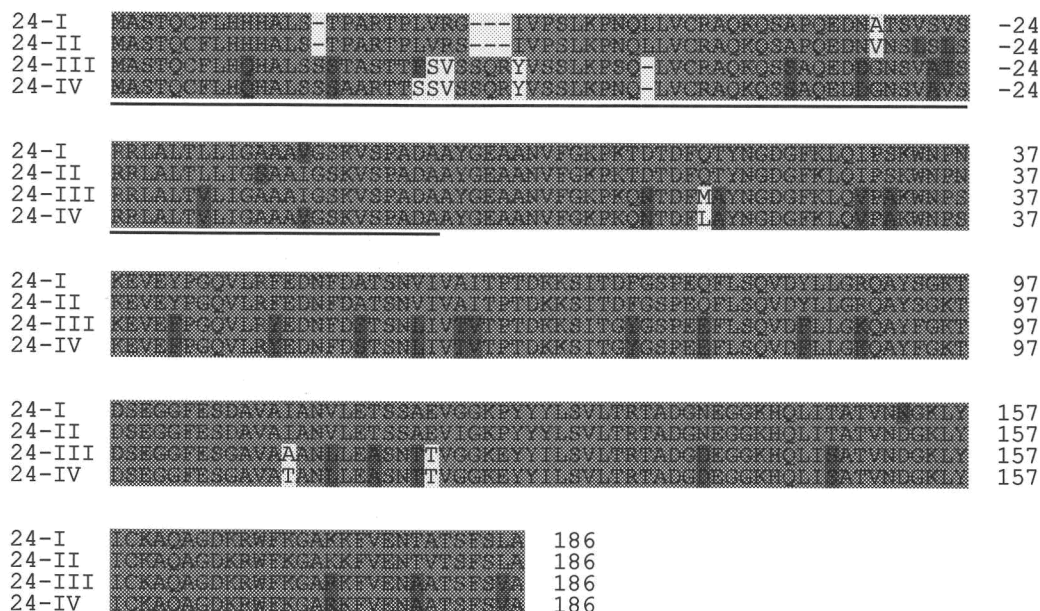


Fig. 33.- Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas deducidas de los cDNAs de las isoformas de la proteína PsbP de *N. benthamiana*. La región correspondiente al péptido señal se muestra subrayada. Las posiciones conservadas se marcan en verde, las sustituciones conservativas en azul, las semiconservativas en rojo y las no conservativas en amarillo.

En la fig. 34 se presenta el alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas deducidas de los cuatro clones de *psbP*, obtenidos en el presente trabajo, con las existentes en las bases de datos para otras especies vegetales. En ella comprobamos que, en general PsbP tiene un grado de conservación bastante elevado. La región con la región más divergente es la correspondiente al péptido líder, principalmente en cuanto a longitud, puesto que observamos muchas inserciones o deleciones. Las zonas mejor conservadas del péptido líder son el extremo N-terminal del dominio STD y el dominio LTD. Este último presenta el único motivo semiconservado a lo largo de la evolución y característico de los precursores translocados por la vía Tat. En cuanto a la secuencia de las proteínas maduras, vemos que éstas presentan gran número de sustituciones, en su mayoría conservativas, pero también muchas no conservativas, apuntando a que la estructura de PsbP sea bastante flexible.



N. b. 24-I	SGKTDSEGGFESDAVAI--ANVLETSSAEVIGKPYYYLSVLRTRTADGNEGG-----KHQL	225
N. tabacum.1	SGKTDSEGGFESDAVAI--ANVLETSSAEVGGKPYYYLSVLRTRTADGNEGG-----KHQL	225
N. b. 24-II	SGKTDSEGGFESDAVAI--ANVLETSSAEVGGKPYYYLSVLRTRTADGNEGG-----KHQL	225
N. tabacum.2	SGKTDSEGGFESDAVAI--ANVLETSSAEVGGKQYYYLSILRTRTADGNEGG-----KHQL	226
N. b. 24-IV	FGKTDSEGGFESGAVAT--ANLLEASNTTVGGKEYYILSVLRTRTADGDEGG-----KHQL	228
N. tabacum.3	FGKTDSEGGFESGAVAT--ANLLEASNTTVGGKEYYILSVLRTRTADGDEGG-----KHQL	228
N. b. 24-III	FGKTDSEGGFESGAVAA--ANLLEASNTTVGGKEYYILSVLRTRTADGDEGG-----KHQL	228
N. tabacum.4	--KTDEGGFESGAVATATANLLETSSSTVGGKEYYILSVLRTRTADGDEGG-----KHQL	228
N. tabacum.5	FGKTDSEGGFESGAVAT--ANLLETSSSTVGGKEYYILSVLRTRTADGDEGG-----KHQL	228
L. esculentum	FGKTDSEGGFESGAVAT--ANLLEASSATVGGKEYYILSVLRTRTADGDEGG-----KHQL	218
S. tuberosum	FGKTDSEGGFESGAVAT--ANLLEASSATVGGKQYYYLSVLRTRTADGDEGG-----KHQL	220
S. alba	FGETASEGGFDNNAVAT--ANILETNIQDVGGKPYYYLSVLRTRTADGDEGG-----KHQL	220
A. thaliana.1	FGETASEGGFDNNAVAT--ANILESSQEVGGKPYYYLSVLRTRTADGDEGG-----KHQL	223
A. thaliana.2	VGETASEGGFDANAVAT--ANILETSTQELGGKEYYILSVLRTRTADGDEGG-----KHQL	224
F. agrestis	SGKTASEGGFDPDSVAT--ANILEVSTPVVGGKQYNYISVLRTRTADGDEGG-----KHVY	224
N. p.	FGKTISEGGFEPNAVAT--ANILETSTPVVGGKDYYSIHVLRTRTADGDEGG-----KHLL	225
S. oleracea	FGKTDSEGGFDSGVVAS--ANVLESSTPVVGGKQYYSITVLRTRTADGDEGG-----KHQV	227
P. sativum	FGQTDSEGGFDTNAVAV--ANILESSAPVIGGKQYNYISVLRTRTADGDEGG-----KHQL	219
C. sativus	FGKTASEGGFDPDAVAT--ANILEATASNVNGKDYFVSVLRTRTADGDEGG-----KHQL	223
O. sativa.1	SGKTDSEGGFESDAVAT--ANILESSAPVGGKQYYSVTLRTRTADGDEGG-----KHQL	214
O. sativa.2	SGKTDSEGGFESDAVAT--ANILESSAPVVEG-----SVLQRNGADEDDGGKRRGKHKQL	212
T. aestivum	GGKTDSEGGFESDAVAT--ANVLESSAPVVDGKQYYSVTLRTRTADGDEGG-----KHQL	219
	:* *****: . * :*** . : * :* *.. ::** ** :	
N. b. 24-I	ITATVNDGKLYICKAQAGDKRWFKGAKKFEVENTVTSFSLA	265
N. tabacum.1	ITATVNDGKLYICKAQAGDKRWFRGAKKFEVENTATSFSLA	265
N. b. 24-II	ITATVNGKLYICKAQAGDKRWFKGAKKFEVENTATSFSLA	265
N. tabacum.2	VTATVNDGKLYICKAQAGDKRWFKGAKKFEVENTATSFSLA	266
N. b. 24-IV	ISATVNDGKLYICKAQAGDKRWFKGAKKFEVENAATSFSPA	268
N. tabacum.3	ISATVNDGKLYICKAQAGDKRWFKGAKKFEVENAATSFSPA	268
N. b. 24-III	ISATVNDGKLYICKAQAGDKRWFRGAKKFEVENAATSFSPA	268
N. tabacum.4	ISATVNGGKLYICKAQAGDKRWFKGAKKFEVENAATSFSPA	268
N. tabacum.5	ISATVNGGKLYICKAQAGDKRWFRGAKKFEVENAATSFSPA	268
L. esculentum	ITATVNDGKLYICKAQAGDKRWFKGAKKFEVENAATSFSPA	258
S. tuberosum	ITATVNDGKLYICKAQAGDKRWFRGAKKFEVENAATSFSPA	260
S. alba	ITATVNGGKLYICKAQAGDKRWFKGANHFVEKAATSFSPA	260
A. thaliana.1	ITATVNGGKLYICKAQAGDKRWFKGAKKFEVESAATSFSPA	263
A. thaliana.2	ITATVNGGKLYICKAQAGDKRWFKGAKKFEVENAATSFSPA	264
F. agrestis	ISATVTDGKLYICKAQAGDKRWFKGAKKFEVSTTTTFSPA	264
N. p.	ITATVSDGKLYICKAQAGDKRWFRGAKKFEVESAATSFSPA	265
S. oleracea	IAATVVDGKLYICKAQAGDKRWFKGAKKFEVESAATSFSPA	267
P. sativum	ITATVVDGKLYICKAQAGDKRWFRGAKKFEVETASSFSPA	259
C. sativus	ITATVNDGKLYICKAQAGDKRWFKGAKKFEVESAATSFSPA	263
O. sativa.1	ITATVNDGKLYICKAQAGDKRWFRGAKKFEVESAATSFSPA	254
O. sativa.2	ITATVNDGKLYICKAQAGDKRWFKGAKKFEVESAATSFSPA	252
T. aestivum	ITATVADGKLYVCKAQR-DKRWFKGAKKFEVENAAGSFSPA	258
	:**** .***** *****.***** :. **. *	

Fig. 34.- Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas deducidas de los polipéptidos PsbP de *N. benthamiana* con los de otras especies vegetales.

### D.3.3.- Clonación de psbQ. Análisis de las secuencias de cDNA y aminoácidas deducidas

#### D.3.3.1.- Estrategia de clonación de los cDNAs correspondientes a psbQ

En trabajos previos en nuestro laboratorio se obtuvo la secuencia del extremo amino terminal de la proteína madura PsbQ de *N. benthamiana* por microsecuenciación. La posible secuencia nucleotídica que codifica esta secuencia aminoácida tiene un alto grado de degeneración, lo que impide diseñar un buen cebador específico para la clonación su cDNA. Por esta razón se alinearon las secuencias nucleotídicas de plantas superiores disponibles en las bases de datos (P19589 de *Pisum sativum*, Q12301 de *Spinacea oleracea*, Q41932 de *Arabidopsis thaliana* y Q41048 de *Zea mays*) y se diseñó un cebador (16a) correspondiente a una zona altamente conservada y cercana al extremo amino terminal de la secuencia de la proteína madura (fig. 35).

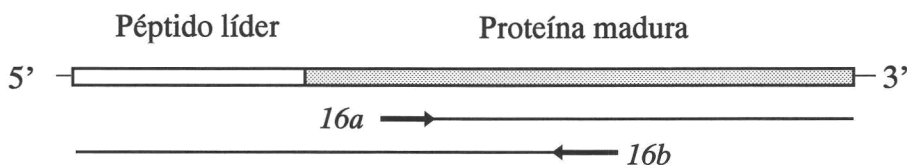


Fig. 35.- Esquema de la organización de los cDNAs. Esquema de organización de los cDNA correspondientes a psbQ. Las secuencias líder y 3'-NC se representan con líneas. La región codificadora del péptido señal y de la proteína madura se representa con rectángulos. La posición de los oligonucleótidos 16a y 16b se muestran con flechas.

La amplificación mediante PCR de la genoteca de cDNA de *N. benthamiana* (aptdo. C.7.3.8 de *M. y M.*), utilizando como cebadores los oligonucleótidos 16a y 102 ó 110, dio lugar en cada caso a dos bandas de cDNA. Tras su clonación y análisis, todas (denominadas clones 3' en la tabla 6 se identificaron como dos secuencias diferentes codificantes de PsbQ por comparación, mediante el algoritmo BLAST, con las secuencias depositadas en las bases de datos.

Para completar las secuencias nucleotídicas hacia su extremo 5' se diseñó un cebador (16b) en una zona muy conservada en las dos secuencias ya obtenidas a 317 pb de la zona en la que complementa el oligonucleótido 16a (figs. 35 y 36). Con este cebador se amplificó mediante 5'-RACE 2 bandas de cDNA, como se detalla en el aptdo. C.7.3.8 de *M. y M.*. La clonación de las bandas y el posterior análisis permitió determinar en cuatro el número de secuencias diferentes (contenidas en los clones 5' de la tabla 6) que solapan con las previamente obtenidas (fig. 16).

En la siguiente tabla (tabla 6) se detallan los clones obtenidos para las secuencias codificantes de la proteína psbQ de *N. benthamiana*.

		16-I			16-II		
Clones 5'	Molde	cDNA 5'RACE			cDNA 5'RACE		
	Cebadores	16b y NUP			16b y NUP		
	Clones	p16-I-5A	p16-I-5B		p16-II-5A	p16-II-5B	p16-II-5C
	Long. (pb)	652	652		611	563	561
Clones 3'	Molde	Genoteca cDNA ( <i>N. b.</i> )			Genoteca cDNA ( <i>N. b.</i> )		
	Cebadores	16a y 102	16a y 110		16a y 102	16a y 110	
	Clones	p16-I-3A	p16-I-3B	p16-I-3C	p16-II-3A	p16-II-3B	
	Long. (pb)	483	487	486	486	487	
Long. total (pb)		816			817		

Tabla 6.- Esquema de los clones parciales de los cDNAs de psbQ de *N. benthamiana*. Se muestran los clones analizados, así como los cebadores y el molde de cDNA utilizados para su obtención.

### D.3.3.2.- Análisis de las secuencias nucleotídicas de los distintos cDNAs de *psbQ*

En la fig. 36 se muestran las secuencias de cDNA codificantes de la proteína PsbQ de *N. benthamiana* obtenidas, a las que llamamos *16-I* y *16-II*. En ella vemos que la secuencia de cDNA de *16-I* consta de 816 pb: 30 pb de la secuencia líder, un marco de lectura abierta de 687 pb y la región 3'-NC de 99 pb. La secuencia *16-II* posee un total de 817 pb. La longitud de la secuencia líder obtenida en este caso es igual a la secuenciada para *16-I*. La región codificante también contiene 687 pb, y la región 3'-NC posee 100pb. Para facilitar su análisis, y por analogía con las secuencias nucleotídicas anteriormente descritas, se ha asignado la posición +1 de la secuencia nucleotídica a la primera base del codón de iniciación de la traducción.

Tanto la secuencia *16-I* como *16-II* contienen la cola de poli-A en su extremo 3', lo que indica que la región 3'-NC está completa en ambos casos.

En la fig. 36 también se comprueba que las secuencias del marco de lectura abierta de *16-I* y *16-II* difieren en sólo 11 posiciones. En diez de ellas la mutación es silenciosa. Tres de ellas ocurren en los primeros 237 pb que codifican el péptido señal (posiciones 75, 129 y 264), y siete en la región que codifica la secuencia madura de la proteína (posiciones 282, 337, 339, 513, 519, 537 y 546). La sustitución en la posición 70, en la región que codifica el péptido señal es la única no silenciosa y da lugar a un cambio aminoacídico semiconservativo.

La secuencia de cDNA *16-II* tiene una delección de una base tres posiciones detrás del codón de terminación y una inserción de dos bases antes de la cola de adeninas respecto a la secuencia *16-I*. El grado de homología entre las dos secuencias es del 97,3%

Junto con los clones p16-I-5A, p16-I-5B, p16-II-5A, p16-II-5B, y p16-II-5C que sirvieron para completar las secuencias de los cDNAs codificantes de las dos isoformas de la proteína PsbQ, se obtuvieron otros cuatro clones (llamados p16-5a, p16-5b, p16-5c y p16-5c) distintos a los anteriores. Estas secuencias parciales son combinaciones de las secuencias nucleotídicas de *16-I* y *16-II* pero todas ellas codifican la misma proteína madura con uno u otro péptido líder.



16-A	TTAAACATAATTTGAGAGGCTTCACCTAT	GGTCATGCTATGGCTTCAATGGGTTGG	30
16-B	CTGACACAAAATTGAGAAAGTTGCCAAA	GGTCATGCTATGGCTTCAATGGGTTGG	30
16-A	AAATGGGATTTCTGAACTCTGCTGGGATCC	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	90
16-B	AAATGGGATTTCTGCTGAAAATGCTGCTGGG	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	90
		x	
16-A	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	150
16-B	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	150
16-A	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	210
16-B	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	210
16-A	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	270
16-B	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	270
		16a →	
16-A	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	330
16-B	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	330
16-A	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	390
16-B	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	390
16-A	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	450
16-B	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	450
16-A	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	510
16-B	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	510
16-A	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	570
16-B	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	570
		← 16b	
16-A	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	630
16-B	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	630
16-A	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	690
16-B	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	690
16-A	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	750
16-B	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	749
16-A	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	786
16-B	CTTATGACACCAAGCAAAATTCCTTTGGT	TAGGCTTCTGCTGGGATCCGCTTTGAG	787

Fig. 36.- Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de los cDNAs que codifican los isoformas de PsbQ de *N. benthamiana*. Las posiciones sombreadas en verde están conservadas en todas las secuencias, en azul conservadas en el 75% y en rojo en el 50%. Se marcan además los codones de iniciación (verde) y terminación (amarillo), el codón que codifica el primer residuo de la secuencia madura (azul), la sustitución no silenciosa (x), y los cebadores utilizados.

**D.3.3.3.- Análisis de las secuencias aminoacídicas deducidas de los distintos cDNAs de *psbQ***

En la tabla 7 se detallan las características de las secuencias aminoacídicas deducidas de las nucleotídicas 16-I y 16-II. Ambas tienen un péptido señal de 80 residuos aminoacídicos, y la proteína madura tiene una longitud de 148 aa. Los pesos moleculares teóricos y los puntos isoeléctricos de cada proteína se resumen en la tabla 7.

	16-I	16-II
<b>longitud precursor (aa)</b>	228	
<b>longitud péptido señal (aa)</b>	80	
<b>longitud proteína madura (aa)</b>	148	
<b>peso molecular (kDa) (precursor)</b>	16316,7 (24204,8)	16316,7 (24188,7)
<b>pI (precursor)</b>	9,48 (9,72)	9,48 (9,72)

*Tabla 7.- Secuencias aminoacídicas deducidas de las cuatro secuencias de cDNA obtenidas para *psbQ*: longitud, peso molecular y pI de la proteína madura. Los valores correspondientes a su precursor figuran entre paréntesis.*

En la fig. 37, en la que se muestra el alineamiento de las dos secuencias aminoacídicas deducidas de las nucleotídicas obtenidas, se comprueba que las dos proteínas (de 228 aa cada una) son idénticas en su secuencia madura (148 aa) y que únicamente se diferencian en un cambio semiconservativo Cys→Ser en la posición -56 del péptido señal. La posición +1 de la secuencia se ha asignado al primer residuo aminoacídico de la proteína madura.





Fig. 37.- Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas deducidas de los cDNAs de las isoformas de la proteína PsbQ de *N. benthamiana*.

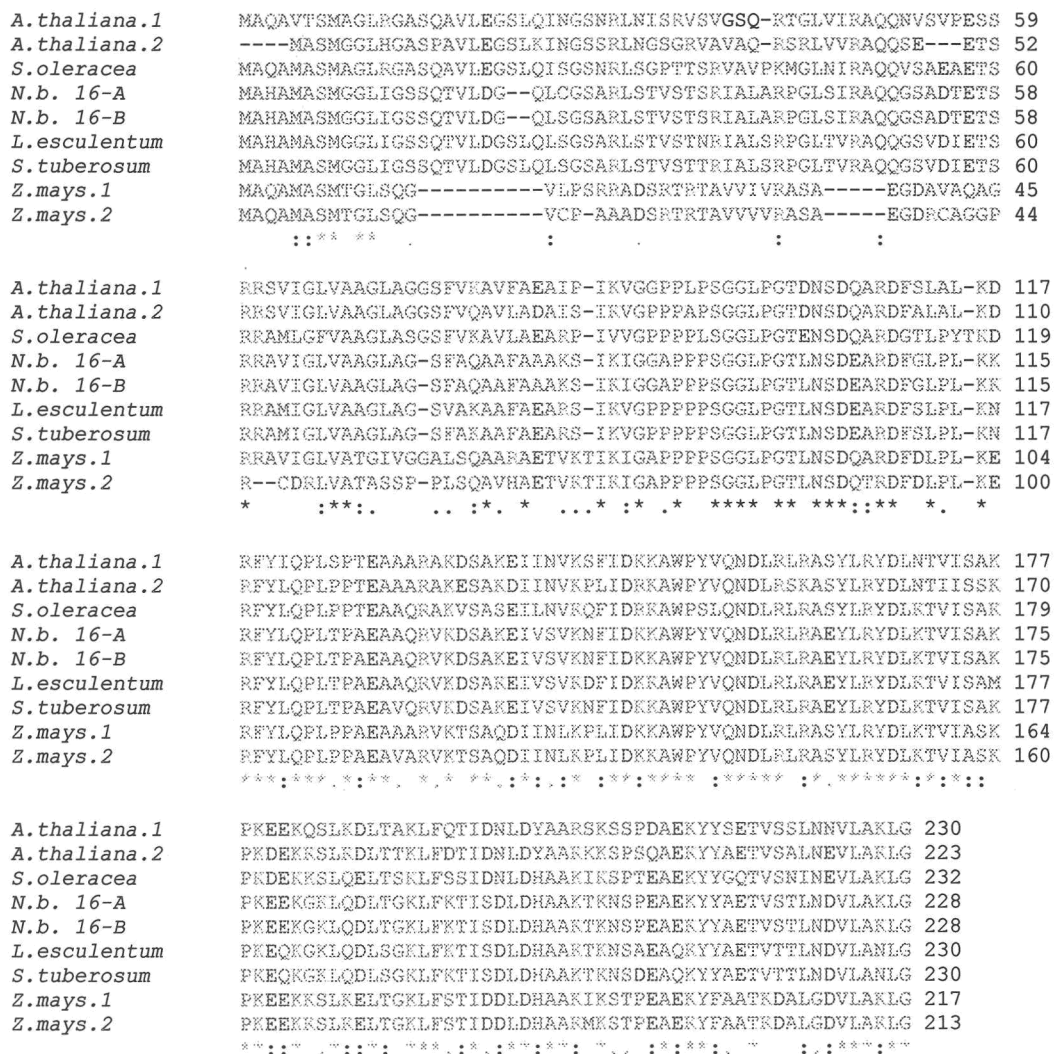


Fig. 38.- Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas deducidas de los polipéptidos PsbP de *N. benthamiana* con los de otras especies vegetales.

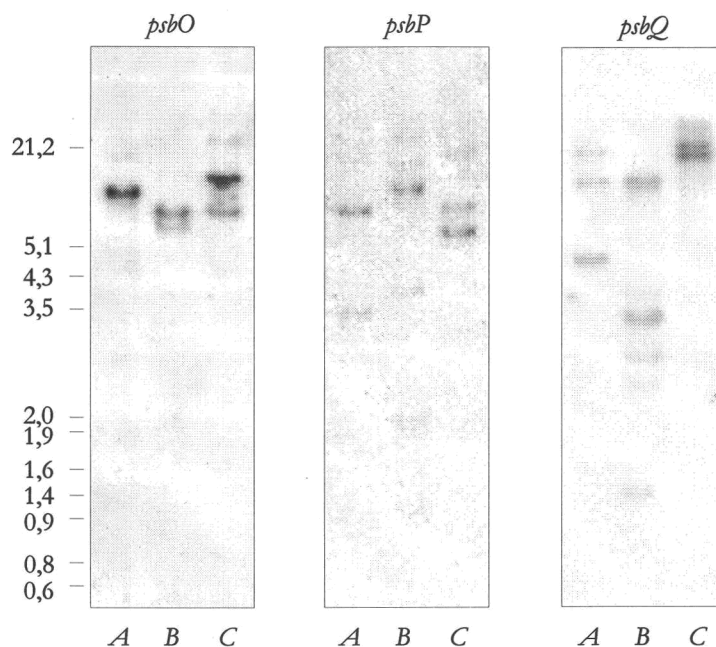
En la fig. 38 se presenta el alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas deducidas de los clones de *psbQ* de *N. benthamiana* obtenidos con secuencias de otras especies vegetales disponibles en las bases de datos. En la región del péptido líder de estas proteínas existe una gran variabilidad, siendo únicamente el motivo característico de los precursores translocados por la vía Tat y la secuencia de reconocimiento de la endopeptidasa luminal que lo procesa a proteína madura las zonas mejor conservadas. La secuencia de la proteína madura de *psbQ* presenta una alta divergencia si observamos el gran número de posiciones no conservadas y lo comparamos con el alto grado de identidad de las secuencias de *PsbO* y *PsbP* entre las especies consideradas. Esta gran variabilidad puede estar relacionado con una estructura secundaria flexible y con el hecho de que esta proteína es la más prescindible, de las tres constituyentes del OEC, para la función del PSII.

#### D.4.- Análisis genómico por southern blot de los genes *psbO*, *psbP* y *psbQ* de *N. benthamiana*

Con el fin de determinar si las tres proteínas del OEC están codificadas por familias multigénicas en *N. benthamiana* se llevó a cabo el análisis mediante Southern blot sobre el DNA genómico digerido con distintas enzimas de restricción según se detalla en el aptdo. C.7.3.7 de *M. y M.*.

En la fig. 39 se observa, para el caso del gen *psbO* que la digestión con *EcoRV* da lugar a 3 bandas cuyos tamaños estimados son 7.0, 3.6 y 3.3 kpb, con *HindIII* dos bandas de 5.4 y 4.9 kpb, y con *XbaI* otras dos de 8.0 y 5.6 pb. Las diferencias en las sumas de los tamaños de banda para cada una de las digestiones (13.9, 10.3 y 13.6 kpb) indican que *psbO* es, en *N. benthamiana*, una familia multigénica.

*Fig. 39.- (en la siguiente página) Análisis por Southern blot de los genes psbO, psbP y psbQ de N. benthamiana y tamaños calculados de las bandas detectadas en cada caso. Digestiones con EcoRV (A), HindIII (B), y XbaI (C).*



Eco RV	r (cm)	tamaño(pb)	r (cm)	tamaño(pb)	r (cm)	tamaño(pb)
	2,6	7003,7	2,1	10192,2	1,8	14039,9
3,8	3595,9	2,9	5781,2	2,3	8686,8	
4,0	3286,0	4,4	2779,4	3,7	3859,5	
	<b>13885,6</b>		<b>18752,8</b>		<b>26586,2</b>	

HindIII	r (cm)	tamaño(pb)	r (cm)	tamaño(pb)	r (cm)	tamaño(pb)
	3,0	5446,9	1,7	14773,4	2,7	6554,4
3,2	4863,1	2,2	9392,4	4,7	2522,3	
		2,6	7003,7	5,3	2004,4	
		4,2	3016,1	5,8	1710,8	
		6,0	1611,9	7,2	1184,5	
		7,5	1089,2	7,7	1039,9	
	<b>10310,0</b>		<b>36886,7</b>		<b>15016,3</b>	

XbaI	r (cm)	tamaño(pb)	r (cm)	tamaño(pb)	r (cm)	tamaño(pb)
	2,4	8061,1	2,0	11104,3	1,7	15568,8
2,9	5781,2	2,8	6148,7	1,9	12734,1	
	<b>13842,3</b>	3,2	4863,1		<b>28302,9</b>	
			<b>22116,1</b>			

### D.5.- Análisis del efecto de la infección viral sobre la expresión génica del huésped

En trabajos anteriores del laboratorio (Barón y col., 1995; Rahoutei y col., 1999; Rahoutei y col., 2000) se describió que la infección tanto por PMMoV-S como por PMMoV-I produce en *N. benthamiana* una caída en la acumulación de las tres proteínas del OEC en las membranas tilacoidales de plantas infectadas. Para discernir si este efecto es debido a una inhibición de la transcripción de los genes *psbO*, *psbP* y *psbQ* o a modificaciones post-transcripcionales, se llevó a cabo el análisis de la acumulación de sus mRNAs a lo largo de la infección. Los experimentos se realizaron tanto en hojas S como AS a partir de los 7 d.p.i., tiempo en el que las plantas infectadas por ambos virus presentaban los síntomas característicos de la infección. Para ello, los RNA totales de las plantas fueron extraídos a distintos tiempos post-inoculación, según se describe en el aptdo. C.7.3.3 de *M. y M.*, y analizados mediante ensayos de Northern, usando sondas específicas para cada una de los tres genes (aptdo. C.7.3.13 de *M. y M.*). Para facilitar el análisis comparativo de la expresión, las membranas fueron hibridadas sucesivamente con distintas sondas.

El análisis se hizo extensivo en estas muestras a otros genes nucleares y cloroplastídicos que codifican distintas proteínas del cloroplasto: PsbA, Lhcb1, PsaK, RbcL, RbcS, y Rca; y de la mitocondria, la glicolato oxidasa (GOX), y que a su vez están involucrados en distintas rutas metabólicas. Los genes *lhcb1*, *psaK*, *rbcS*, *rca* y *gox* están codificados en el DNA nuclear, mientras que *psbA* y *rbcL* lo están en el DNA cloroplastídico. La proteína PsbA, también llamada D1, forma parte del centro de reacción del PSII. Lhcb1 es una proteína cab de unión a clorofilas a/b que forma parte del complejo mayor de antena del PSII (LHCII). PsaK está involucrada en la función y organización de los complejos antena del PSI. RbcL y RbcS son las subunidades grande y pequeña, respectivamente, de la RuBisCO. Rca es la activasa de la RuBisCO y, como ella, se localiza en el estroma del cloroplasto. La GOX mitocondrial forma parte de la vía de la fotorespiración para el metabolismo del fosfoglicolato producido por la oxidación de la ribulosa-1, 5-bifosfato catalizada por la RuBisCO en el cloroplasto.

### D.5.1.- Análisis de la expresión de los genes *psbO*, *psbP* y *psbQ*

En la fig. 40 se muestra el análisis por Northern blot de la acumulación de los mRNAs que codifican las tres proteínas del OEC *PsbO*, *psbP* y *psbQ* en hojas AS y S de plantas de *N. benthamiana* infectadas con PMMoV-S y PMMoV-I, y de sus correspondientes controles, a lo largo de la infección.

En las hojas de las plantas sanas equivalentes a las AS de las plantas infectadas, los niveles de acumulación de los mRNAs *psbO*, *psbP* y *psbQ* experimentan una reducción a lo largo del tiempo, más acusada en el caso de *psbQ*. Un patrón de acumulación similar se observa en las hojas AS de las plantas infectadas con la cepa I, si bien los niveles de acumulación de los tres mRNAs, a partir de los 14 d.p.i., son ligeramente inferiores a los detectados en el control. Este efecto es más acusado en plantas infectadas con PMMoV-S, de forma que los mRNAs de las proteínas del OEC son prácticamente indetectables a partir de los 21 d.p.i.

En las hojas de las plantas control equivalentes a las hojas S, los niveles de los mRNA que codifican las tres proteínas del OEC no sufren cambios significativos a lo largo del periodo analizado. Por el contrario, en las hojas AS de las plantas infectadas con PMMoV-S se observa un descenso progresivo y muy acusado en la acumulación de estos mRNAs, a partir de los 14 d.p.i., de forma que a partir de los 21 d.p.i., y al igual que ocurría en las hojas AS, las señales de hibridación son prácticamente indetectables. En las hojas S de las plantas inoculadas con PMMoV-I también se observa una caída progresiva de los niveles de estos mRNAs entre 14 y 21 d.p.i., aunque menos acusada que en el caso anterior. Esta caída es más aparente en *psbQ* en las plantas infectadas con ambas cepas. Sin embargo, a 28 d.p.i. se detecta un notable incremento de los mRNAs, hasta alcanzar niveles semejantes a los de las plantas control. Este tiempo coincide con la fase de recuperación de la enfermedad, en la cual las hojas jóvenes no desarrollan síntomas agudos (fig. 24, en el aptdo. D.1 de *Resultados*).

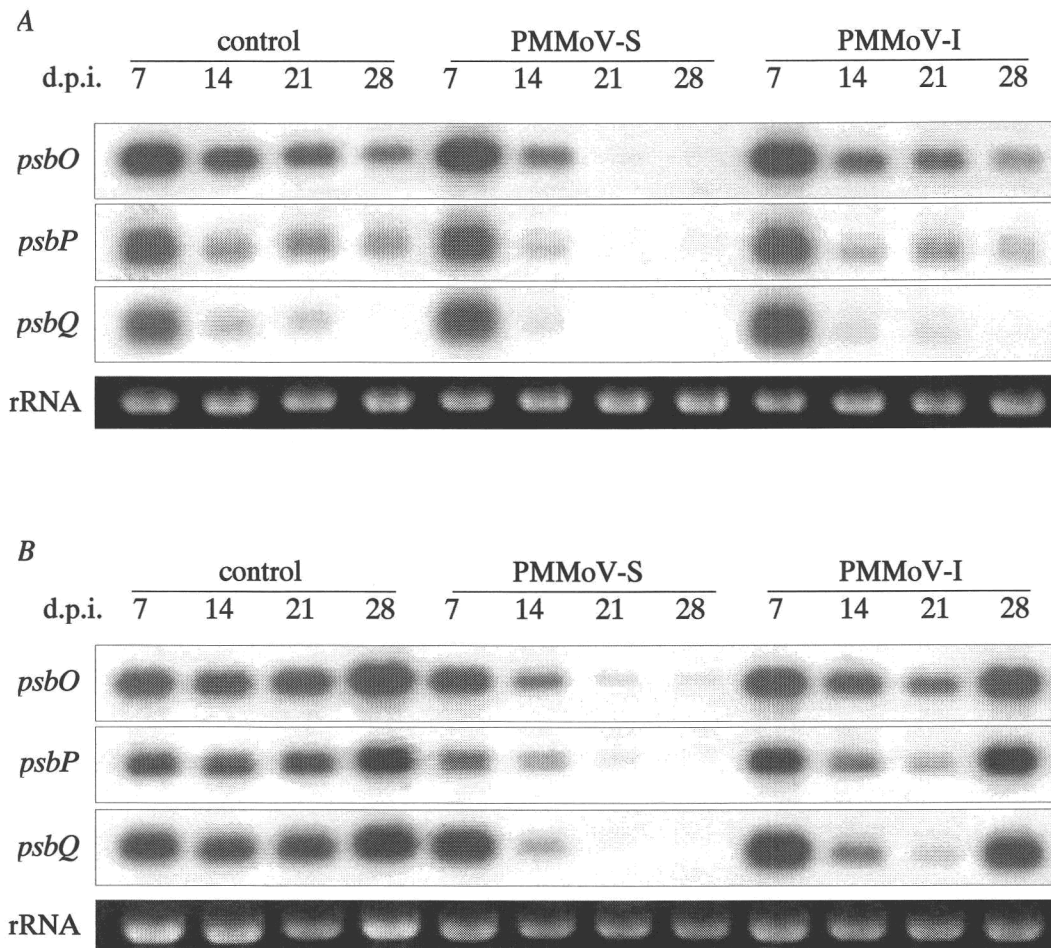


Fig. 40: Análisis de la acumulación de los mRNAs *psbO*, *psbP* y *psbQ* en hojas AS y S de plantas de *N. benthamiana* sanas e infectadas con PMMoV-S y PMMoV-I a lo largo de la infección. Se incluye como control de carga la tinción con bromuro de etidio del rRNA 23 S.

### D.5.2.- Análisis de la expresión de otros genes nucleares y cloroplastídicos

En la fig. 41 se muestra el análisis por Northern blot del efecto de la infección viral en la acumulación de los mRNAs correspondientes a los genes nucleares *lhcb1*, *rca*, *rbcS*, *psaK* y *gox*, y cloroplastídicos *rbcL* y *psbA*, en hojas AS de plantas de *N. benthamiana* infectadas por ambas cepas virales y en las hojas equivalentes de plantas sanas.

En estos ensayos se puede observar que el mRNA Lhcb1 disminuye a partir de los 14 d.p.i., tanto en las plantas sanas como en las infectadas, si bien en estas últimas el efecto es más acusado a partir de 21 d.p.i., y en la infección por PMMoV-S.

Respecto a la acumulación del mRNA rbcS, se observa que también disminuye a partir de los 14 d.p.i. En las plantas infectadas se detecta una caída de mayor intensidad en la acumulación de este mRNA a lo largo de la infección, siendo ésta todavía mayor en presencia de PMMoV-S.

Los niveles de acumulación del mRNA psaK en las hojas AS de plantas sanas sufren un descenso a partir de los 14 d.p.i. En las plantas infectadas disminuyen progresivamente a lo largo de la infección desde los 7 d.p.i., tiempo en el que la señal detectada es inferior a la de las plantas control. Este efecto es mayor en las plantas infectadas con la cepa S, de forma que no se detecta señal de hibridación a partir de los 21 d.p.i.

La acumulación de los mRNAs rca y GOX es compleja en todas las plantas. En plantas sanas disminuye al inicio del análisis, y se incrementa al final. En comparación con éstas, en las plantas infectadas se observa al inicio (7 d.p.i.) una acumulación mayor, seguida de una disminución, aunque son detectables en todos los tiempos analizados. De nuevo, el efecto de la infección viral es más evidente en el caso de plantas inoculadas con PMMoV-S.

La acumulación de los mRNAs correspondientes a los genes cloroplastídicos *rbcL* y *psbA* en hojas AS control es homogénea durante el periodo analizado. En las hojas de plantas infectadas con ambos virus se visualiza una menor acumulación, siendo este efecto muy acusado a partir de los 21 y 28 d.p.i. en las plantas infectadas con PMMoV-S y PMMoV-I, respectivamente.



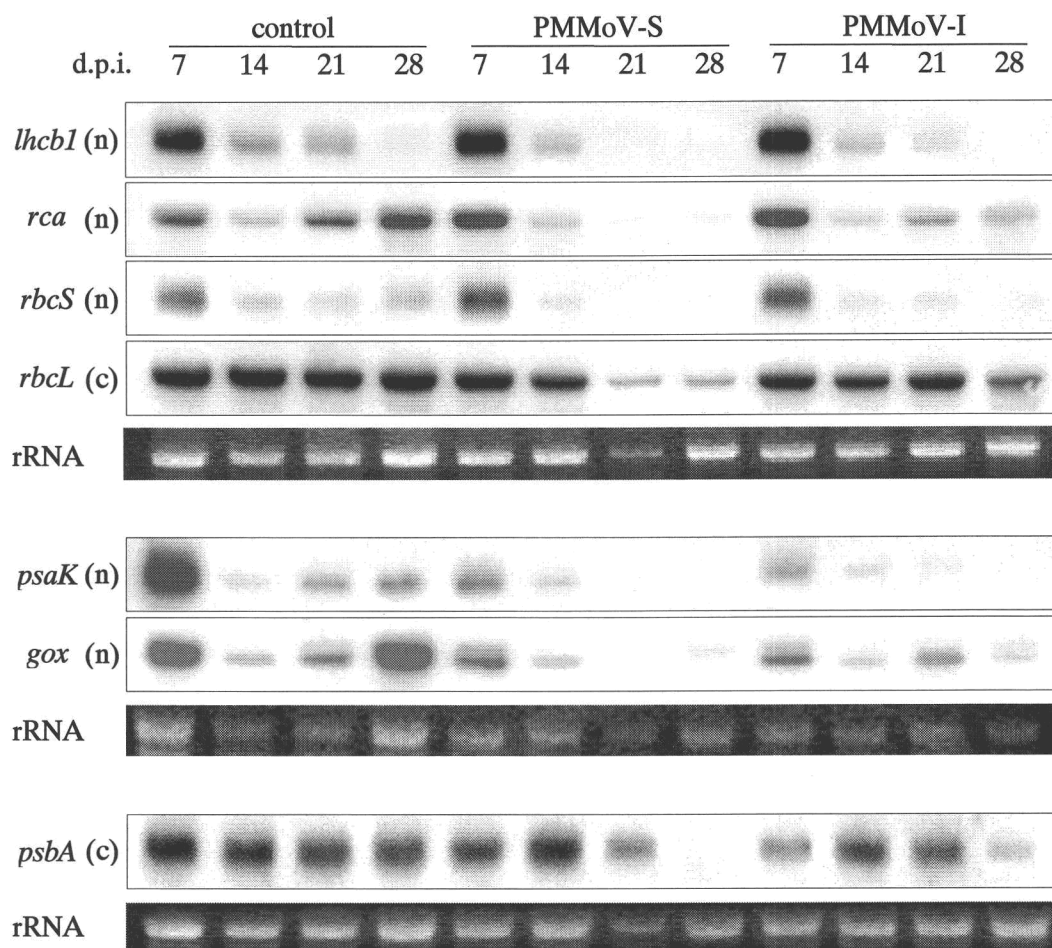


Fig. 41.- Análisis por northern blot de la acumulación de mRNAs de codificación nuclear (n) y cloroplastídica (c) en las hojas AS de plantas de *N. benthamiana* infectadas con PMMoV-S y PMMoV-I y en sus correspondientes controles. En cada membrana se muestra como control de carga la tinción con bromuro de etidio del rRNA 23S.



El análisis por Northern blot de la expresión de estos genes en hojas S de plantas de *N. benthamiana* infectadas con PMMoV-S y PMMoV-I y de sus correspondientes controles se muestra en la fig. 42.

En ésta se observa que el patrón de acumulación de los mRNAs lhcb1, rca y rbcS en las plantas sanas es similar. Si se compara con el control, en las hojas de plantas inoculadas por ambos virus se detecta una caída en dicha acumulación desde los 7 d.p.i.. Este efecto es más acusado en el caso de la infección con PMMoV-S, de forma que a partir de 21 d.p.i. la presencia de los mRNAs lhcb1 y rbcS no es detectable. En la infección por PMMoV-I, se registra un notable incremento de los tres mRNAs a 28 d.p.i..

En las plantas sanas, las acumulaciones de los mRNAs psaK y GOX son similares también, mientras que en las plantas infectadas el patrón es diferente para cada uno de ellos, si bien en todos los tiempos analizados ambos mRNAs se acumulan en menor cantidad. En las plantas infectadas, el mRNA psaK disminuye progresivamente hasta ser indetectable a partir de 21 d.p.i. en presencia de PMMoV-S. Con la cepa I también se observa una caída progresiva, pero de menor intensidad hasta los 21 d.p.i., para posteriormente incrementar a los 28 d.p.i. En estas plantas el mRNA GOX mantiene sus niveles durante la infección con ambos virus, siendo menores en el caso de la infección con la cepa S, y registrándose un aumento con la cepa I a 28 d.p.i.

Los niveles de acumulación de los mRNAs rbcL y psbA, de codificación cloroplastídica se mantienen en todos los tiempos analizados en plantas sanas. En plantas infectadas el patrón de acumulación es también homogéneo, pero registrándose niveles menores. El efecto inducido por PMMoV-S es mayor.

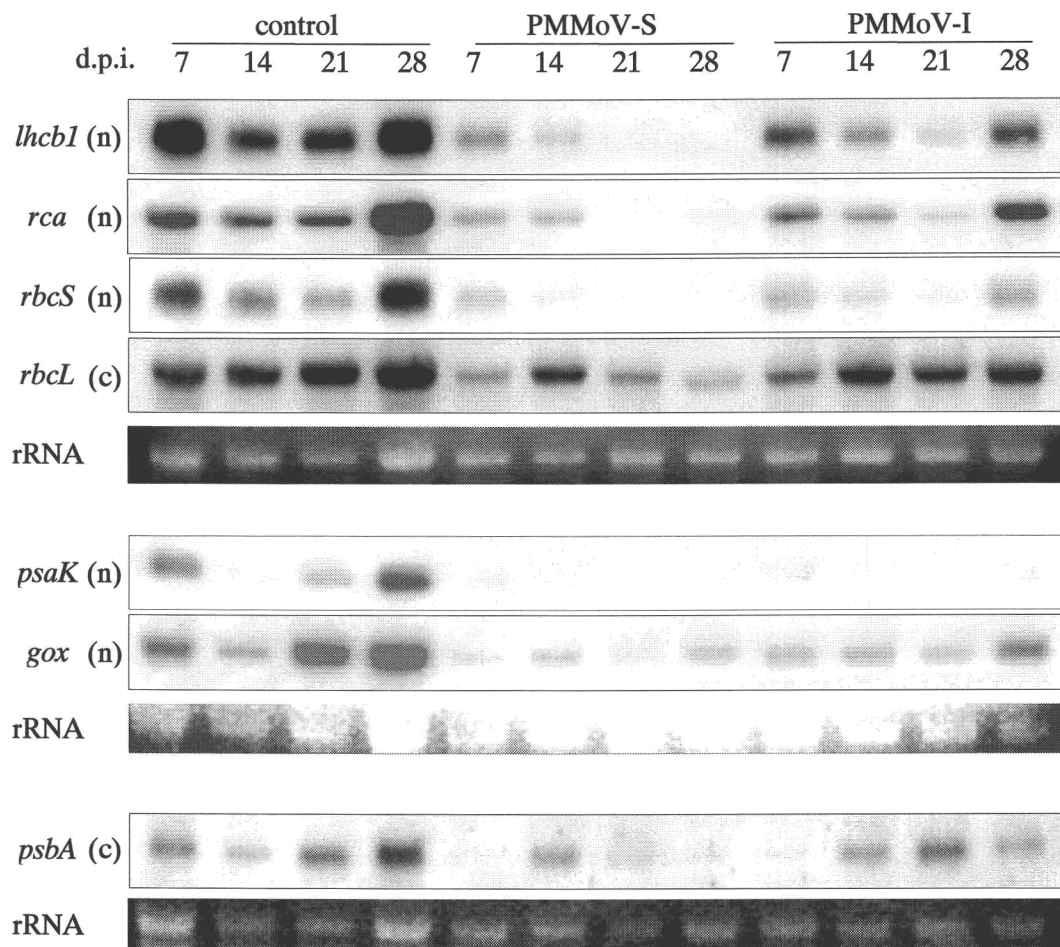


Fig. 42.- Análisis por Northern blot de la acumulación de mRNAs de codificación nuclear (n) y cloroplástica (c) en las hojas AS de plantas de *N. benthamiana* infectadas con PMMoV-S y PMMoV-I y en sus correspondientes controles. En cada membrana se muestra como control de carga la tinción con bromuro de etidio del rRNA 23S.

### D.5.3.- Análisis de la acumulación y de la distribución viral

La acumulación viral en el transcurso de la infección se llevó a cabo mediante la detección de los RNAs virales en las muestras de RNA y de la proteína de cubierta en improntas de tejido.

Para ello, se llevaron a cabo ensayos de Northern blot con las muestras de RNA total extraídas a los distintos tiempos post-inoculación de las hojas S y AS de las plantas control o inoculadas con las dos cepas virales, según se describe en los apdo. C.7.3.3 de *M. y M.*, (fig. 43).

En ambas infecciones la presencia del RNA viral se detectó a partir de los 7 d.p.i. en las hojas S; y a partir de los 14 y de los 21 d.p.i., en las AS infectadas con PMMoV-S y PMMoV-I, respectivamente.

En estas últimas hojas la cantidad de ambos RNAs virales, genómico y subgenómico, se incrementa en el transcurso de la infección, si bien la acumulación de ambos RNAs de PMMoV-S es superior a los de PMMoV-I.

En las hojas S de las plantas infectadas con PMMoV-S se observa que la acumulación de los RNAs, genómico y subgenómico de la CP, se mantiene desde los 7 a los 21 d.p.i., sufriendo un notable aumento el RNA genómico a los 28 d.p.i. En las plantas infectadas con PMMoV-I, el patrón de acumulación de los RNAs genómico y subgenómico es distinto para cada uno de ellos. Así, el RNA genómico sufre un incremento entre los 14 d.p.i, el primer tiempo en el que se detecta, y los 21 d.p.i. A los 28 d.p.i., y coincidiendo con la fase de recuperación de la enfermedad, los niveles detectados son similares a los de 21 d.p.i. La acumulación del RNA subgenómico de la cp se incrementa entre los 7 y los 14 d.p.i., y desciende posteriormente hasta los 28 d.p.i.

En todos los puntos de la infección la acumulación del RNA subgenómico de la cp de PMMoV-S es superior a la de la cepa I, mientras que la acumulación del RNA genómico de PMMoV-S es similar entre los 7 y 21 d.p.i. a los alcanzados por PMMoV-I entre los 14 y 28 d.p.i.

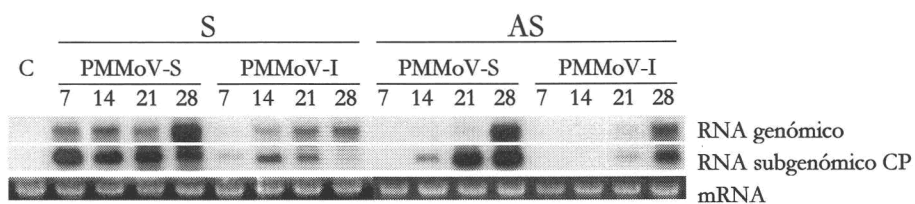


Fig. 43.- Análisis por Northern blot de la acumulación del RNA viral de PMMoV-S y PMMoV-I en plantas de *N. benthamiana* a lo largo de la infección. C, planta sana. Como control de carga se muestra la tinción con bromuro de etidio del rRNA 23S.

## D.6.- Estudio de la infección viral mediante técnicas de imagen

### D.6.1.- Análisis por FI de la interacción PMMoV-I y *Nicotiana benthamiana*

Estos estudios se han centrado en plantas infectadas con PMMoV-I, de cara a poder estudiar el efecto del desarrollo de la infección en el PSII y también, durante su fase tardía, el fenómeno de recuperación de los síntomas que *N. benthamiana* experimenta en la infección con PMMoV-I, pero no con PMMoV-S. Se han tomado imágenes correspondientes a los parámetros de fluorescencia NPQ y  $\Phi_{PSII}$  a 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24 y 28 d.p.i. en hojas S y AS. Dado que la fluorescencia de imagen es una técnica no destructiva, las medidas se realizan siempre en las mismas hojas a lo largo de la infección. El protocolo de medida se detalla en el apdo. C.8.1.3 de *M. y M.* Las imágenes siguientes se presentan en falsos colores, con arreglo a una escala ya descrita en el anterior apdo. de *M. y M.*

En el caso de las hojas AS no se muestran datos anteriores a 7 d.p.i. y en el de las S a 2 d.p.i., porque no se encontraron diferencias significativas con respecto al control en ninguno de los parámetros analizados.

### D.6.1.1.- Análisis por FI de las hojas AS

#### D.6.1.1.1.- Análisis del NPQ

En la fig. 44 se presenta la cinética de NPQ durante la inducción de la fluorescencia en hojas AS, previamente adaptadas a la oscuridad, y sus controles equivalentes a 17 d.p.i. Comprobamos que en la mayoría de los puntos de la cinética las imágenes de NPQ de las hojas AS de plantas infectadas muestran un patrón espacial muy característico, frente a la casi homogeneidad de este parámetro en las hojas control. En la zona que rodea los nervios principales de la hoja, el valor de este parámetro fotosintético es muy alto, a partir de 30-60s con respecto al valor del control y superior al otras zonas de la hoja AS. El resto del mesófilo registra a lo largo de la cinética valores más bajos de NPQ y a 20-30 seg es evidente una línea estrecha que separa ambas zonas de la hoja y en la que el valor de NPQ es muy bajo. En estos momentos de la cinética de la hoja AS a 17 d.p.i. podríamos distinguir claramente tres zonas con distintos valores de NPQ. En el estado estacionario hay un espectacular aumento de NPQ en la zona de nervios principales.

Hemos comprobado que a 30 segundos en la cinética de inducción de la fluorescencia se puede apreciar con detalle la heterogeneidad del patrón de NPQ en hojas AS, y por esta razón hemos elegido ese punto ( $NPQ_{30}$ ) para comparar imágenes de este parámetro a lo largo de la infección (fig. 45). A 7 d.p.i. no se aprecian diferencias entre la hoja control y la infectada y, a 14 d.p.i., aparece una zona estrecha que bordea los nervios principales que presenta un  $NPQ_{30}$  mayor que el resto de la hoja AS, a 17 d.p.i se distinguen ya las tres zonas descritas anteriormente y en la última fase de la infección, 24 - 28 d.p.i., decae notablemente el  $NPQ_{30}$  en toda la hoja. Este fenómeno final aparece también aunque en menor medida en hoja sana probablemente como consecuencia de la edad de la hoja.

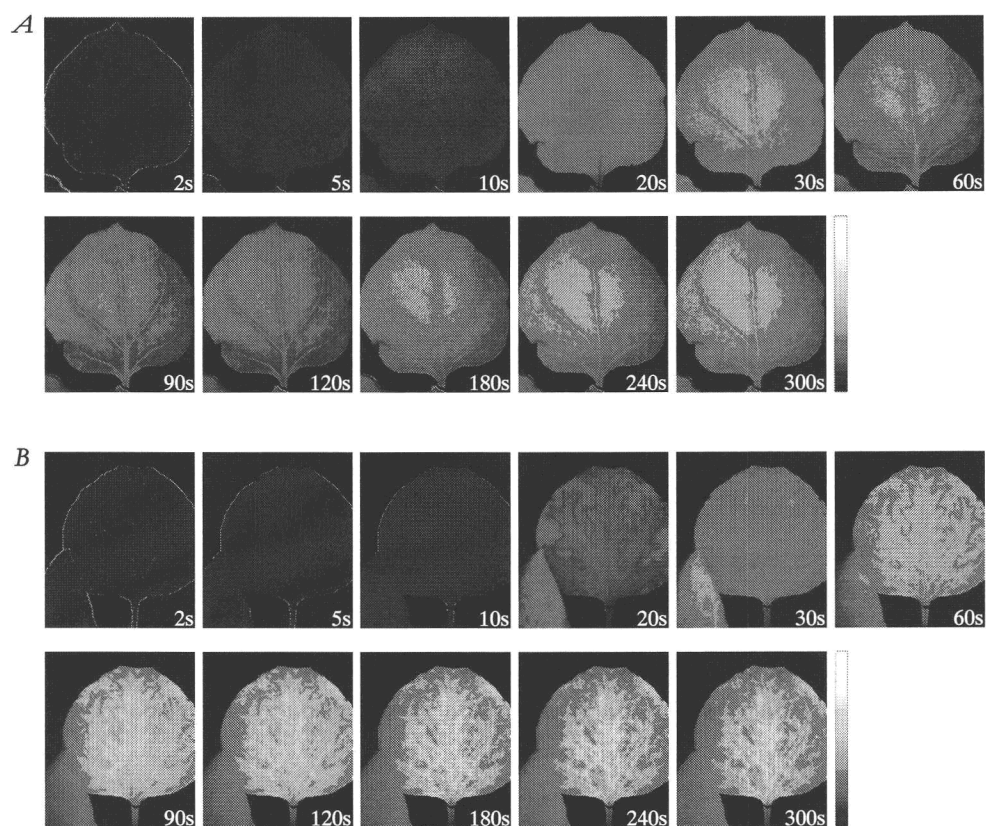


Fig. 44.- Cinética de inducción de NPQ en hojas de plantas control (A) y AS de plantas infectadas (B) a 17 d.p.i..

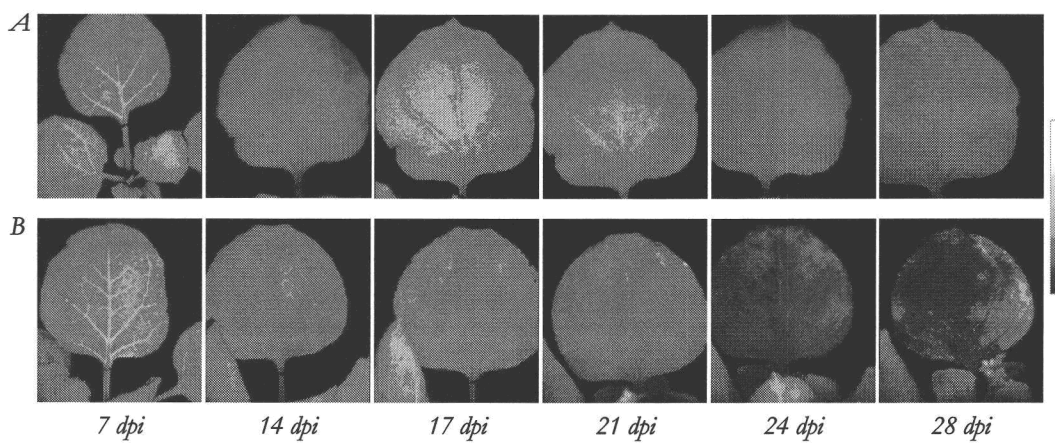


Fig. 45.- Imágenes de NPQ<sub>30</sub> de hojas de plantas de *N. benthamiana* control (A) e infectadas con PMMoV-I (B) a distintos tiempos post-infección.

Hemos analizado también las imágenes de NPQ en el estado estacionario (300 s tras el inicio de la inducción de la fluorescencia) en hojas AS y equivalentes de planta sana en distintos puntos de la infección (fig. 46). Se observa que en la planta sana el NPQ es relativamente homogéneo en todo el mesófilo de estas hojas y que disminuye drásticamente a partir de 24 d.p.i. debido al estado de desarrollo de la hoja. En hojas AS de plantas infectadas el patrón foliar del NPQ<sub>300</sub> es similar al de los controles hasta 7 d.p.i. Aproximadamente a los 14 d.p.i. la zona que rodea los nervios principales de la hoja tiene un valor de NPQ<sub>300</sub> superior al de la misma zona en hojas control y vemos perfilarse la línea que en NPQ 30 separaba dos zonas foliares con distinto (fig. 45) y que presenta ella misma un valor de NPQ muy bajo. A 17 d.p.i. se observa el patrón espacial en la hoja ya descrito anteriormente en el que se aprecia un valor muy alto de NPQ<sub>300</sub> en la zona que rodea los nervios de la hoja AS y, a 21 d.p.i. la imagen del NPQ<sub>300</sub> de la hoja AS es prácticamente homogénea, teniendo este parámetro un valor muy alto. A 24 y 28 d.p.i. el patrón sigue siendo homogéneo y el valor de NPQ<sub>300</sub> disminuye progresivamente de forma que todavía a 24 d.p.i. el valor es mayor en las hojas AS que en las controles pero a 28 d.p.i. se igualan. A 28 d.p.i., las hojas control, probablemente ya senescentes, tienen valores muy bajos de NPQ, incluso menores que las hojas AS.

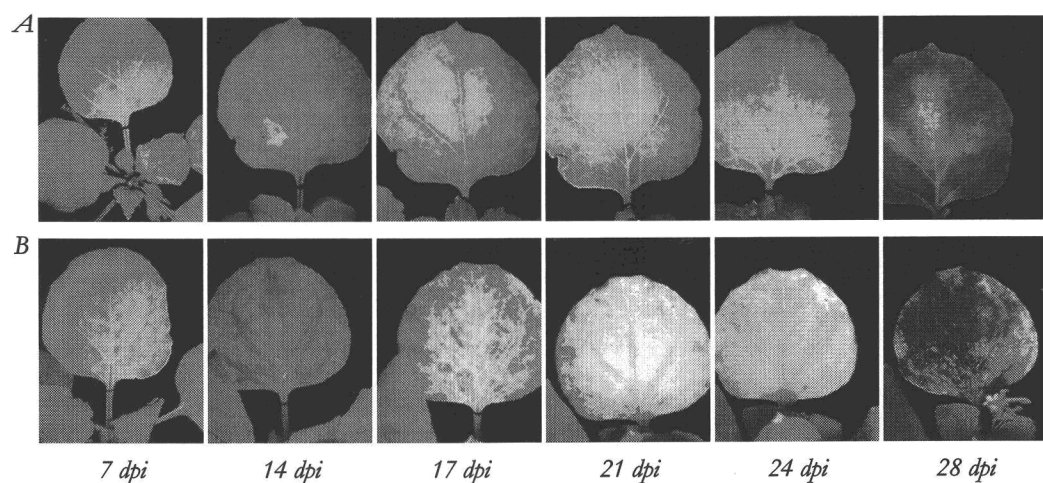


Fig. 46.- Imágenes de NPQ en el estado estacionario de hojas AS (B) de plantas de *N. benthamiana* inoculadas con PMMoV-I y de equivalentes de planta control (A) a distintos tiempos post-infección.



Se ha considerado que 17 d.p.i. es un punto interesante en el estudio por FI de la infección de PMMoV-I en su huésped experimental, debido a la aparición del característico patrón de NPQ en las hojas AS. Así se eligieron en las imágenes de NPQ<sub>30</sub> regiones de interés (RI) aleatorias de 10x10 pixels, en las tres zonas de la hoja bien definidas en las imágenes de NPQ de hojas AS: la que rodea los nervios principales de la hoja (N), el resto del mesófilo foliar (M) y la línea que las separa (L). Una operación similar se realizó en las hojas correspondientes de plantas sanas en la que sólo consideramos dos zonas, la cercana a las venas principales y el resto del mesófilo (fig. 47).

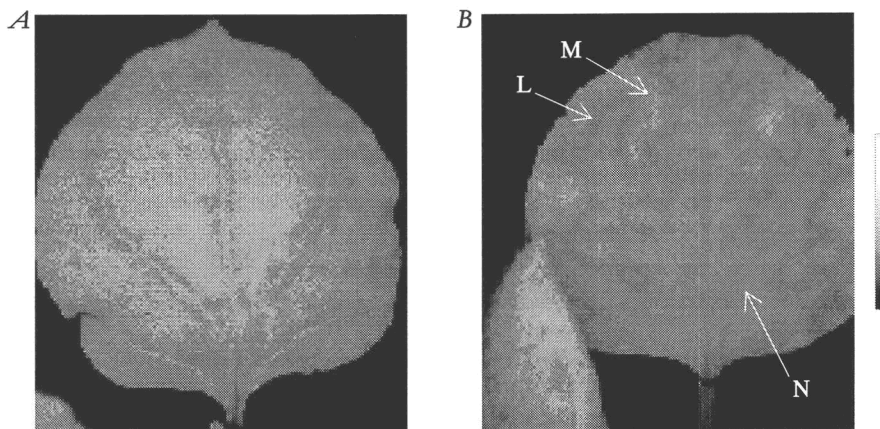


Fig. 47.- Imágenes de NPQ<sub>30</sub> (representación en escala de grises) de hojas AS (B) de plantas inoculadas con PMMoV-I y equivalentes sanas (A) a 17 d.p.i..

Con los valores medios de NPQ obtenidos en cada RI (ver aptdo. C.8.1.2 de *M. y M.*) se representó la cinética de este parámetro en la curva de inducción de la fluorescencia en las distintas zonas de las hojas AS a 17 d.p.i. (fig. 48). Este parámetro presenta una evolución muy distinta en las hojas infectadas respecto a las zonas equivalentes en hojas de planta sana, las áreas N, M y L, alcanzan el estado estacionario en la primera fase de la cinética y no existiendo un componente de relajación de NPQ antes de alcanzarlo, que sí presenta en las zonas N y M de los



controles. Además se comprueba que el NPQ en el estado estacionario de las hojas infectadas alcanza en la zona N valores mayores que los de la zona equivalente en hoja sana. La zona M alcanza un valor de NPQ similar y la L ligeramente inferiores a los del control.

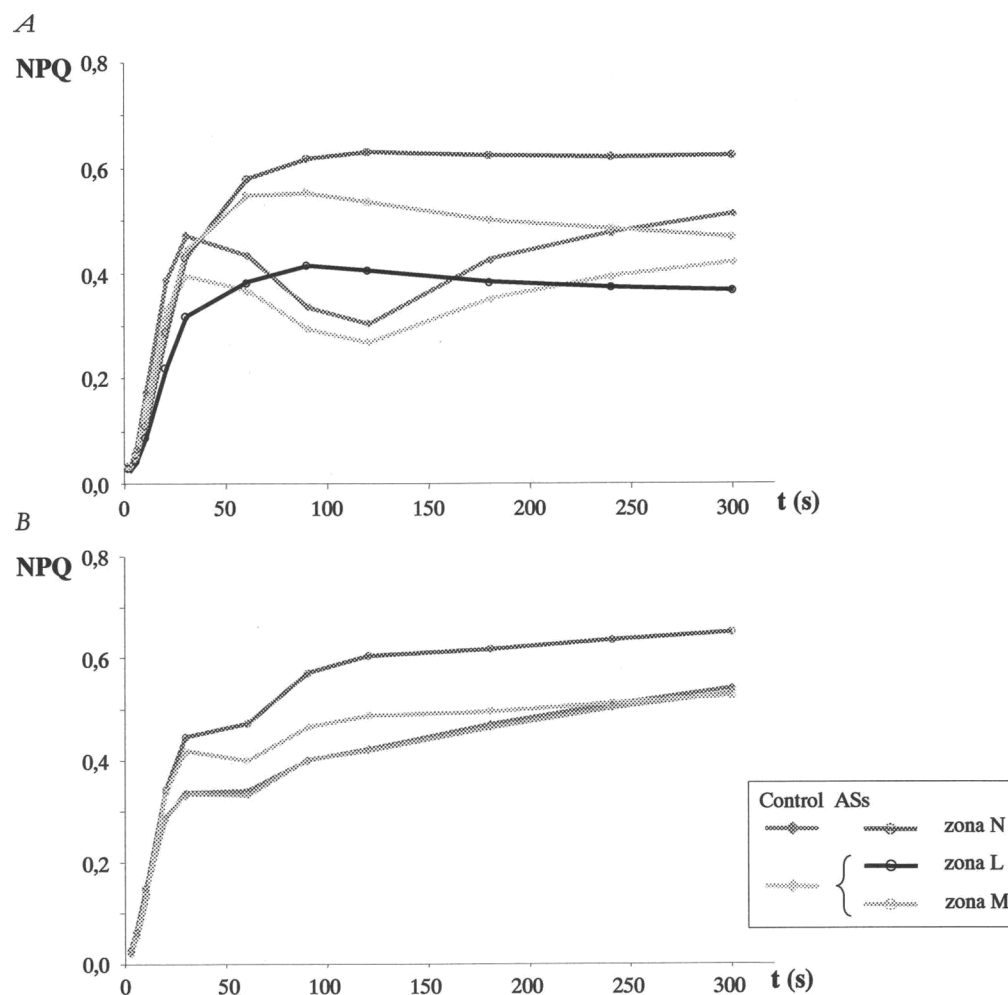


Fig. 48.- Cinética de NPQ a 17(A) y 28 d.p.i. (B) en las distintas zonas de NPQ diferenciables en el patrón de NPQ<sub>30</sub> de hoja AS de plantas de *N. benthamiana* inoculada con PMMoV-I y las equivalentes en hoja control.

También es importante el estudio del comportamiento de las hojas infectadas a 28 d.p.i., puesto que en ese punto la planta ya ha experimentado el proceso de recuperación de los síntomas virales en las hojas S. En la fig. 48 se presentan las curvas de inducción de NPQ en hojas AS y equivalentes sanas a 28 d.p.i.. En ambas se consideran dos zonas equivalentes a N y M. Observamos que las dos zonas consideradas en hoja control tienen cinéticas idénticas y similares a la que se observa en la zona M de la hoja AS. En cambio, en la zona N de la hoja AS el NPQ tiene valores más altos de NPQ a partir del punto 60 s después de iniciada la inducción y hasta alcanzar el estado estacionario. Ni en el caso de hojas AS, ni en los controles presentan las cinéticas de NPQ una fase de relajación, alcanzando la fase estacionaria de forma temprana, aproximadamente a los 125 sec.

#### D.6.1.1.2.- Análisis del rendimiento cuántico del PSII ( $\Phi_{PSII}$ )

La fig. 49 representa la cinética del rendimiento cuántico del PSII durante la inducción de la fluorescencia, comparando imágenes obtenidas de hojas AS de plantas infectadas con PMMoV-I y de hojas equivalentes de plantas sanas a 17 d.p.i. No existen grandes diferencias entre las plantas sanas e infectadas en los distintos puntos de la curva de inducción de la fluorescencia, aunque se observa un ligero descenso en el valor de este parámetro en el estado estacionario en hojas infectadas.

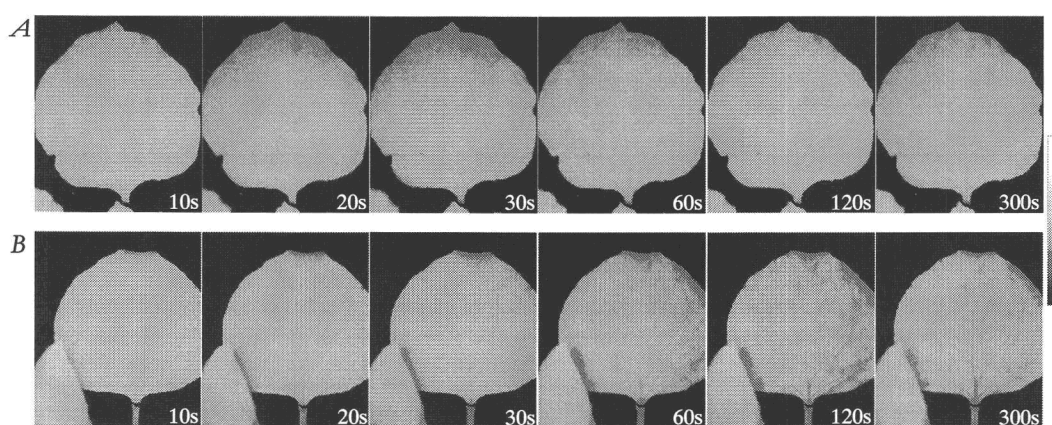


Fig. 49.- Cinética de  $\Phi_{PSII}$  a 17 d.p.i. en hojas AS de plantas de *N. benthamiana* inoculadas con PMMoV-I (B) y hojas equivalentes control (A).

En la fig. 50 se muestran las imágenes de  $\Phi_{\text{PSII}}$  en el estado estacionario  $\Phi_{\text{PSII } 300}$  (a 300 s después del inicio de la inducción de la fluorescencia), correspondientes a una hoja AS y una equivalente sana a distintos tiempos post-infección. Las hojas sanas presentan un patrón homogéneo de  $\Phi_{\text{PSII } 300}$  que parece ser independiente de la edad de la planta. El patrón espacial de  $\Phi_{\text{PSII } 300}$  de las hojas AS, pese a no corresponderse con el patrón de NPQ, se ve afectado por la infección. En la hoja AS  $\Phi_{\text{PSII } 300}$  alcanza a 7 y 14 d.p.i. un valor ligeramente superior al del control. A 17 d.p.i., cuando en el mesófilo se habrían definido tres zonas en las imágenes de NPQ<sub>30</sub>, según el valor que éste alcanza en ellas, en las imágenes del rendimiento cuántico solo podemos apreciar la existencia de la zona L, en la que este parámetro tiene un valor inferior al resto de la hoja. A partir de 21 d.p.i. el valor de  $\Phi_{\text{PSII } 300}$  disminuye en toda la hoja con respecto al control, sobre todo después de 24 d.p.i., de forma que a 28 d.p.i. el valor de este parámetro es muy bajo si se compara con el valor alcanzado en las hojas equivalentes de plantas sanas.

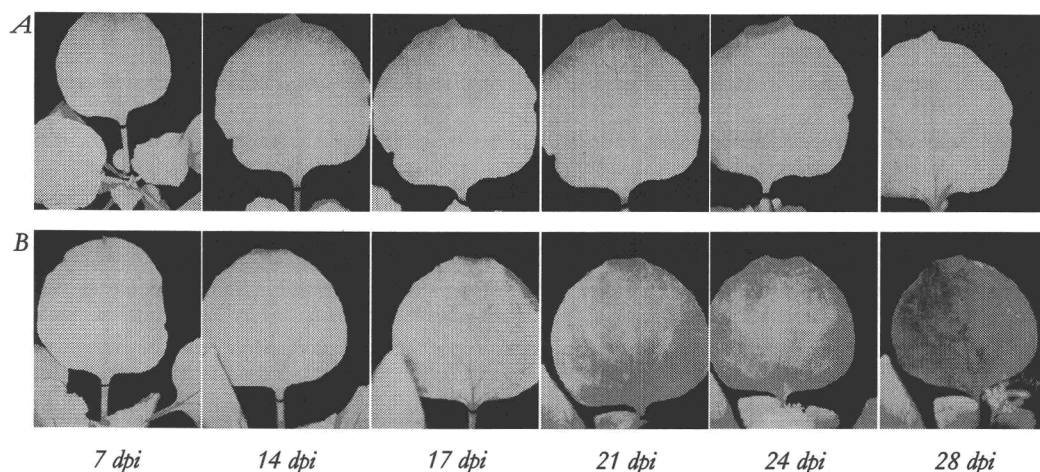


Fig. 50.- Imágenes de  $\Phi_{\text{PSII } 300}$  de hojas AS de plantas inoculadas con PMMoV-I (B) y de las equivalentes de planta sana (A) en el estado estacionario a distintos tiempos post-infección.

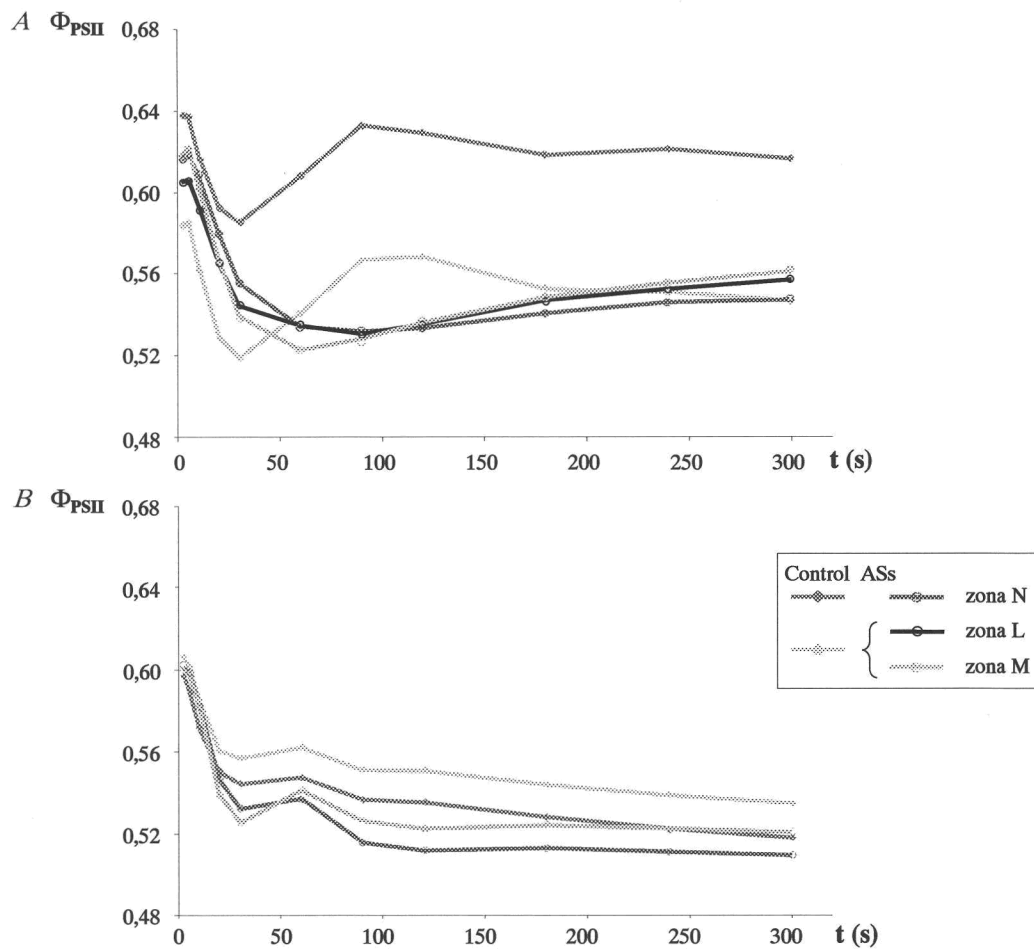


Fig. 51.- Cinéticas de inducción de  $\Phi_{PSII}$  en hojas controles y AS de plantas inoculadas con PMMoV-I a 17 d.p.i. (A) y 28 d.p.i. (B).

En la fig. 51 se muestran las gráficas correspondientes a la cinéticas de  $\Phi_{PSII}$  durante la inducción de la fluorescencia, en hojas AS de plantas de *N. benthamiana* inoculadas con PMMoV-I y en sus equivalentes de plantas sanas a 17 y 28 d.p.i., obtenidas seleccionando RIs en las zonas establecidas anteriormente según sus valores de NPQ. A 17 d.p.i. las cinéticas de  $\Phi_{PSII}$  para las tres zonas, N, M y L de hojas AS son idénticas entre si y distintas a las de las dos zonas equivalentes consideradas en hojas sanas. En este punto de la infección, la cinética de  $\Phi_{PSII}$ , al igual que la de NPQ, es más compleja en hojas de plantas sanas que de plantas infectadas por PMMoV-I. Mientras que en las hojas control  $\Phi_{PSII}$  alcanza

rápidamente un mínimo (en torno a 30 s), posteriormente un máximo y después una lenta relajación hasta alcanzar el estado estacionario, en las tres zonas de hojas AS de plantas infectadas, este parámetro alcanza el mínimo aproximadamente en el doble de tiempo que en el control. Posteriormente  $\Phi_{\text{PSII}}$  incrementa lentamente hasta alcanzar, en el estado estacionario, el mismo valor que en la zona del mesófilo de la hoja control.

A 28 d.p.i (fig. 51) vemos la cinética de  $\Phi_{\text{PSII}}$  de las hojas sanas ha evolucionado con el desarrollo de la planta, siendo en este punto similar a la mostrada por las hojas AS a 17 d.p.i. En este momento de la infección en el que se detecta el fenómeno de recuperación de las hojas jóvenes de plantas inoculadas con PMMoV-I, las hojas AS exhiben una notable bajada en el rendimiento cuántico del PSII, más acusado aún que en las hojas ya senescentes de plantas sanas.

#### **D.6.1.2.- Análisis por fluorescencia de imagen de las hojas S**

El análisis por fluorescencia de imagen del efecto de la infección viral en hojas S presenta dificultades metodológicas, debido al fuerte enrollamiento que éstas presentan. Este hecho imposibilita que la intensidad de la luz incidente utilizada sea homogénea en todos sus puntos, generando patrones heterogéneos de fluorescencia emitida y de los parámetros que de ella se derivan que pueden no corresponderse exactamente con la actividad fotosintética de la hoja en cuestión. Por ello, el estudio de la infección por PMMoV en estas hojas de su huésped experimental se ha realizado eligiendo en ellas RIs de 10x10 pixels cuya superficie puede considerarse perpendicular a la dirección de la luz de excitación incidente (fig. 52), para finalmente analizar en estas regiones la evolución de los distintos parámetros fotosintéticos.

##### **D.6.1.2.1.- Análisis del quenching no fotoquímico (NPQ)**

Ya que en hojas AS 17 d.p.i era el punto de la infección más significativo para el análisis de los parámetros de FI y entre éstos,  $\text{NPQ}_{30}$  resultó ser el de más utilidad, en primer lugar obtuvimos imágenes de las hojas S y de sus correspondientes controles en estos puntos de la infección y de la cinética de inducción de la

fluorescencia (fig. 52). Aunque no se aprecian diferencias entre ambas imágenes, éstas nos han servido para la selección de RIs para los posteriores análisis de cinética.

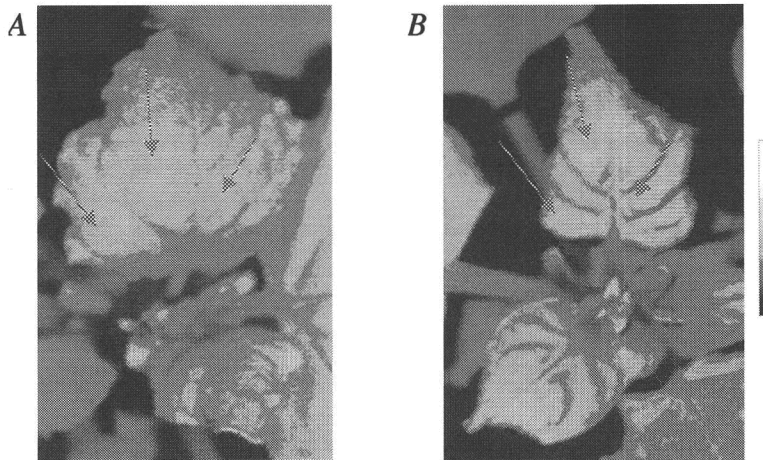


Fig. 52.- Imágenes de  $NPQ_{30}$  de una hoja S de planta de *N. benthamiana* inoculadas con PMMoV-I (B) y una hoja equivalente de planta sana (A) a 17 d.p.i.. Las RIs seleccionadas para la posterior obtención de  $\phi$  y NPQ se señalan con flechas.

En la gráfica de la fig. 53 vemos las cinéticas de NPQ durante la inducción de la fluorescencia en hojas S a diferentes d.p.i., comparadas a su vez con las obtenidas en plantas sanas. A lo largo de la infección el NPQ de hojas S sigue una cinética similar a la de las hojas controles. La primera fase de la cinética de inducción del NPQ, en la que éste alcanza un valor máximo, es muy parecida en ambos tipos de hojas a lo largo de toda la infección. Pero en la segunda parte de la cinética, en la que el NPQ se relaja hasta alcanzar el estado estacionario, sí se observan diferencias. Esta fase de la cinética del NPQ en las hojas S es muy similar a la que este parámetro sigue en los controles hasta 14 d.p.i. A 17 y 21 d.p.i., cuando comienza el proceso de recuperación de los síntomas, esta fase es más rápida en las hojas S de plantas inoculadas con PMMoV-I que en las equivalentes de planta sana. Y a 28 d.p.i. la relajación del NPQ vuelve a ser igual en ambos tipos de hoja.

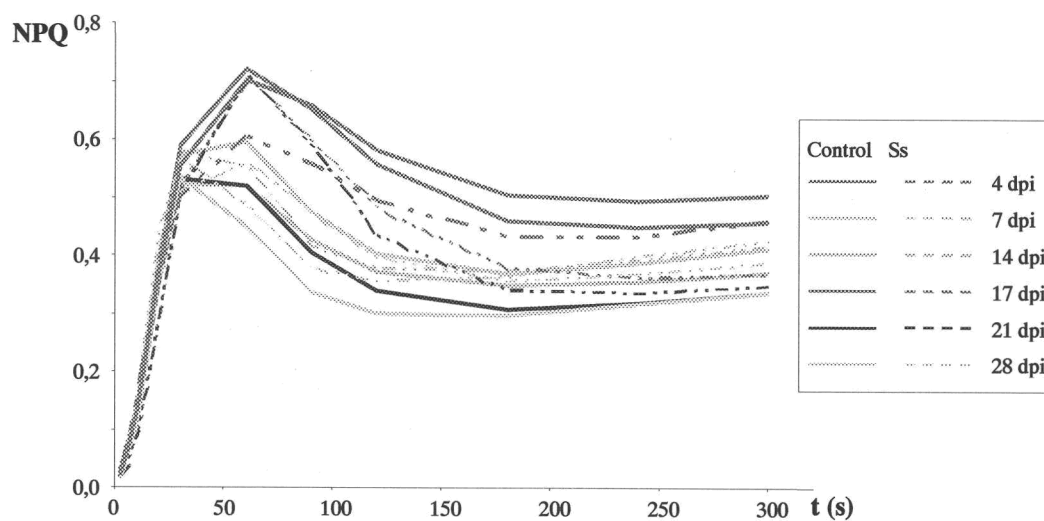


Fig. 53.- Cinéticas de NPQ en hojas S de plantas inoculadas con PMMoV-I y controles a lo largo de la infección.

Según estas cinéticas, el valor máximo de NPQ no se alcanza en todos los casos a 30 s, sino entre 30 y 60 s, por lo que comparar  $NPQ_{30}$  a lo largo de la infección, como hacíamos en el caso de hojas AS, no resulta conveniente. En general, la diferencia entre los valores de NPQ de hojas S y controles en los distintos puntos de la infección estudiados, es máxima a los 60 segundos del inicio de la inducción de fluorescencia ( $NPQ_{60}$ ). Así que hemos comparado  $NPQ_{60}$  de hojas S con sus correspondientes controles en los distintos momentos de la infección. Vemos que el  $NPQ_{60}$  de las hojas S de plantas inoculadas con PMMoV-I, es ligeramente inferior al control a 4 y 7 d.p.i., aproximadamente igual a 14 y 17 d.p.i., y posteriormente aumenta a 21 d.p.i. A 28 d.p.i., cuando la recuperación es completa, el  $NPQ_{60}$  es superior al del control. En esta gráfica también se comprueba que la infección viral produce solo un ligero aumento en el valor de NPQ de hojas S en el estado estacionario. Esto último no se cumple en el caso de 17 d.p.i., punto en el que estas hojas presentan un valor de NPQ inferior al de las hojas jóvenes de plantas sanas.

En la fig. 54 se muestran, a modo de ejemplo, imágenes de  $NPQ_{60}$  correspondientes a las hojas jóvenes de una planta sana y las S de otra inoculada con PMMoV-I, a lo largo de la infección. En ella vemos que a 4 d.p.i. comienzan a

aparecer los primeros síntomas característicos de la infección, completamente desarrollados a 14 d.p.i., y de los que la planta se recupera en la última fase de la infección (a partir de 21 - 24 d.p.i.). En ella, y considerando solo las zonas de las hojas orientadas de forma adecuada, se aprecia que  $NPQ_{60}$  es ligeramente mayor en las hojas control que en las S y cómo a partir de 21 d.p.i. encontramos la situación contraria, elevándose NPQ en las hojas infectadas.

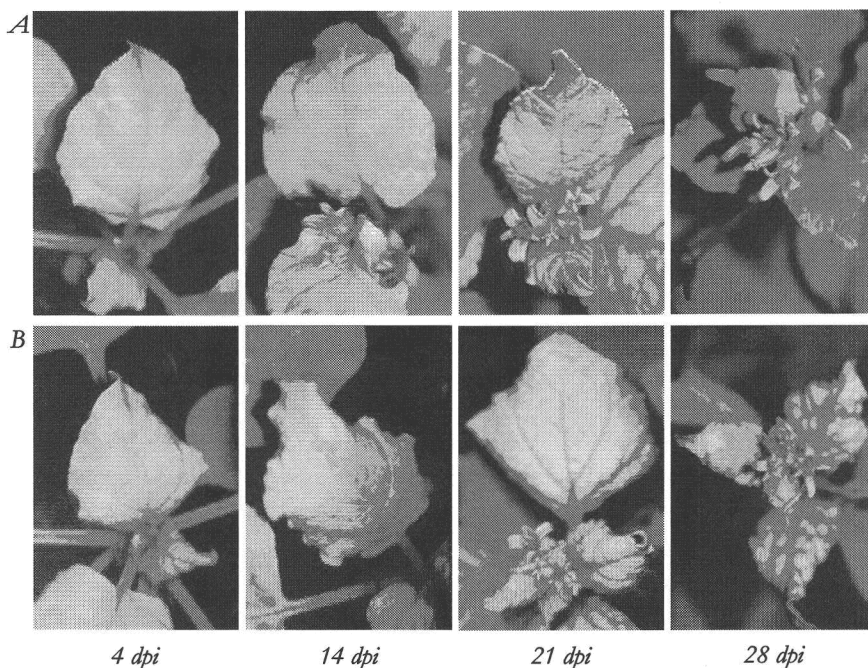


Fig. 54.- Imágenes de  $NPQ_{60}$  de hojas jóvenes de una planta sana de *N. benthamiana* (A) y de la S de una inoculada con PMMoV-I (B) en distintos puntos de la infección.

#### D.6.1.2.2.- Análisis del rendimiento cuántico del PSII ( $\Phi_{PSII}$ )

Cuando se compara la cinética de  $\Phi_{PSII}$  en hojas S respecto a la de hojas jóvenes del control (fig. 55), es evidente que hasta que comienzan a aparecer los síntomas, a 4 d.p.i., en ambos tipos de hoja el rendimiento cuántico del PSII sigue





suero específico frente a la proteína de cubierta viral, según se detalla en el aptdo. C.4 de *M. y M.*

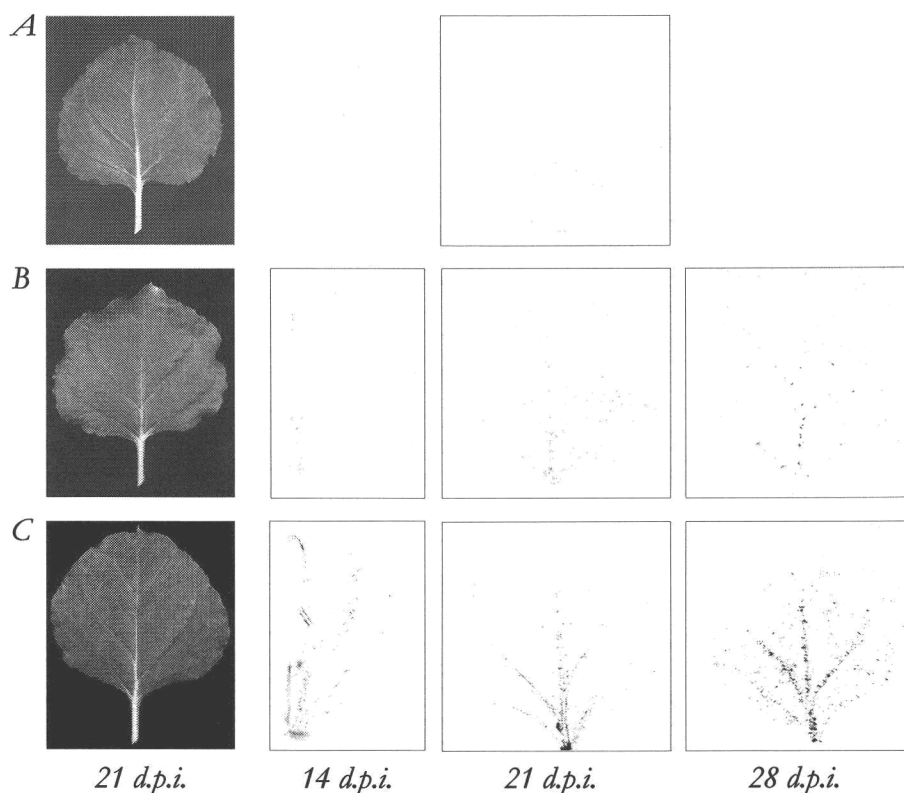


Fig. 56.- Localización por impronta de hojas de la proteína de la cápsida de PMMoV en hojas AS de *N. benthamiana* inoculadas con PMMoV-S (B) y con PMMoV-I (C) a 14, 21 y 28 d.p.i. Se muestran hojas controles en (A). A la izquierda se muestran las fotografías de las hojas analizadas a 21 d.p.i..

En la fig. 56 se presenta la detección de la CP de PMMoV en hojas AS de plantas de *N. benthamiana* a lo largo de la infección. En ambas infecciones la CP es detectable a partir de los 14 d.p.i.. En todos los casos la mayor reacción se observa en el nervio medio y en las venas principales, pudiéndose visualizar un gradiente de acumulación desde la zona basal de la hoja, y a medida que transcurre la infección, de forma que a los 28 d.p.i, la CP viral es detectada por toda la hoja. La invasión de la hoja entre los 21 y 28 d.p.i., coincide con el incremento de acumulación del RNA

viral detectada en este periodo. Además indican que el virus no está distribuido uniformemente por toda la hoja, sino mayoritariamente asociado a la nervatura. Por tanto, las diferencias observadas en la acumulación de la cepa S e I en estas hojas (fig. 43, en el aptdo. D.5.3 de *Resultados*) no pueden ser adscritas a diferencias en los sitios de acumulación.

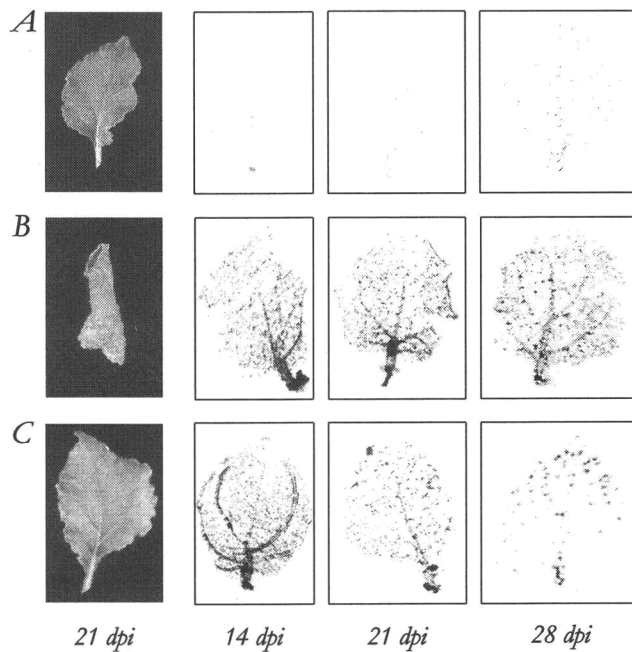


Fig. 57.- Detección de la proteína de cubierta viral en improntas de hojas S de *N. benthamiana* inoculadas con PMMoV-S (B) y PMMoV-I (C) a 14, 21 y 28 d.p.i. Plantas control (A). A la izquierda se muestran las fotografías de las hojas analizadas a 21 d.p.i.. La señal detectada en las plantas sanas corresponde a una reacción inespecífica del antisuero utilizado.

En el análisis realizado en las improntas de las hojas S de estas plantas (figura 57) pudimos comprobar que en los tres tiempos analizados (14, 21 y 28 d.p.i.), la acumulación de PMMoV-S en la hoja es similar, detectándose una señal fuerte en el peciolo y en la nervatura así como en el resto de la hoja. Una distribución similar se puede observar en las hojas de las plantas infectadas con PMMoV-I, pero tan sólo a

los 14 d.p.i. Posteriormente, entre los 21 y los 28 d.p.i. se observa una disminución de la señal en el peciolo y en la nervatura, de forma que en este último tiempo la infección queda restringida a focos discretos situados mayoritariamente en el borde superior de la hoja. En este sentido, las alteraciones observadas en la distribución de PMMoV-I se correlacionan con los cambios detectados en la acumulación del RNA subgenómico viral (fig. 43, en el aptdo. D.5.3 de *Resultados*).

### D.6.3.- Efectos de la infección viral en la ultraestructura del cloroplasto

Se ha estudiado mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) el efecto de la infección viral en la ultraestructura del cloroplasto en hojas S y AS de plantas de *N. benthamiana* inoculadas con PMMoV-I. El análisis se ha realizado en plantas inoculadas y sanas a 7, 17, 21 y 28 d.p.i., según se detalla en el apartado C.8.2 de *M. y M.*

#### D.6.3.1.- Hojas asintomáticas

En la fig. 58(C y D) correspondiente a 7 d.p.i. podemos observar que, en las células de hojas AS aunque todavía no se detecta la presencia de partículas virales, empiezan a detectarse cambios con respecto a los cloroplastos de hojas equivalentes de plantas sanas, como son granos de almidón en el estroma, aumento en el número de plastoglóbulos y en algunos casos en el grosor de las lamelas estromáticas.

Cuando analizamos la situación a 17 d.p.i. (figs. 59 y 60) conviene recordar que las hojas AS muestran en este punto un patrón característico de NPQ con tres zonas diferenciadas, N, M, y L que las separa (aptdo. D.7.1.1 de *Resultados*). Por ello, tomamos muestras para MET de las tres zonas en hojas AS y sólo de N y M en plantas sanas. En este punto del estudio puede apreciarse en los cloroplastos de hojas control y AS un aumento en el grado de apilamiento de sus *grana*, aunque en los cloroplastos infectados, parece disminuir el número de *grana* (fig. 59(C y D) y 60). Existe además en estos últimos un gran aumento en el tamaño de los granos de almidón de los cloroplastos; esto produce la distorsión de su estructura y hace que sean más redondeados. También se sigue incrementando el número de

plastoglóbulos y aparecen dos tipos de éstos, probablemente con diferente composición lipídica, diferenciándose por ser o no opacos a los electrones. Las lamelas estromáticas se presentan en numerosos casos abiertas e hinchadas (fig. 59(C) y 60).

Estos fenómenos son comunes en las tres zonas definidas por su NPQ. Pero sólo se han detectado partículas virales (marcadas en las figs. 60B y 60C) en el citoplasma de células de las zonas N, que rodea los nervios principales de la hoja, y de la zona L, pero en ningún momento en las células del área M, que representa el resto del mesófilo foliar.

Tras 21 d.p.i. los cloroplastos de hojas control muestran cambios característicos de la senescencia como son el aumento del número y tamaño de los granos de almidón y la disminución de la cantidad de membranas tilacoidales (fig. 61). La situación en los cloroplastos de hojas AS es aun más dramática: presentan una gran desorganización de la estructura del tilacoide, la estructura granal es escasa, la acumulación de almidón es muy alta y existe gran cantidad de plastoglóbulos. Además, se aprecian grandes acúmulos de partículas virales en el citoplasma de estas hojas (fig. 61D).

A 28 d.p.i., si en las hojas control, las lamelas estromáticas parecen predominar sobre los apilamientos granales, en las AS la estructura granal es prácticamente inexistente, reduciéndose drásticamente el estroma cloroplastídico debido al gran número y tamaño alcanzados por los granos de almidón y los plastoglóbulos. En el citoplasma de estas últimas células se observan partículas virales dispersas o formando grandes acúmulos en el citoplasma (fig. 62).

#### D.6.3.2.- Hojas sintomáticas

En las hojas jóvenes de plantas sanas la estructura interna del cloroplasto es distinta de la observada en las hojas maduras. Los cloroplastos de las hojas jóvenes en el mismo punto de infección presentan una buena organización membranal pero con pequeño número de *grana* y menor grado de apilamiento de éstos; también presentan ya granos de almidón (fig. 63). A 7 d.p.i. las hojas S de plantas de *N. benthamiana* inoculadas con PMMoV-I muestran todos los síntomas de la infección.

Mediante MET se comprueba que la estructura de sus cloroplastos también está afectada, presentando lamelas estromáticas más gruesas y granos de almidón de mayor tamaño que en los del control. El grado de apilamiento de los *grana* no parece verse afectado por la infección (fig. 63C y D). Se observan asimismo grandes acúmulos de partículas virales en el citoplasma de estas células (fig. 63D).

Examinando las imágenes correspondientes a las células de las hojas S de plantas inoculadas a 17 d.p.i. se observa un aumento en el número y tamaño de los granos de almidón, abundantes plastoglóbulos y desaparición de apilamientos granales (fig 64). En este punto de la infección también se detectan partículas virales dispersas en el citoplasma celular de las hojas S. Los correspondientes controles, también presentan grandes granos de almidón que deforman el cloroplasto, pero los plastoglóbulos son escasos.

A 21 d.p.i. la gran acumulación de almidón en el estroma de los cloroplastos de hojas S y sus correspondientes controles provoca la deformación de éstos, que toman una forma más esférica (fig. 65C). En las células infectadas, la estructura granal prácticamente no es detectable y en el citoplasma se distinguen numerosas partículas virales dispersas o formando acúmulos (fig. 65D).

A 28 d.p.i. los cloroplastos de las hojas de planta sana presentan lamelas estromáticas hinchadas con escaso número de *grana*, bajo grado de apilamiento de éstos y granos de almidón en el estroma. El mesófilo de las hojas jóvenes de plantas inoculadas con PMMoV-I, ya sin síntomas, presenta dos tipos de cloroplastos bien diferenciados. En unos observamos la estructura tilacoidal, y el orgánulo en general, muy afectados por la presencia de grandes granos de almidón, con numerosos plastoglóbulos densos a los electrones de gran tamaño (fig. 66D). Sin embargo, el segundo tipo de cloroplastos presenta *grana* bien apilados y plastoglóbulos de menor tamaño que los encontrados en los anteriores y no se aprecia acumulación de almidón en su estroma (fig. 66C). Sólo en el citoplasma de las células que presentan el primer tipo de cloroplastos se han detectado partículas virales (marcadas en la fig. 66D).

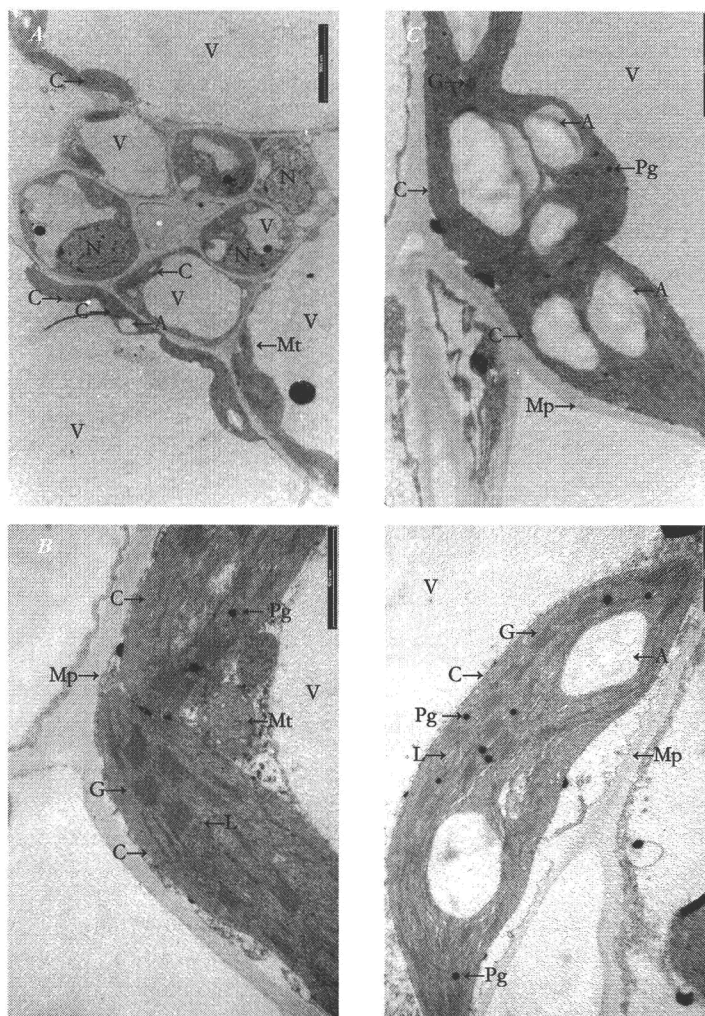


Fig. 58.- Fotografías mediante MET de cloroplastos de hojas AS de plantas sanas (A y B) e infectadas con PMMoV-I (C y D) en 7 d.p.i.

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
 02 MARZO 2003  
 COMISION DE DOCTORADO

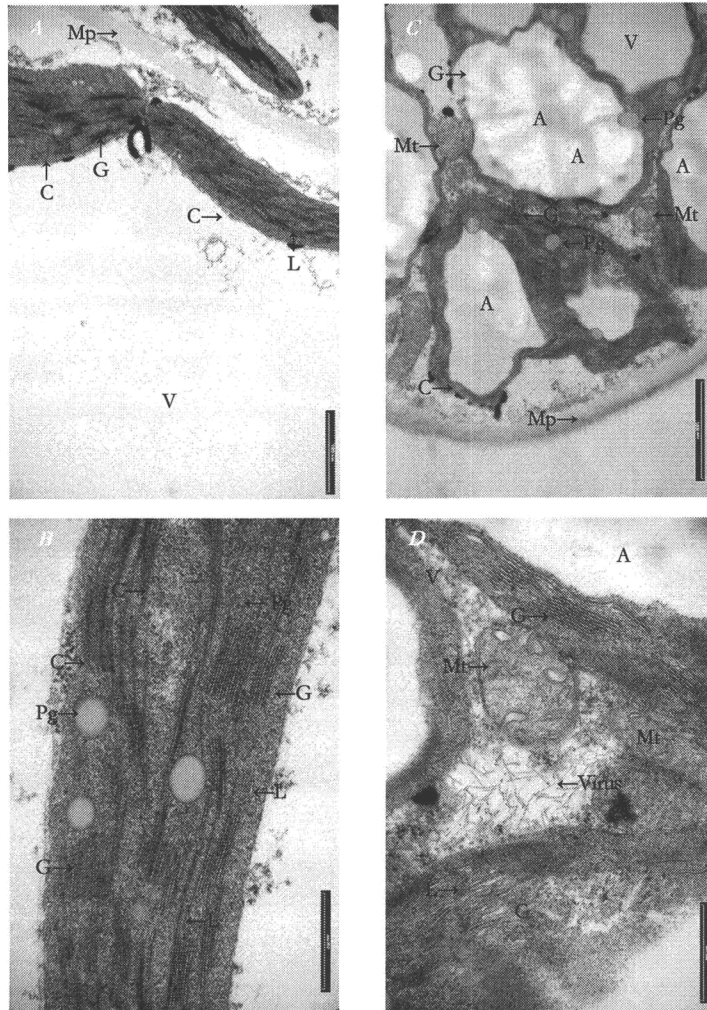


Fig. 59.- Fotografías mediante MET de cloroplastos de la zona N de hojas AS de *N. benthamiana* infectadas por PMMoV-I (C y D) en 17 d.p.i., y zona equivalente en plantas sanas (A y B).



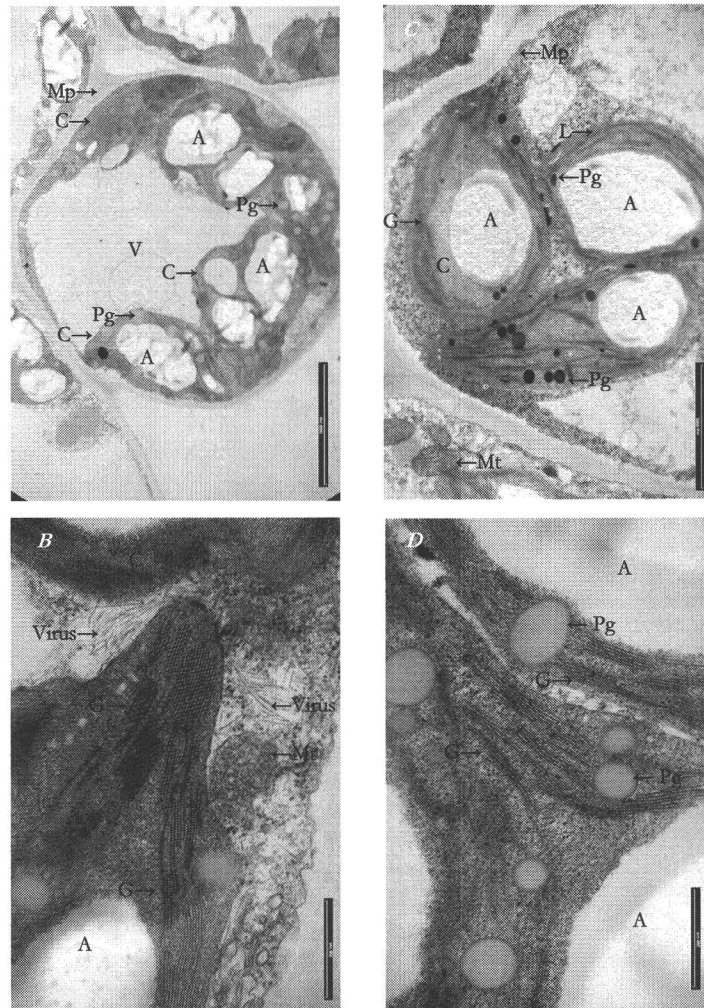


Fig. 60.- Fotografías mediante MET de cloroplastos de las zonas L (A y B) y M (C y D) de hojas AS de *N. benthamiana* infectadas por PMMoV-I en 17 d.p.i..

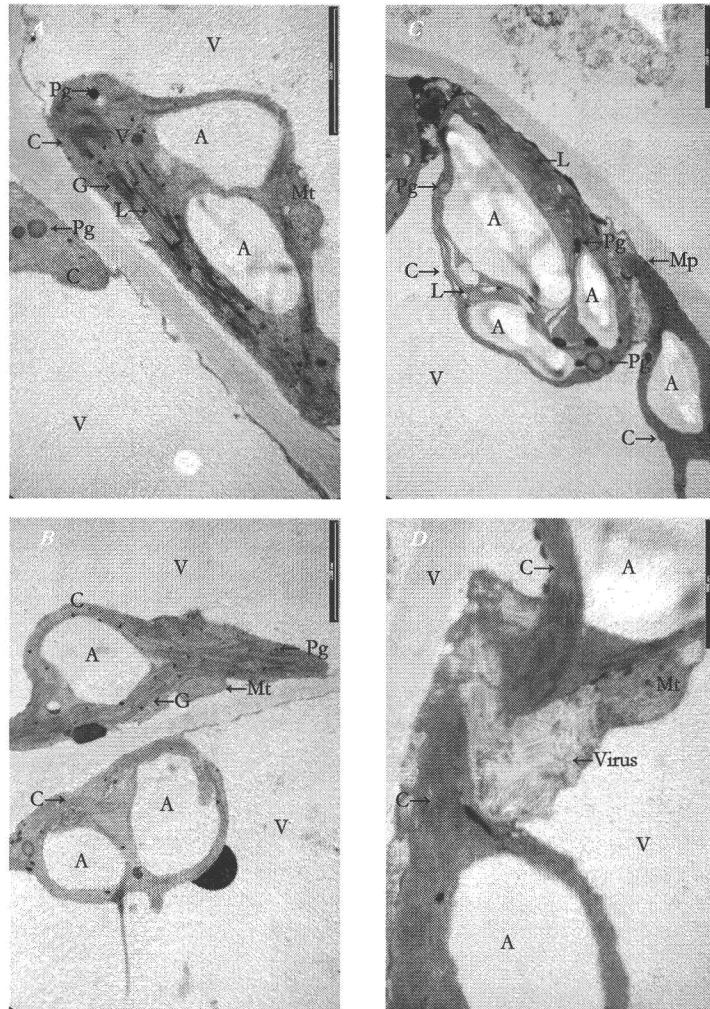


Fig. 61.- Fotografías mediante MET de cloroplastos de hojas AS de *N. benthamiana* infectadas por PMMoV-I (C y D) y zona equivalente en plantas sanas (A y B) en 21 d.p.i..

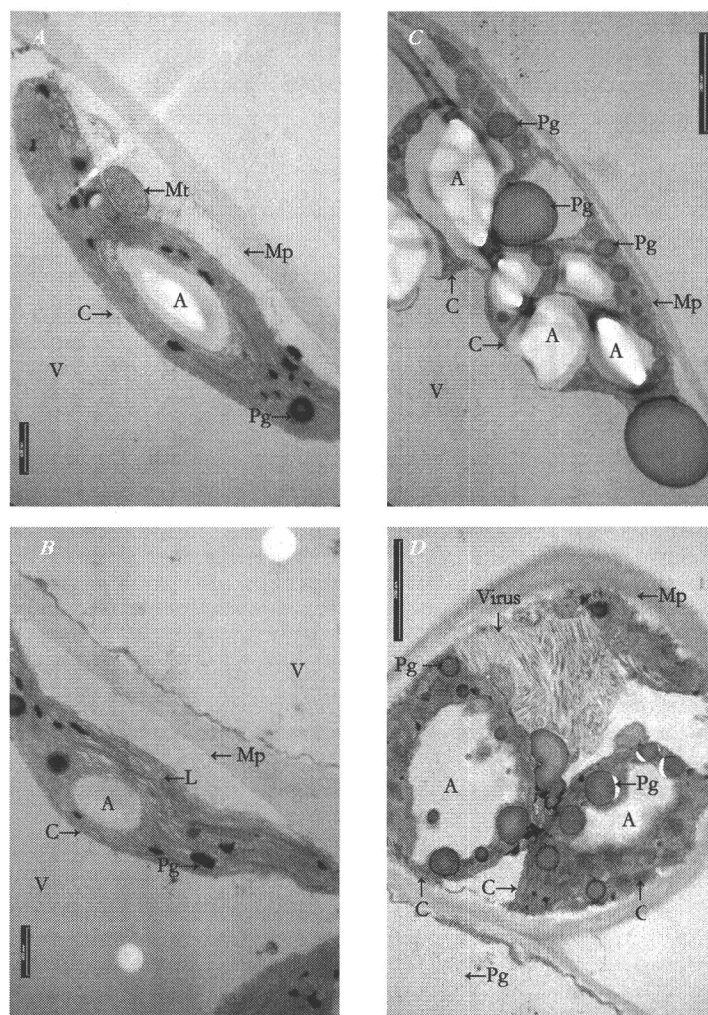
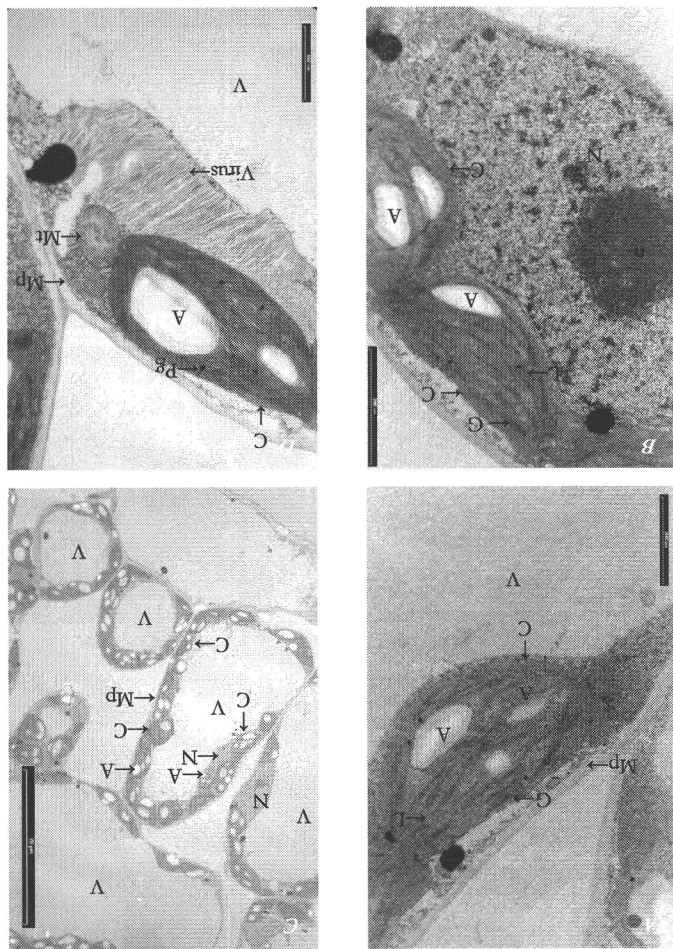


Fig. 62.- Fotografías mediante MET de cloroplastos de hojas AS de *N. benthamiana* infectadas por PMMoV-I (C y D) y zona equivalente en plantas sanas (A y B) en 28 d.p.i..

Fig. 63.- Fotografias mediante MET de cloroplastos de hojas S de *N. benthamiana* sanas (A y B) e infectadas por PMMoV-1 (C y D) en 7 d.p.i..



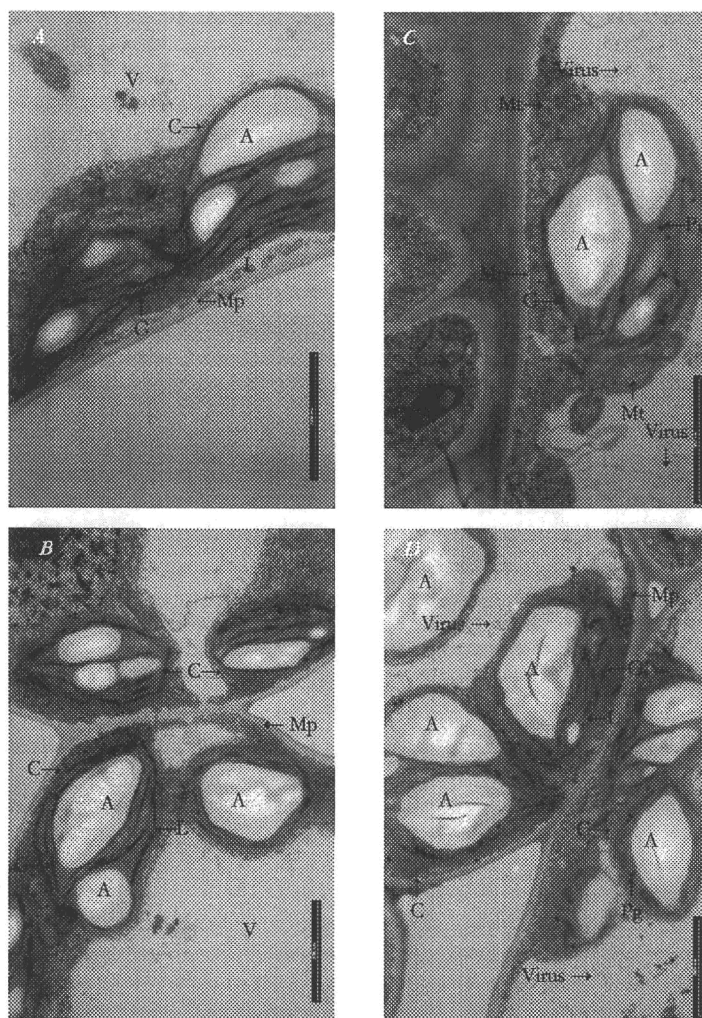


Fig. 64.- Fotografías mediante MET de cloroplastos de hojas *S* de *N. benthamiana* sanas (A y B) e infectadas por PMMoV-I (C y D) en 17 d.p.i..



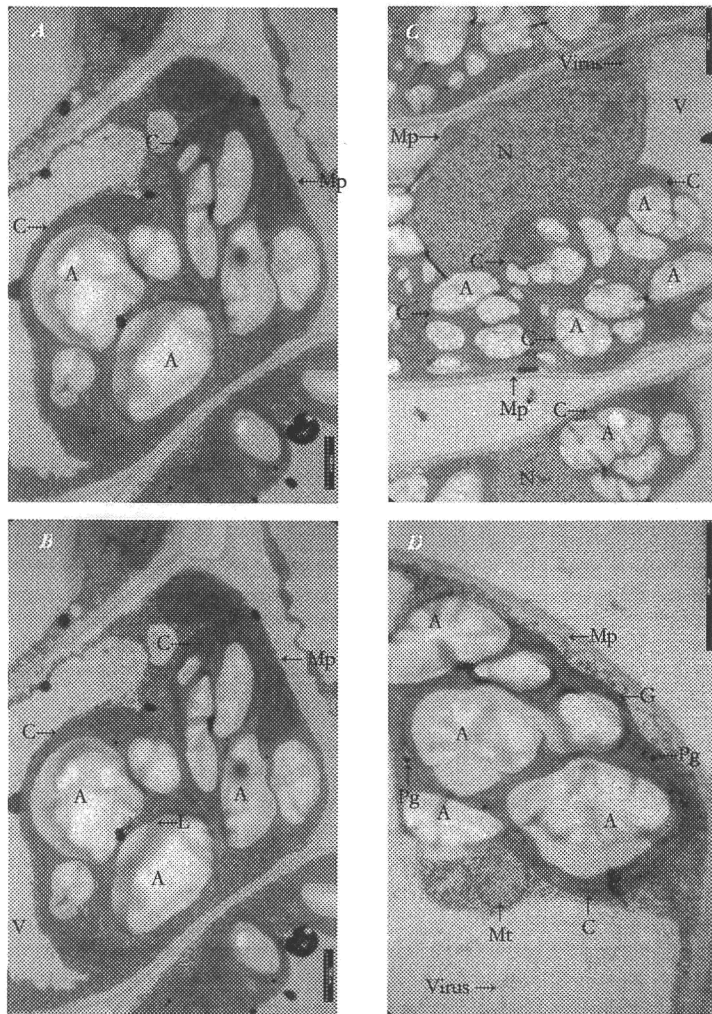


Fig. 65.- Fotografías mediante MET de cloroplastos de hojas *S* de *N. benthamiana* sanas (A y B) e infectadas por PMMoV-I (C y D) en 21 d.p.i..

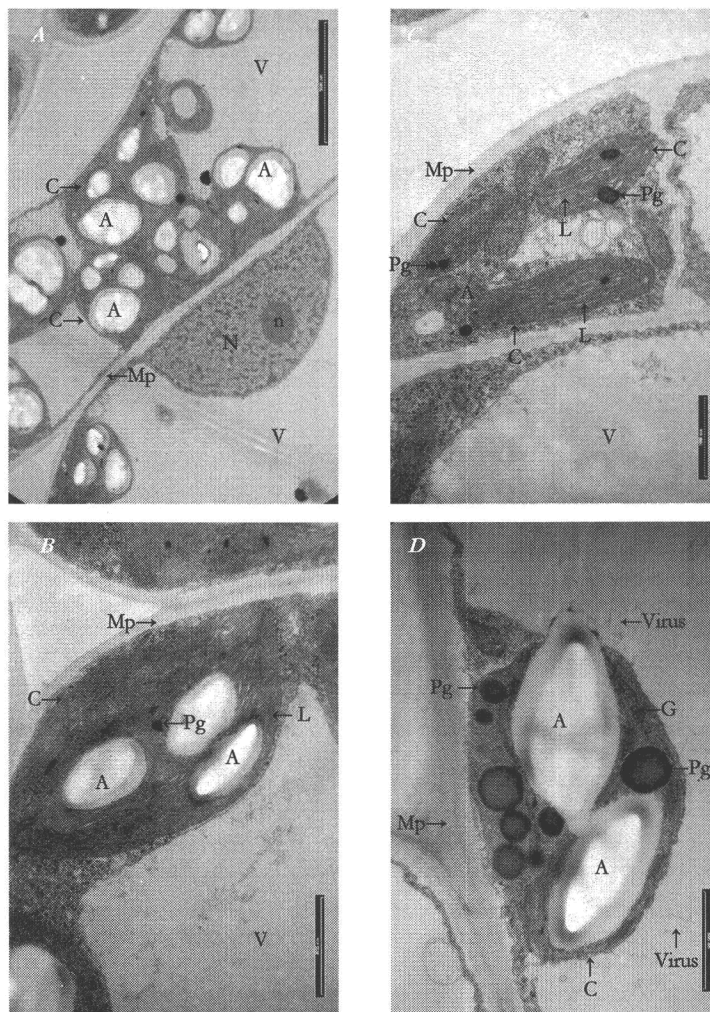
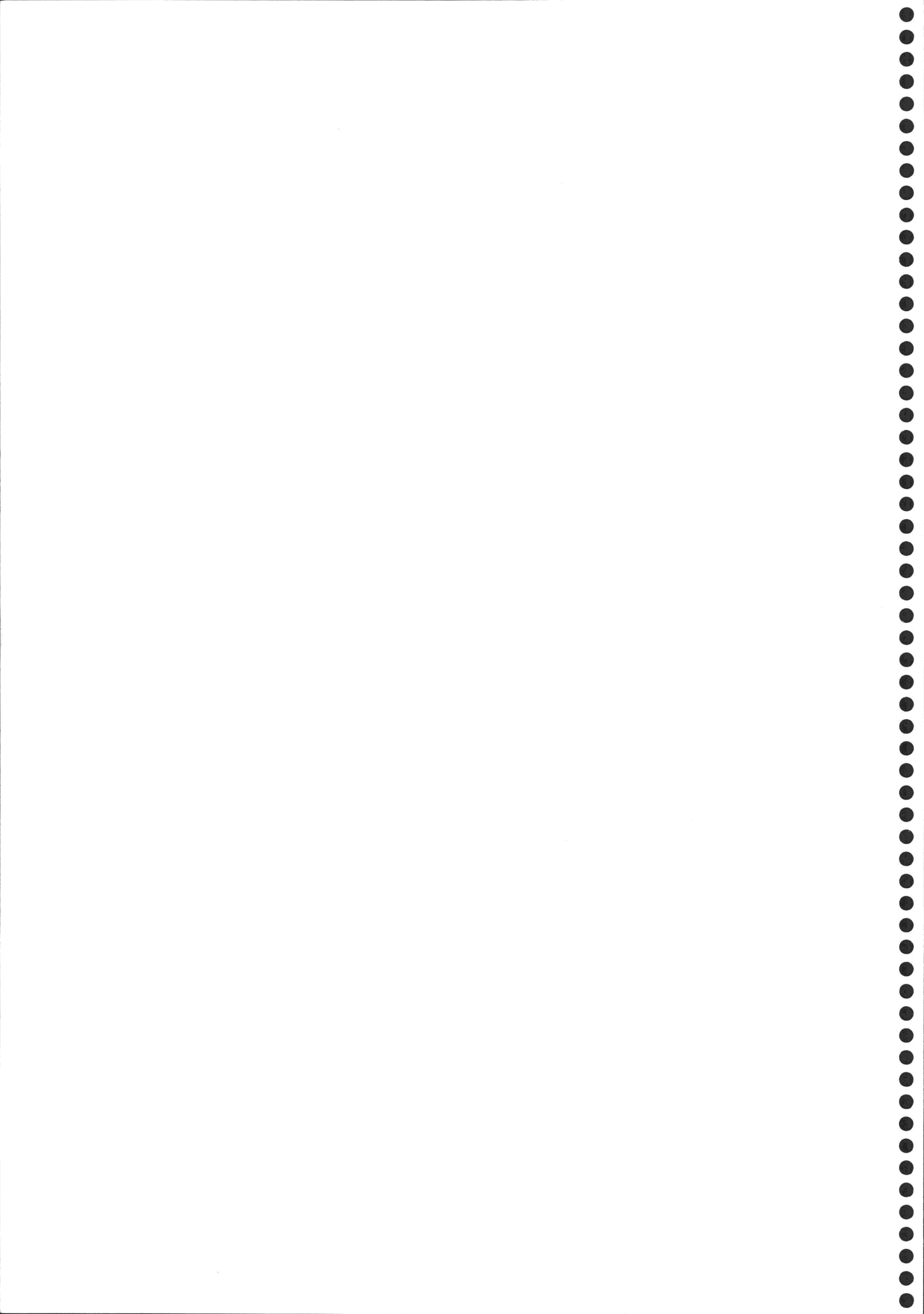
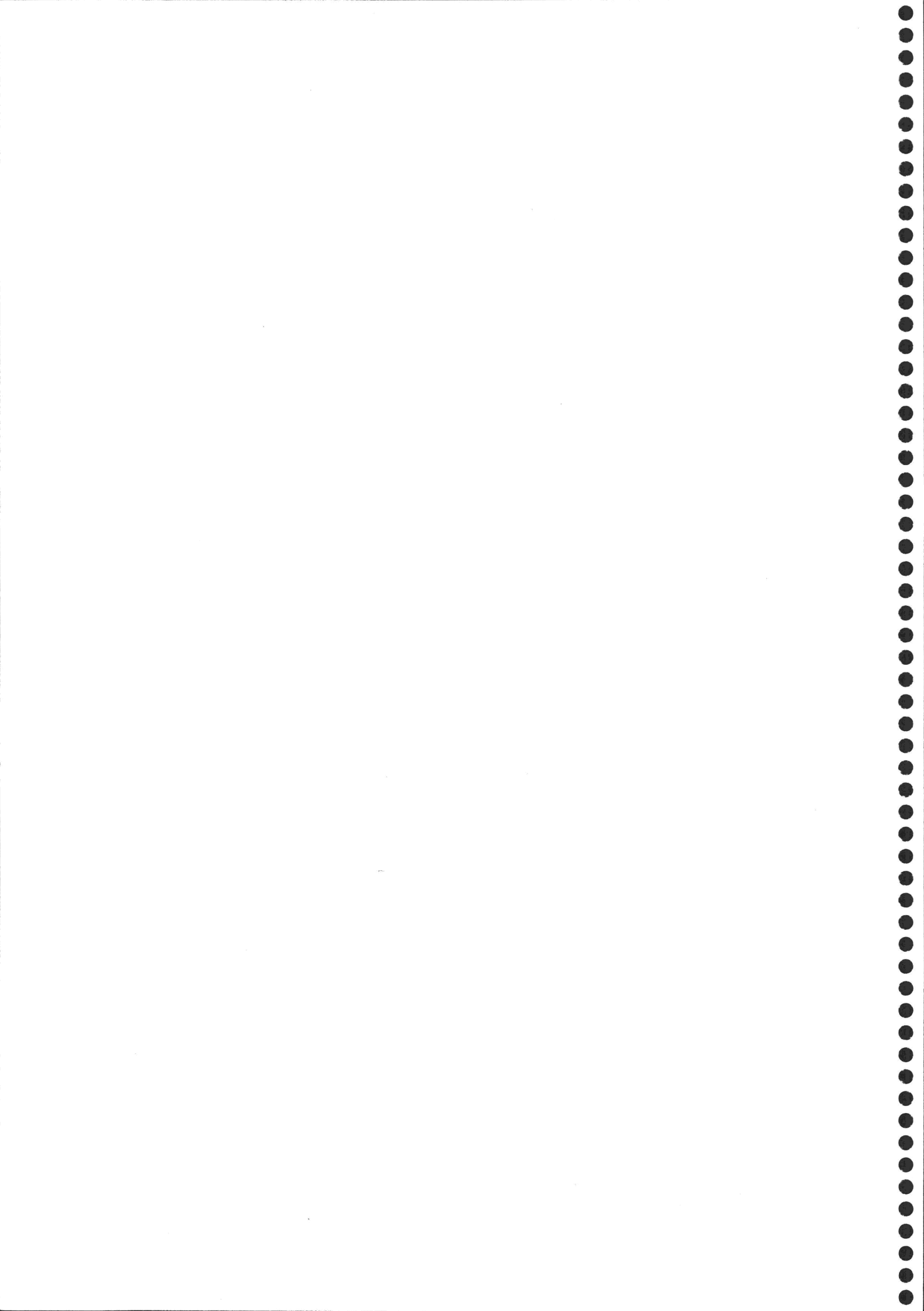


Fig. 66.- Fotografías mediante MET de cloroplastos de hojas S de *N. benthamiana* sanas (A y B) e infectadas por PMMoV-I (C y D) en 28 d.p.i..





~ DISCUSIÓN ~



Trabajos previos de nuestros laboratorios (Rahoutei y col., 1998, 1999, 2000; Rahoutei 2000) habían demostrado que el punto de acción en el cloroplasto de la infección por tobamovirus es el PSII, a semejanza de lo que ocurre en otros casos de estrés biótico (Balachandran, 1997b; van Kooten, 1990; Reiner y Beachy, 1989) y abiótico (Barón y col., 1995; Lichtenthaler, 1996). Habíamos comprobado que el OEC resultaba ser dentro de este complejo el más afectado, ya que plantas de *N. benthamiana* infectadas con PMMoV y PaMMoV muestran un notable descenso en los niveles de sus proteínas constituyentes. Los de PsbP y PsbQ disminuyen a lo largo de la infección mientras que los de PsbO se mantienen prácticamente constantes. Siendo estas proteínas de codificación nuclear, ello podría deberse a una inhibición de la transcripción, a perturbaciones de procesos post-transcripcionales como serían un transporte defectuoso desde el citoplasma, donde son sintetizadas, hasta el lumen tilacoidal, donde desarrollan su función, o a una posterior degradación proteolítica.

Además encontramos (Rahoutei y col., 2000) que en *N. benthamiana* PsbO y PsbP son familias multiproteicas y nos interesaba comprobar si nos encontrábamos en presencia también de familias multigénicas.

Un hallazgo especialmente interesante fue que durante el desarrollo de la infección las cuatro isoformas encontradas de la proteína de PsbP que se separan mediante electroforesis bidimensional no experimentan una caída paralela respecto al control sino que algunas disminuyen más drásticamente que las otras, apoyando la idea de que existe para estas proteínas un mecanismo de regulación de su biosíntesis durante la patogénesis (Rahoutei y col., 1998).

Por todo ello, nos dispusimos en el presente trabajo a la clonación y caracterización de los genes que codifican las proteínas OEC para posteriormente caracterizar las posibles familias multigénicas y analizar, por último, el efecto de la infección viral en su expresión.

Familias multigénicas han sido descritas para las proteínas más abundantes del cloroplasto como la subunidad pequeña de la RuBisCO (genes *rbcS*), y las proteínas del LHCII (genes *cab*) (Corruzi y col., 1983) que presentan una expresión diferencial en respuesta a diferentes condiciones de iluminación. Así la existencia de familias multigénicas que codifique las proteínas constituyentes del OEC podría también estar relacionada con una expresión génica diferencial (Wales y col., 1989a y b) y ser debida a la necesidad de una rápida síntesis de la proteína en determinados estadios del desarrollo de la hoja. Numerosos autores (ver Takahashi y col., 1991) coinciden en que la expresión génica de los miembros individuales de estas familias proteicas es inducida o suprimida dependiendo de las condiciones ambientales. Ésta sería una explicación para el descenso diferencial observado en los niveles de los polipéptidos PsbP en plantas de *N. benthamiana* durante el progreso de la infección viral (Rahoutei y col., 2000). Takahashi y col. (1991) describen un fenómeno similar en plantas de tabaco infectadas por el virus del mosaico del pepino (CMV), y proponen que la regulación diferencial de los niveles de estas proteínas en plantas infectadas debe estar relacionada con la respuesta de la planta a la invasión por el patógeno y con el desarrollo de la enfermedad y aparición de los síntomas cloróticos.

Los mecanismos responsables de cambios en los niveles de algunas proteínas OEC durante la infección no están aún caracterizados en ningún sistema huésped-

parásito. Estas proteínas se sintetizan en varias etapas hasta su ensamblaje en el PSII: transcripción, traducción, transporte al cloroplasto en dos pasos hasta su ensamblaje en la membrana tilacoidal y degradación (Seidler, 1996). El bloqueo de cualquiera de estos procesos o una posterior degradación proteolítica podrían ser la causa de sus bajos niveles en plantas infectadas. Recientemente Murakami y col. (2003) han puesto de manifiesto en plantas transgénicas la posible regulación post-transcripcional de las cuatro isoformas de PsbP en *N. tabacum*, por complementariedad de la región 3'-NC de uno de los mRNA consigo misma y con la de otra de las isoformas; se produce así de forma fisiológica la inhibición selectiva de la traducción de dos de las isoformas de PsbP. También se ha demostrado que tanto la expresión de *psbO* como *psbP* es dependiente del estado de desarrollo de la hoja y del cloroplasto (Palomares y col., 1993; Jain y col., 1998).

Se han hecho diversos estudios de la composición proteica del cloroplasto mediante el análisis por electroforesis bidimensional y posterior identificación por MALDI. En ellos, algunos autores predicen que las proteínas cloroplasticas codificadas en el núcleo, como es el caso de las proteínas del OEC, constituyen el 10-15% del contenido proteico del orgánulo y han descrito las proteínas del OEC junto con la plastocianina las proteínas mayoritarias del lumen (Peltier y col., 2002; Schubert y col., 2002; Emanuelson y col., 2000; Wang y col., 2000).

La proteína PsbO ha sido descrita como una familia multigénica en varias especies de plantas superiores como *Pisum sativum*, en la que Wales y col. (1989a) estimaron en 7 a 9 los genes miembros de la familia, en *Lycopersicon esculentum* en la que Görlach y col. (1993) describen la existencia de al menos dos genes por genoma haploide, y en *Arabidopsis thaliana* que posee dos isogenes. Algunos autores han podido identificar mediante electroforesis 2D de preparaciones de la fracción proteica del lumen tilacoidal de *A. thaliana* cuatro manchas de esta proteína, tres de ellas correspondientes a una misma isoforma, indicando la posible existencia de modificaciones post-traduccionales, aún no descritas en ninguna especie (Peltier y col., 2000 y 2002; Schubert y col., 2002). En trabajos anteriores de nuestros laboratorios se describió PsbO de *N. benthamiana* como una familia multiproteica de cuatro miembros (Rahoutei y col., 2000). Por primera vez en el presente trabajo, se describe esta proteína como una familia multigénica en una planta del género

*Nicotiana*. Mediante southern blot (fig. 39, en el aptdo. D.4 de *Resultados*) hemos comprobado que el gen *psbO* de *N. benthamiana* se trata de una familia génica de la que se han podido clonar cuatro isogenes.

Varios autores han descrito la proteína PsbP como una familia multigénica en especies como *Arabidopsis thaliana* dos genes, *Sinapis alba* o mostaza en la que la familia está constituida por cuatro miembros (Merkle y col., 1990), en *Physcomitrella patens* o musgo con dos isoformas (Kasten y col., 1997) y en distintas especies de *Nicotiana* (Takahashi y col., 1991). Mediante electroforesis bidimensional, Hua y col. (1989) encontraron en *N. glauca* y *N. langsdorfii* dos isoformas proteicas de PsbP y en sus híbridos estables, *N. glauca* x *N. langsdorfii*, cuatro isoformas correspondientes a las de las especies parentales. Estos mismos autores (Hua y col., 1991a, 1991b, 1993) determinaron en cuatro los miembros de esta familia proteica en *N. tabacum*, con las isoformas A, B, F y 2AF. Asimismo demostraron que F y B proceden de *N. sylvestris* mientras que 2AF y A se corresponden con las de *N. tomentosiformis*, especies de las que *N. tabacum* es un híbrido.

Los estudios de hibridación de Southern realizados en especies del género *Nicotiana* muestran que la proteína PsbP está codificada por una familia génica de cuatro miembros en *N. tabacum*, a los que designan como *psbP-A*, *psbP-B*, *psbP-F* y *psbP-2AF* y de dos en *N. sylvestris*, *N. tomentosiformis*, *N. glauca* y *N. langsdorfii* (Hua y col., 1991a, 1991b, 1992, 1993). Proponen, por ello, que a partir de una especie ancestral de *Nicotiana* con 6 pares de cromosomas ( $n = 6$ ) y una sola copia del gen *psbP* que codifica la proteína PsbP, aparecieron en el proceso evolutivo especies con  $n = 12$ , como *N. sylvestris*, *N. tomentosiformis*, *N. glauca* y *N. langsdorfii*, con 2 copias del gen, y posteriormente otras como *N. tabacum* con  $n = 24$  y 4 copias del gen *psbP*, mediante procesos como duplicación, especiación y diversificación génica (Hua y col., 1993). Se demuestra de esta manera un polimorfismo de esta proteína debido a la aparición a lo largo de la evolución de distintas copias del gen que la codifica con el aumento del número de cromosomas de las distintas especies del género *Nicotiana*, siendo la herencia del gen *psbP* de tipo mendeliano (Hua y col., 1989 y 1993). Otros autores (Peltier y col., 2002) también explican la existencia de familias multigénicas para los genes del OEC y de la plastocianina de *A. thaliana* por duplicación cuando divergieron *Brassica* y *Rosidae*. En esta especie, y mediante electroforesis 2D,

Kieselbach y col. (2000) localizaron dos manchas correspondientes cada una a una isoforma de PsbP. En cambio, Schubert y col. (2002) han localizado seis manchas que identifican como proteínas PsbP, y Peltier y col. (2002) han podido identificar cuatro manchas correspondientes a una isoforma, más otras siete en las que encuentran similitud de secuencia y a las que denominan *PsbP-like domain proteins*, de distintos pesos moleculares y de función desconocida. Esto parece indicar que PsbP también sufre modificaciones post-traduccionales aún no descritas, además de posibles proteólisis ocurridas en el proceso de purificación durante la cual se pueden generar productos de degradación de 22 kDa (Miyao y col., 1988; Kuwabara y col., 1986).

En trabajos previos al presente describimos PsbP en *N. benthamiana* como una familia proteica de cuatro miembros a los que se denominó 24-A, 24-B, 24-C y 24-D (Rahoutei y col., 1998 y 2000). La secuenciación del extremo N-terminal fue posible para todas salvo la primera, que fue determinada en este trabajo, comprobando que todas las isoformas de mayor peso molecular aparente (24-A, 24-B y 24-C) presentan idéntica secuencia en los primeros 15 aa que la isoforma 24-F mientras que la menor, 24-D, presenta la misma secuencia en esta región que las otras tres isoformas de *N. tabacum* (ver aptdo. D.2 de *Resultados*). En este trabajo también se observó en preparaciones de membranas tilacoidales de *N. benthamiana* analizadas por electroforesis 2D una quinta mancha muy minoritaria de masa molecular similar a la isoforma 24-D pero de menor pI y que también reacciona con el anticuerpo específico de PsbP. La secuenciación de su extremo N-terminal demuestra que la secuencia de los primeros 15 aa es idéntica a la determinada para las isoformas 24-A, 24-B y 24-C.

En esta Tesis Doctoral se ha analizado, mediante Southern blot, el genoma de *N. benthamiana* y se ha determinado que en esta especie PsbP también está codificada por una familia multigénica. Su clonación ha permitido la obtención de cuatro secuencias de cDNA que codifican cuatro proteínas a las que hemos denominado 24-I, 24-II, 24-III y 24-IV. El análisis detenido de sus pesos moleculares reales y pI teóricos indican que la isoforma 24-I se corresponde con 24-C, 24-II con 24-B y las otras dos, con masas moleculares muy similares y pI teórico idéntico, con la mancha 24-D.

La proteína PsbQ sólo estaba descrita como familia multigénica en *A. thaliana*. Kieselbach y col. (2000) y posteriormente Shubert y col. (2002) únicamente han podido identificar por electroforesis 2D una mancha correspondiente a PsbQ en preparaciones de del lumen tilacoidal de *A. thaliana*. Sin embargo, Peltier y col. (2002) han localizado dos posibles isoformas. El análisis por Southern blot del genoma nuclear de *N. benthamiana* durante este trabajo ha permitido concluir que *psbQ* en esta especie es una familia multigénica. Mediante su clonación se han encontrado dos miembros con una secuencia altamente conservada puesto que todas las sustituciones nucleotídicas presentes en la secuencia codificante son silenciosas salvo una, situada en la región correspondiente al péptido señal del precursor de la proteína.

Tras la clonación de los genes que codifican las proteínas constituyentes del OEC, se estudió la expresión de éstos en plantas infectadas con los virus objeto de estudio, mediante el análisis de los niveles de acumulación de sus mRNAs por Northern blot. De esta manera, pretendíamos clarificar qué proceso de la biosíntesis de las proteínas del OEC es afectado por la infección viral.

El análisis de los niveles de acumulación de los mRNAs *psbO*, *psbP* y *psbQ* (fig. 40, en el aptdo. D.5.1 de *Resultados*) nos permite concluir que la infección viral provoca la disminución de todos ellos, en hojas S a partir de 7 d.p.i., y en hojas AS a partir de 14 ó 21 d.p.i. en función del virus del que se trate. Esto coincide con la entrada del virus en las células del mesófilo de la hoja, como se muestra mediante impronta de hojas en la fig. 56, en el aptdo D.6.2 de *Resultados*. Por tanto, las variaciones en la cantidad de las proteínas del OEC, *PsbP* y *PsbQ* parecen estar originadas en el proceso transcripcional, que debe verse alterado por la presencia viral en la célula.

A pesar de que los niveles del mRNA *psbO* se ven disminuídos en las fases agudas de la infección viral, la cantidad de proteína codificada permanece constante, lo que indica que la alteración en la expresión del gen correspondiente, se anula posteriormente por mecanismos de regulación post-transcripcional de su síntesis (Jain y col., 1998, Palomares y col., 1993).

También se ha comprobado que la fase de recuperación de los síntomas experimentada en las hojas jóvenes de la planta, a partir de 21 d.p.i. y sólo en el caso



de plantas infectadas con PMMoV-I, está acompañada de un aumento muy pronunciado en las cantidades de mRNAs de las tres proteínas OEC.

Que la infección viral de una célula lleve a disminuir la síntesis de las proteínas del huésped no resulta extraño, ya que el virus compite por los sustratos para la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas y consume durante su ciclo de replicación y multiplicación gran cantidad de azúcares y bases nitrogenadas. En algunos casos se ha descrito que en el frente de infección, donde la síntesis viral es más activa, esta lleva a incorporar la casi totalidad del  $^{35}\text{S}$  suministrado en detrimento de la síntesis de proteínas del huésped.

Para determinar si la inhibición de la expresión de los genes de las proteínas del OEC responde a un descenso generalizado de la expresión de genes del huésped como consecuencia directa o indirecta de la síntesis viral o bien a un efecto específico hemos analizado la posible alteración en la expresión de otros genes, tanto nucleares como cloroplásticos, como consecuencia de la infección viral. Los genes seleccionados para este estudio codifican otras proteínas constituyentes del PSII, una proteína del PSI, otras de localización estromática y una que desarrolla su función en la mitocondria (figs. 41 y 42, en el aptdo. D.5.2 de *Resultados*). Con ello vemos que la expresión de los genes nucleares estudiados (*lhcb1*, *psaK*, *rbcS*, *rca* y *gox*) se ve reprimida como consecuencia de la infección viral en las hojas S desde los 7 d.p.i. y de forma más acusada en el caso de la infección por PMMoV-S. En las hojas AS, el efecto se detecta, al igual que en el caso de las proteínas OEC, a partir de 14 d.p.i. en las plantas infectadas con PMMoV-S y de 21 d.p.i. en las infectadas con PMMoV-I, coincidiendo con la entrada del virus en el mesófilo de la hoja, como se demuestra en la localización de la CP mediante impronta de hojas (fig. 56, en el aptdo. D.6.2 de *Resultados*). Además, la fase de recuperación experimentada en las hojas jóvenes de las plantas infectadas con este último virus también se acompaña de un incremento en la expresión de estos genes nucleares, mientras que las hojas AS sus niveles de mRNAs son muy bajos.

En las hojas de plantas sanas equivalentes a las AS de infectadas vemos que la expresión de algunos genes caen progresivamente debido al envejecimiento del tejido. Estos genes son el *lhcb1*, el *rbcS* y el *psaK*, que codifican proteínas fotosintéticas cuya actividad decae con el desarrollo de la senescencia. Ello sería una consecuencia

de las alteraciones metabólicas que acompañan al paso de la hoja de fuente a sumidero en este periodo. Así, las actividades fotosintéticas, tanto la cadena de transporte electrónico, como las rutas metabólicas de síntesis de azúcares, se ven inhibidas. Como consecuencia de la infección viral, la expresión de estos genes disminuye drásticamente con respecto a los niveles del control coincidiendo, si comparamos con la fig. 43 (aptdo. D.5.3 de *Resultados*), con la invasión del virus en el tejido. En cambio, los niveles de acumulación de algunos mRNAs de genes nucleares, como los correspondientes a los genes *rca* y *gox*, aumentan como consecuencia de la infección viral. La proteína Rca cumple la función de activasa de la RuBisCO cuando está ensamblada formando un gran complejo pero, en varias condiciones de estrés como altas temperaturas, se disocia y se ancla a la membrana tilacoidal para actuar como chaperona. Rca está relacionada con la familia de proteínas AAA, con función de chaperona dependiente de ATP, asociadas con gran variedad de actividades celulares (Sánchez de Jiménez y col., 1995; Rokka y col., 2001). Esta segunda función puede explicar una necesidad por parte del cloroplasto, de esta proteína en condiciones de estrés y en procesos de senescencia. Respecto al gen *gox*, se conoce que se induce en cloroplastos en desarrollo y que su traducción se ve activada por luz.

En cuanto al descenso en los contenidos de mRNAs de las dos subunidades de la RuBisCO, otros autores describieron en plantas infectadas con hongos la inhibición del ciclo de Calvin-Benson (Scholes, 1992), que atribuyen a una represión génica por aumento en la concentración de azúcares solubles, lo que contribuye al desarrollo de los síntomas y a la aceleración de la senescencia, en general (Balachandran y col, 1997).

Podemos así afirmar que los tobamovirus estudiados en este trabajo aceleran la senescencia de los tejidos foliares, haciendo la salvedad de las hojas recuperadas de las plantas de *N. benthamiana* infectadas con PMMoV-I, en las que el metabolismo parece ser similar al observado en hojas equivalentes de plantas sanas.

La expresión de los genes cloroplásticos analizados (*psbA* y *rbcL*) son independientes de la edad de la hoja, tanto en plantas sanas como infectadas. Sin embargo sí se ve afectada por la invasión del tejido por ambos virus, aunque de forma más leve que en el caso de los genes nucleares. En hojas S su expresión es

constante a lo largo de la patogénesis, aunque inferior a la detectada en el control. Sin embargo, la expresión de estos genes en hojas AS no se ve afectada hasta 14 d.p.i. en el caso de infección por PMMoV-S ó 21 d.p.i. por PMMoV-I, coincidiendo con la descarga de los virus en estas hojas. Como consecuencia de la invasión viral la expresión de ambos genes cae respecto al control, más drásticamente en las infectadas con PMMoV-S, y se mantiene constante hasta el final de la infección. Los niveles de expresión de *psbA* y *rbcL* no se ven alterados durante la fase de recuperación experimentada en las plantas infectadas con PMMoV-I. La represión de los genes cloroplásticos estudiados como consecuencia de la invasión viral puede deberse, entre otras causas, a mecanismos celulares de regulación coordinada de estos genes con otros nucleares que también codifican proteínas cloroplásticas y cuya expresión se inhibe por la infección viral (Rodermel, 1999).

Comprobamos así que en hojas AS la expresión de todos los genes de codificación nuclear o cloroplástica analizados, ya sean relacionados con el OEC la antena o el RC del PSII, el PSI u otras rutas metabólicas cloroplásticas y de la mitocondria, cae drásticamente coincidiendo con la entrada del virus en el tejido, implicando una aceleración de los procesos de senescencia.

En nuestro sistema huésped-patógeno, hemos comprobado que ambos virus son capaces de alcanzar el ápice de la planta infectada con relativa rapidez, siendo detectables a 7 d.p.i. en las hojas jóvenes (immunoblotting de la CP y northern del RNA viral, aptdos. D.6.2 y D.5.3 de *Resultados*, respectivamente), mientras que en las hojas AS, ya desarrolladas en el momento de la infección, la invasión por PMMoV-S comienza a 14 d.p.i y por PMMoV-I, aproximadamente a los 21 d.p.i.. Esta diferencia en el tiempo que cada virus invierte en invadir las hojas maduras puede estar relacionada con la mayor agresividad del primero de ellos; en cuanto a los síntomas, efectos en la expresión génica del huésped y alteraciones en la actividad fotosintética provocados por cada una de los virus en su huésped experimental *N. benthamiana* (aptdos. D.1, D.5 y D.6 de *Resultados*, respectivamente).

Existen dos diferencias notables entre hojas S y AS que justificarían el distinto efecto que ambos virus provocan en ellas: las hojas S se desarrollan estando ya invadida la planta por el virus, que por medio del movimiento a larga distancia llega desde las hojas inoculadas al ápice de la planta; y las hojas AS, en cambio, ya son

maduras en el momento de la inoculación de los virus. Por tanto, en el primer tipo de hojas es posible el estudio del efecto del virus en el metabolismo de hojas en desarrollo, que funcionan como sumidero de los productos de la fotosíntesis, y en el segundo tipo podemos estudiar las alteraciones espaciales del metabolismo foliar con el avance del frente de invasión del virus (van Kooten y col., 1990).

Mediante los estudios de localización y acumulación virales (aptdos. D.6.2 y D.5.3 de *Resultados*) en plantas de *N. benthamiana* inoculadas, hemos comprobado que PMMoV-S inicia la invasión de la hoja varios días antes que PMMoV-I. Roberts y col. (1997) estudiaron el movimiento a corta y larga distancia de un potyvirus (PVX) en plantas de *N. benthamiana*, para lo que clasificaron los nervios foliares en cinco clases en orden decreciente de tamaño (clases I, II, III, IV y V). En primer lugar, describieron que el virus lleva a cabo su movimiento a larga distancia de forma pasiva desde las hojas infectadas a las hojas sumidero por el floema, haciéndose la infección sistémica a los 6 d.p.i.. Y determinaron que la descarga del virus en las hojas apicales desde el floema se lleva a cabo a través de las venas de clase III, ya que las de clase IV y V son funcionalmente inmaduras. Una vez descargado desde el floema, el virus avanzaría célula a célula, por medio de los plasmodesmos y gracias a la mediación de la proteína de movimiento viral, hasta invadir por completo el mesófilo foliar. En segundo lugar, proponen que el movimiento del virus, una vez se descarga del floema y como mecanismo de defensa de la planta, está limitado al movimiento célula a célula, por lo que el virus no es capaz de invadir las hojas fuente. Si esto es así, significa que alrededor de 14 d.p.i. las hojas AS, que hasta entonces eran fuente, cambian su metabolismo convirtiéndose en tejido sumidero, momento en el que el virus es capaz de invadir estas hojas. Nuestros resultados coinciden en que el virus viaja a través del floema hacia el ápice de la planta invadiendo las hojas en formación (hojas sumidero). Pero también demostramos la presencia de virus en hojas AS hacia la mitad del proceso patogénico. Por diversos estudios, de localización por impronta de hojas, microscopía electrónica, y análisis de acumulación de RNA viral (aptdos. D.6.2, D.6.3 y D.5.3 de *Resultados*, respectivamente), hemos comprobado que PMMoV-S y PMMoV-I invaden estas hojas alrededor de 14 d.p.i.. Teniendo en cuenta la hipótesis de que la entrada del virus no sea posible en hojas fuente, como son las AS al inicio de la infección, y que la presencia de virus en una hoja sumidero

no afecta a la transición a hoja fuente, se justificaría el retraso en la invasión de estas última hojas (Roberts y col., 1997; Oparka y Santa Cruz, 2000).

La expresión de los genes nucleares en las hojas S cae progresivamente con la evolución de la patogénesis, mientras los niveles de los mRNAs de los genes cloroplastídicos, aunque inferiores a los del control, permanecen constante. Esto ocurre incluso en el caso de las hojas recuperadas de plantas inoculadas con PMMoV-I, a 28 d.p.i., en las que comprobamos que los niveles de expresión de los genes de codificación nuclear incrementan siendo comparables con los encontrados en hojas equivalentes de plantas sanas. En cambio, en las hojas AS el comportamiento es completamente distinto. En primer lugar vemos que en plantas infectadas con PMMoV-S los niveles de expresión de todos los genes nucleares analizados disminuyen drásticamente y de forma paralela desde los 14 d.p.i., momento en el que detectamos la entrada del virus en la hoja, mientras que el efecto en la expresión de los genes cloroplastídicos no es uniforme: *psbA* se reprime a 28 d.p.i. mientras que la expresión de *rbcL* cae a partir de 21 d.p.i. y se mantiene en los mismos niveles a 28 d.p.i., indicando la existencia de un mecanismo de regulación de *psbA* que hasta 21 d.p.i. logra mantener los niveles de su mRNA iguales al control a pesar de que el tejido ya ha sido invadido. La respuesta de las hojas AS en las plantas infectadas con PMMoV-I es similar a la inducida por PMMoV-S, aunque mucho menos marcada. La disminución en la expresión de los genes codificantes de las proteínas OEC disminuyen ligeramente. Los niveles de acumulación de los mRNA de otros genes nucleares son menores a los encontrados en plantas sanas a partir de 21-28 d.p.i. y la expresión de los genes cloroplastídicos disminuye ligeramente solo a 28 d.p.i.. Probablemente, el hecho de que los cambios en expresión génica originados por la invasión de PMMoV-I en las hojas AS sean mucho menos drásticos que los causados por PMMoV-S esté relacionado con la capacidad que tienen las plantas *N. benthamiana* infectadas con PMMoV-I de desarrollar el proceso de recuperación de su síntomas experimentado en sus hojas jóvenes.

Cabe destacar que la expresión todos los genes estudiados está ligada a la presencia de ambos virus en los tejidos estudiados, excepción de las hojas de plantas inoculadas con PMMoV-I desarrolladas durante el proceso de recuperación, en las

que, a pesar de continuar invadidas por virus, logran formarse sin síntomas y recuperar los niveles de expresión de las plantas sanas.

Los genes fotosintéticos tienen diversos mecanismos de regulación, comunes en ocasiones a muchos de ellos. La luz induce la expresión de los genes *cab*, y de los que codifican las subunidades del OEC y del RC (Herranen y col., 2001); el estado redox del pool de plastoquinonas controla los niveles de expresión de las proteínas del PSII y, de forma coordinada y opuesta, los de las constituyentes del PSI (Li y col., 2000). Además, se ha propuesto que las proteasas cloroplastídicas constituyan un mecanismo de regulación post-traducciona l de las proteínas constituyentes del PSII. Estas proteasas son la SPP y la TPP (involucradas en el transporte de proteínas), la Tsp (que elimina el extremo C terminal del precursor de PsbA), la FtsH (anclada a la cara estromática de la membrana tilacoidal y que interviene en la degradación de la proteína PsbA dañada por fotoinhibición) y las serín-proteasas Clp dependientes de ATP (de localización estromática y que degradan proteínas solubles o unidas a membrana) y DegP (unida a la cara luminal de la membrana del tilacoide y que pueden estar relacionada con mecanismos de respuesta a estrés térmico (Adam, 2000).

Una característica de las infecciones por patógenos, y en concreto por virus, es la heterogeneidad espacial que éstos provocan en el metabolismo de la planta infectada y en la propia acumulación viral: zonas invadidas por el virus, y que desarrollan toda una variedad de síntomas (mosaico moteado, clorosis, etc.) son vecinas de otras libres de él y que presentan un metabolismo sin alteraciones (Técsi y col, 1994, 1996). Diversos autores han mostrado también que la hoja infectada también muestra un patrón heterogéneo en la tasa de fotosíntesis (Scholes y Rolfe, 1996; Balachandran 1994 a,b,1987b). Las técnicas de fluorescencia de la Chl han demostrado ser en las últimas décadas una eficaz herramienta para la medida de actividad fotosintética. Complementándolas con la de captación de imagen de fluorescencia, los sistemas FIS resulta ser muy prometedores para el diagnóstico y seguimiento de las infecciones por patógenos, también aplicable al estudio de plantas sometidas a estrés producido por factores abióticos (Lichtenthaler, 1996; Chaerle y col., 2001;Valcke, 2003). Mediante el estudio comparado de las imágenes de fluorescencia con el análisis de la expansión del virus en la planta y el desarrollo de

sus síntomas, se sabe que la emisión de fluorescencia se ve alterada con anterioridad al desarrollo de los síntomas, haciendo posible un diagnóstico presintomático de las infecciones por patógenos (Chaerle y van der Straeten, 2001).

El prototipo de aparato de FI desarrollado en la Universidad de Limburg (Cisacto, 2000; Ciscato et al. 1999, 2000) ha demostrado su eficacia en el estudio de la interacción *N. benthamiana* – PMMoV-I. Hemos comprobado cómo las imágenes de determinados parámetros de fluorescencia logran exhibir cambios característicos en la eficiencia fotosintética y el movimiento del virus que no muestran los síntomas visuales. Es el caso de las hojas AS infectadas por el virus anterior. Estas hojas maduras, ya desarrolladas en el momento de la infección, muestran, en sus imágenes de NPQ, cómo este parámetro y la correspondiente disipación termal incrementan de forma drástica en las fases intermedias de la infección (14 – 17 d.p.i.) en la zona del nervio central y las venas laterales cuando medimos este parámetro en la fase estacionaria.

Diversos autores han demostrado la utilidad de este parámetro en el seguimiento de la infección por patógenos, principalmente hongos. Scholes y Rolfe (1996) demostraron que la infección por el hongo *Puccinia coronata* lleva a cambios locales en  $\Phi_{\text{PSII}}$  y NPQ que tienen lugar de forma paralela al desarrollo del hongo y de sus síntomas. Distinguen dos zonas de la hoja en función de estos cambios. En la primera zona, invadida por el hongo, es donde se desarrollan los síntomas, y la segunda es la que permanece libre de patógeno. Establecen que  $\Phi_{\text{PSII}}$  cae progresivamente, primero en la zona invadida, y después de la esporulación en toda la hoja. También encuentran que los valores de NPQ son muy bajos en la zona invadida, indicando una alta actividad metabólica, mientras que en la zona no invadida toma valores superiores al control. Además relacionaron el aumento de NPQ con perturbaciones en el gradiente de pH a través de la membrana tilacoidal, basándose en el análisis del efecto del patógeno en el ciclo de Calvin.

En el caso de las hojas AS de *N. benthamiana* inoculadas con PMMoV-I, si comparamos las imágenes de NPQ a 14 – 17 d.p.i. y los *impronta de hojas* en el mismo tiempo post-infección, es evidente que el aumento de NPQ en la región de los nervios principales se corresponde con la invasión del virus en esa zona de la hoja. Cuando analizamos muestras de las tres zonas definidas en las hojas AS en función



de sus valores de NPQ para su estudio por microscopía electrónica de transmisión (aptdos. D.6.1 y D.6.3 de *Resultados*), observamos la presencia viral únicamente en las zonas anteriores, que desarrollan una notable disipación térmica de energía no utilizada en fotosíntesis. Sin embargo, no existen grandes diferencias en la ultraestructura de los cloroplastos de estas áreas con respecto a la correspondientes al resto del mesófilo que registran valores bajos de NPQ, durante toda la cinética de inducción de la fluorescencia. Resulta de gran interés cómo estos notables cambios en la eficiencia fotosintética se desarrollan en hojas que en ningún momento del estudio muestran síntomas de estar sometidas a ningún tipo de estrés. Lo que confirma la utilidad de la FI para el diagnóstico pre-sintomático de infecciones por patógenos.

El NPQ es un parámetro de fluorescencia que mide la proporción de energía no utilizada en fotosíntesis y que se disipa principalmente como energía térmica. Algunos autores (ver referencias en Balachandran y col., 1997). opinan que el aumento de los valores que alcanza este parámetro así el del estado de reducción del primer aceptor de electrones del PSII,  $Q_A$ , son respuestas tempranas del huésped. El aumento del NPQ forman parte de procesos fotoprotectores que desarrolla el cloroplasto en situaciones de estrés y frecuentemente va ligado a un incremento en el contenido de zeaxantina (Demmig-Adams y Adams, 1992). Cuando la capacidad defensiva del huésped se ve desbordada, pueden iniciarse los procesos fotoinhibitorios principalmente en las fases finales de la infección (van Kooten, 1990; Rahoutei y col., 2000) y se registra una notable bajada del parámetro  $F_v/F_m$ . El equilibrio entre procesos fotoprotectores y fotoinhibitorios mientras avanza la infección contribuye al desarrollo de los síntomas y, en última instancia de daños en el aparato fotosintético.

El origen de NPQ ha sido objeto de amplio debate. Han sido descritos tres de sus componentes fundamentales  $q_i$ ,  $q_I$  lento y  $q_E$  (Ruban y Horton, 1995; Oja y Laisk, 2000; Bukhov y col., 2001). El primero de ellos,  $q_i$  o quenching irreversible/lentamente reversible, que se debe a daños fotoinhibitorios en el RC que dan lugar a una acumulación de centros de PSII no funcionales denominados *centros disipativos* (van Wijk, 1993). En estos centros cerrados con el *pool* de plastoquinonas completamente reducido, ocurren transiciones de estado en las que la antena, una vez



fosforilada, se libera del CC migrando a las lamelas estromáticas. Aquí puede originarse otro tipo de *quenching* denominado de transferencia ( $q_T$ ). El  $q_T$  lento es un tipo de *quenching* aún más lento que se induce por daños en el OEC, aunque algunos autores lo atribuyen a la doble reducción de  $Q_A$ , protonación y liberación del cofactor. El  $q_E$  o *quenching* de excitación, relacionado con procesos fotoprotectores rápidos y reversibles, está relacionado con la energetización del tilacoide (generación de  $\Delta pH$  transtilacoidal) y es el componente mayoritario del NPQ. Se ha propuesto que se origine en cambios conformacionales en el LHCII o en las antenas menores del CC del PSII, por interacción de la Chl con zeaxantina, favorecida por la protonación de proteínas de las antenas (Horton y col., 1994) o bien por interacción entre las propias moléculas de Chl por protonación de sus ligandos (Crofts y Yerkes, 1994). Bajo distintas condiciones de estrés pueden desacoplarse la cadena de transporte electrónico fotosintético y la formación del gradiente de pH, provocando una acidificación del lumen. Existen tres *dianas* de protonación en el PSII: las antenas, cuya protonación produce un aumento en  $q_E$ , la violaxantina de-epoxidasa en su forma protonada es activa y cataliza la de-epoxidación de violaxantina a zeaxantina, y el OEC. Cuando se produce la protonación del OEC se libera  $Ca^{2+}$  inactivando el lado donador del fotosistema. (Balachandran y col., 1997b; Förster y col., 2001; Jin y col., 2001).

El ciclo de las xantofilas ha sido descrito por muchos autores como un mecanismo de fotoprotección del PSII en condiciones fotoinhedoras (Demmig-Adams y Adams, 1992; Ruban y Horton 1995). Grudzinski y col. (2002) concluyen que a altas intensidades lumínicas se acelera la isomerización de violaxantina a zeaxantina y que este desplazamiento del equilibrio entre ambas debe estar relacionado con los cambios conformacionales del LHCII anteriormente mencionados y, por tanto, con la inducción de *quenching* en las antenas.

Los resultados preliminares obtenidos por C. Sajani (comunicación personal) en nuestro laboratorio no apuntarían a un aumento en la concentración de zeaxantina en las plantas de *N. benthamiana* infectadas con PMMoV-I, con respecto a los controles sanos.

Si estudiamos con detalle la cinética de NPQ en RIs seleccionadas en las zonas N (con alto NPQ) de hojas AS vemos que no existe fase de relajación de este

parámetro previa a la fase de estado estacionario. Esto apuntaría a la existencia de perturbaciones en el ciclo de Benson-Calvin en estas hojas. Ciscato (2000) en plantas que sufren de toxicidad por metales pesados y Scholes y Rolfe (1996) y Chou y col (2000) en distintas plantas huésped infectadas por hongos, encuentran una situación similar.

Atendiendo al estado del PSII en nuestras plantas infectadas con PMMoV-I, éste presenta un OEC dañado con niveles disminuidos de sus proteínas constituyentes (Rahoutei y col., 1998, 1999, 2000), lo que presenta similitudes con los centros disipativos anteriormente descritos y donde se han disociado las proteínas OEC. La abundancia de este tipo de centros en plantas infectadas podría explicar, al menos en parte, los altos niveles de NPQ como efecto de la infección viral.

La situación de las hojas S es más compleja. El enrollamiento y rizado de estas hojas, que es uno de los síntomas habituales de las infecciones, impide que la luz de excitación utilizada en los sistemas de FI sea homogénea en cuanto al ángulo de incidencia. Por ello, optamos por el análisis comparado de la cinética de NPQ en RIs convenientemente elegidas, en plantas control e infectados.

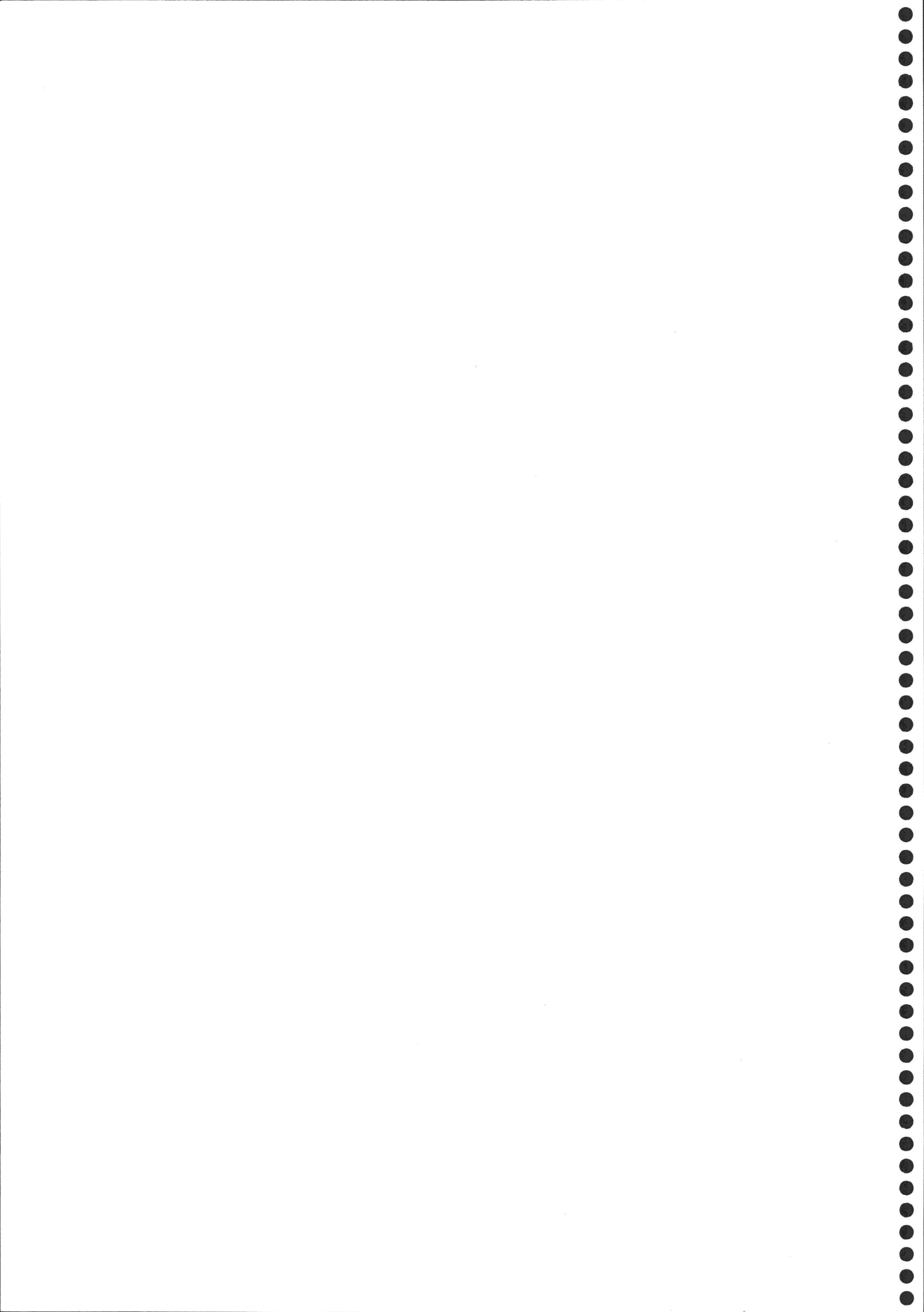
Si comparamos las cinéticas de NPQ en RIs equivalentes de hojas S y sanas correspondientes (fig. 55, en el aptdo. D.6.1.2.1 de *Resultados*), vemos que éstos no presentan grandes diferencias hasta las fases finales de la infección.

Si comparamos las imágenes de NPQ de hojas S en distintos momentos de la infección y los correspondientes *impronta de hojas*, que muestran la localización foliar de la CP (figs. 54 y 57, en los aptdos. D.6.1.2.1 y D.6.2 de *Resultados*), vemos que estas hojas presentan una distribución homogénea de la acumulación viral en todos los puntos de la infección estudiados, y también un valor de NPQ uniforme en todas las áreas foliares en las que podemos asegurar una iluminación adecuada. Este hecho, junto con los resultados obtenidos en hoja AS, corroboraría a que el aumento en NPQ tiene una estrecha correlación con la expansión viral.

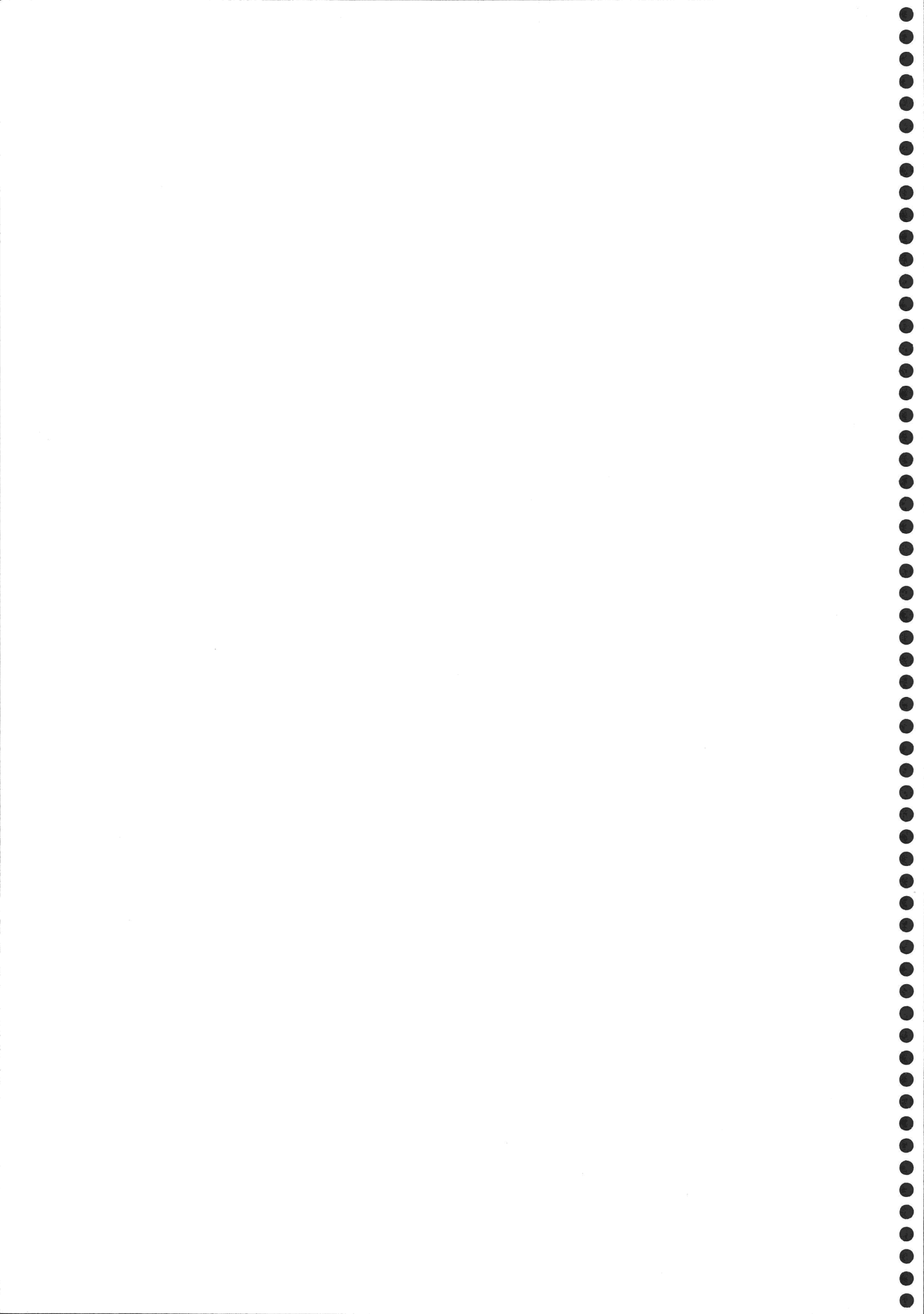
Estudios de cambios en el patrón espacial del NPQ parecen ser de mayor utilidad que los de otros parámetros fotosintéticos como,  $\Phi_{PSII}$  o la fluorescencia, en el caso de infecciones por patógenos, si analizamos los resultados del presente trabajo y los de otros autores (Scholes y Rolfe, 1996; Chou y col 2000). En el caso de

*N. benthamiana*-PMMoV-I, un incremento en la disipación térmica de la energía absorbida (NPQ) no parece corresponderse con una disminución en el rendimiento cuántico del PSII  $\phi$ , como ocurre en numerosos casos en los que distintos factores de estrés abiótico afectan a la eficiencia fotosintética (Lichtenthaler, 1996) con este patrón de comportamiento.

Si observamos las imágenes de  $\Phi_{\text{PSII}}$  en hojas AS, no se distingue un patrón heterogéneo, como ocurre en NPQ, en ningún momento de la infección, ni en ningún punto de la cinética, salvo cuando en las imágenes de NPQ es distinguible la zona L (14 - 17 d.p.i.).



*~ CONCLUSIONES (CONCLUDING REMARKS) ~*

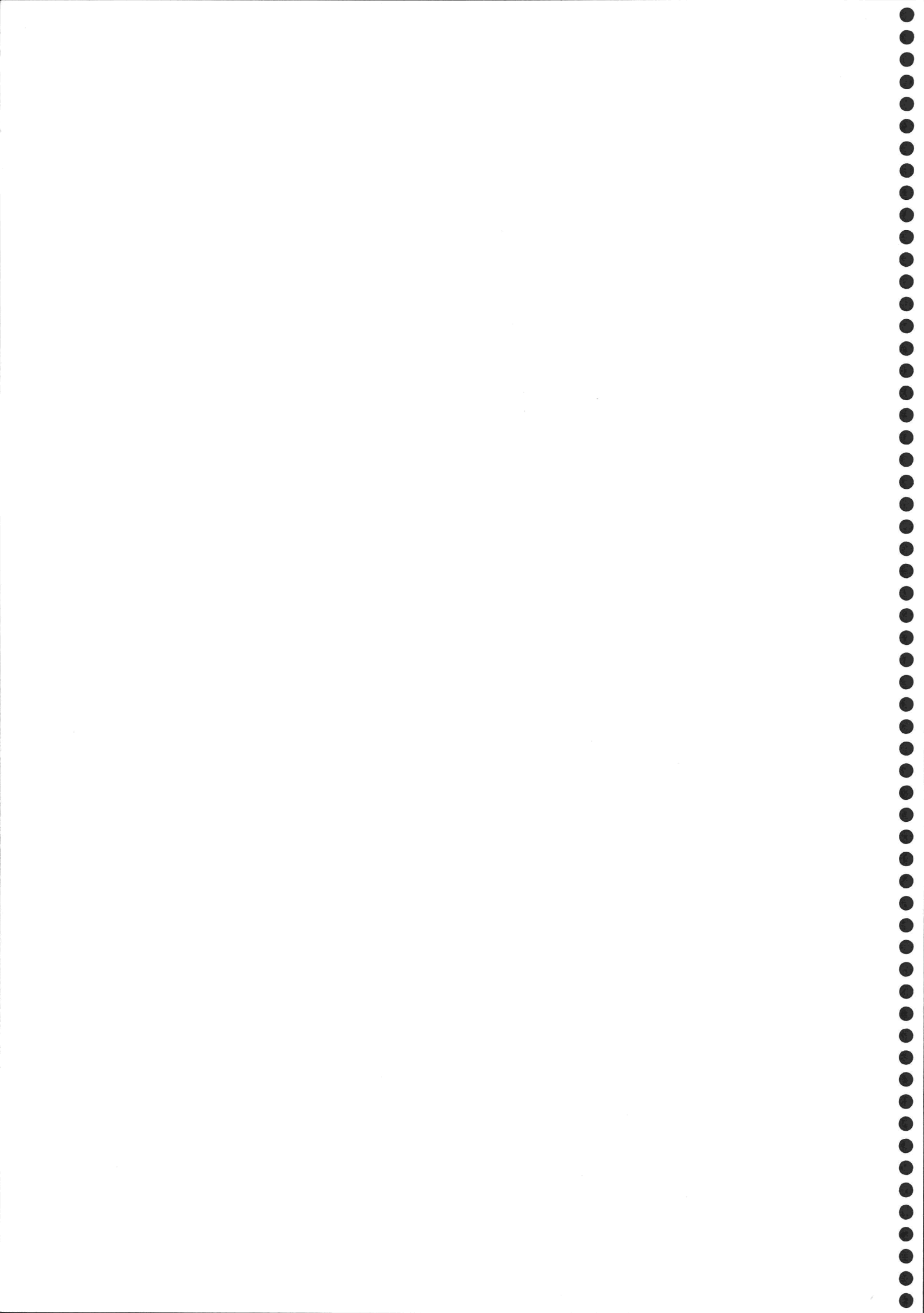


- 1.- Las tres proteínas constituyentes del OEC (PsbO, PsbP, PsbQ) están codificadas por familias multigénicas en *N. benthamiana*.
- 2.- Las familias multigénicas de psbO y psbP están constituídas por al menos cuatro miembros que codifican cuatro isoformas proteicas diferentes, mientras que la de psbQ consta de al menos dos miembros que podrían codificar la misma proteína madura.
- 3.- Estudios de la expresión génica de las proteínas OEC durante la patogénesis, mediante Northern blott, indican que los niveles de mRNA de las proteínas PsbO, PsbP y PsbQ disminuyen notablemente durante las fases tempranas y agudas de infección viral, en hojas sintomáticas y asintomáticas. Este efecto es más acusado en plantas infectadas con PMMoV-S. Sin embargo, durante la fase de recuperación de los síntomas que se manifiesta sólo en plantas infectadas con PMMoV-I, las cantidades de los mRNAs de las proteínas OEC, se incrementan hasta alcanzar niveles semejantes a los de los controles. Ello indicaría fallos en la transcripción, atribuibles a la presencia viral.
- 4.- Las hojas asintomáticas de *N. benthamiana* infectadas con PMMoV-I presentan un patrón de NPQ, que mide la energía disipada y no utilizada en fotosíntesis, muy característico durante la infección viral. Valores elevados de NPQ en algunas zonas de la hoja, pueden correlacionarse con áreas de expansión viral.

- 1.- The three OEC proteins (PsbO, PsbP, PsbQ) are codified by multigene families *N. benthamiana*.
- 2.- Both psbO y psbP multigene families have four members encoding four different protein isoforms. The psbQ gen family has at least two isogenes, that might codify for the same mature protein.
- 3.- Northern blot analysis of total RNA from *N. benthamiana*-infected plants showed that the viral infection is associated to a reduction of the OEC proteins-encoding mRNAs, at both the early and acute phases of the infection. However, during the recovery phase of the infection, an increase in the OEC proteins-encoding mRNAs was observed. Thus, the accumulation level of the OEC-mRNAs parallel those of their encoded proteins in some cases. The data are indicative that during the pathogenesis the OEC protein accumulation is regulated at the transcriptional level.
- 4.- Chlorophyll fluorescence imaging reveals a complex, time-varying spatial pattern of the photosynthetic efficiency and NPQ processes in asymptomatic leaves from virus-infected plants. Leaf areas with high NPQ, which measured energy dissipation, values correspond with the virus spreading in the plants.



~ BIBLIOGRAFÍA ~



- ADAM, Z. (2000). Chloroplast proteases: possible regulators of gene expression? *Biochimie* 82 (6-7): 647-654.
- ADELROTH, P., LINDBER, K., ANDREASSON, L.E. (1995). Studies of  $\text{Ca}^{2+}$  binding in spinach photosystem II using  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . *Biochemistry* 28: 9021-9027.
- ÅKERLUND, H.E., JANSSON, C., ANDERSSON, B. (1982). Reconstitution of photosynthetic water splitting in inside-out thylakoid vesicles and identification of a participating polypeptide. *Biochim. Biophys. Acta.* 681: 1-10.
- ALMÁSI A., APATINI, D., BÓKA, K., BÖDDI, B., GÁBORJÁNYI, R. (2000). BSMV infection inhibits chlorophyll biosynthesis in barley plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56: 227-233.
- ALMÁSI A., HARSÁNYI A., GÁBORJÁNYI, R. (2001) Photosynthetic alterations of virus infected plants. *Acta Phytopath. et Entomol. Hung.* 36 (1-2): 15-29.
- ALONSO, E. GARCIA-LUQUE, I. DE LA CRUZ, A. WICKE, B. AVILA-RINCÓN, M. J. SERRA, M. T. CASTRESANA, C., DIAZ-RUIZ, J. R. (1991). Nucleotide sequence of the genomic RNA of pepper mild mottle virus, a resistance-breaking tobamovirus in pepper. *J. Gen. Virol.* 72: 2875-2884.
- ALONSO, E., GARCÍA-LUQUE, I., AVILA-RINCÓN, M.J., WICKE, B., SERRA, M.T., DÍAZ-RUIZ, J.R. (1989) A tobamovirus causing heavy losses in protected pepper crops in Spain. *J. Phytopathol.* 125: 67-76.
- ALTSCHUL, S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W., LIPMAN D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-10.
- ANDERSSON, B., ÅKERLUND, H-E. (1987). Proteins of the oxygen complex. *Topics in Photosynthesis.* Vol. 8: 379-420. Barber, J. (Ed.). Elsevier Science Publishers.
- ANDERSSON, B., STYRING, S. (1991). Photosystem II: Molecular organization, function and acclimation. *Current Topics in Bioenergetics.* 16: 1-81.
- ANDERSSON, B., FRANZÉN, L.G. (1992). The photosystems of oxygenic photosynthesis. *Molecular mechanisms in bioenergetics.* Cap. 5: 121-143. L. Ernster (Ed.). Elvieser Science Publishers.
- ARELLANO, J. B. SCHRODER, W. P. SANDMANN, G. CHUECA A. BARÓN, M. (1994). Removal of nuclear contaminants and of non-specifically photosystem II bound copper from photosystem II preparations. *Physiol Plant.* 91: 369-374.
- AVILA-RINCÓN, M.J., FERRERO, M.L., ALONSO, E., GARCÍA-LUQUE, I., DÍAZ-RUIZ, J.R. (1989). Nucleotide sequences of 5' and 3' non-coding regions of pepper mild mottle virus strain S RNA. *J. Gen. Virol.* 70: 3025-3031.

- BABANI F., LICHTENTHALER H.K. (1996). Light-induced and age-dependent development of chloroplast in etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments, CO<sub>2</sub> assimilation rates and different kinds of chlorophyll fluorescence ratios. *J. Plant Physiol.* 148: 555-566.
- BAENA-GONZALEZ, E. AND ARO, E.-M. (2002) Biogenesis, assembly and turnover of photosystem II subunits. - *Philosophical Transactions B*, 357, 1451-1460.
- BAILISS, K.W. (1970). Infection of cucumber cotyledons by cucumber mosaic virus and the participation of the chlorophyllase in the development of chlorotic lesions. *Ann. Bot.* 34: 647-655.
- BALACHANDRAN, S., OSMOND, B. C. (1994a). Susceptibility of tobacco leaves to photoinhibition following infection with two strains of tobacco mosaic virus under different light and nitrogen nutrition regimes. *Plant Physiol.* 104: 1051-1057.
- BALACHANDRAN, S., HULL, R.J., MARTINS, R.A., VOODIA, Y., LUCAS, W.J. (1997a). Influence of environmental stress on biomass partitioning in transgenic tobacco plants expressing the movement protein of tobacco mosaic virus. *Plant Physiol.* 114: 475-481.
- BALACHANDRAN, S., OSMOND, B. C., DALEY, F. P. (1994b). Diagnosis of the Earliest Strain-Specific Interactions between Tobacco Mosaic Virus and Chloroplasts of Tobacco Leaves in vivo by Means of Chlorophyll Fluorescence Imaging. *Plant Physiol.* 104: 1059-1065.
- BALACHANDRAN, S. HURRY, V. M. KELLEY, S. E. OSMOND, C. B. ROBINSON, S. A. ROHOZINSKI, J. SEATON, G. G. R. SIMS, D. A. (1997b). Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants from the perspective of photosynthesis. *Physiol. Plant.* 100: 203-213.
- BALSERA M, ARELLANO J B, GUTIÉRREZ J. R, HEREDIA P, REVUELTA J. L, DE LAS RIVAS J. (2003). Structural analysis of the PsbQ protein of photosystem II by Fourier transform infrared and circular dichroic spectroscopy and by bioinformatic methods. *Biochemistry* 42: 1000-1007.
- BANERJEE, N. WANG, J. Y. AND ZAITLIN, M. (1995). A single nucleotide change in the coat protein gene of tobacco mosaic virus is involved in the induction of severe chlorosis. *Virology.* 207: 234-239.
- BARAK, S., NEJIDAT, A., HEIMER, Y., VOLOITA, M. (2001). Transcriptional and post-transcriptional regulation of the glycolate oxidase gene in tobacco seedlings. *Plant Mol. Biol.* 45 (4): 399-407.

- BARBATO R, FRISO G, PONTICOS M, BARBER J. (1995). Characterization of the light-induced cross-linking of the  $\alpha$ -subunit of Cytochrome b559 and the D1 protein in isolated Photosystem II reaction centers. *J. Biol. Chem.* 270: 24032-24037.
- BARBER, J., NIELD, J., MORRIS, E.P., ZHELEVA, D., HANKAMER, B. (1997). The structure, function and dynamics of photosystem II. *Physiol. Plant.* 100: 817-827.
- BARBER, J., KÜHLBRANDT, W. (1999). Photosystem II. *Curr. Op. Struct. Biol.* 9: 469-475.
- BARBER, J. (2002a). Photosystem II: a multisubunit membrane protein that oxidises water. *Curr. Op. Struct. Biol.* 12: 523-530.
- BARBER, J. (2002b). P680: what is it and where is it?. *Bioelectrochem.* 55: 135-138.
- BARÓN, M., RAHOUEI, J., LÁZARO, J.J., GARCÍA-LUQUE, I. (1995). PSII response to biotic and abiotic stress. *Photosynthesis: from light to biosphere. Vol IV: 897-900.* P. Mathis (Ed.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- BARTER, L.M., DURRANT, F.R., KLUG, D.R. (2003). A quantitative structure-function relationship for the photosystem II reaction center: Supramolecular behavior in natural photosynthesis. *PNAS* 100 (3): 946-51.
- BEACHY, R.N., ZAITLIN, M. (1975). Replication of tobacco mosaic virus, VI Replicative intermediate and TMV-RNA-related RNAs associated with polyribosomes. *Virology* 63 (1): 84-97.
- BEDBROOK, J.R., MATHEWS, R.E.F. (1973). Changes in the flow of early products of photosynthetic carbon fixation associated with the replication of TYMV. *Virology* 53: 84-91.
- BEIER, H., BARCISZEWSKA, M., KRUPP, G., MITNACHT, R., GROSS, H.J. (1984). UAG readthrough during TMV RNA translation isolation and sequence of two tRNA<sup>Tyr</sup> with suppressor activity from tobacco plants. *The EMBO J.* 3: 351-356.
- BENDAHMANE, M., SZÉCSI, J., CHEN, I., BERG, R. H., BEACHY, R.N. (2002). Characterization of mutant tobacco mosaic virus coat protein that interferes with virus cell-to-cell movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 3645-3650.
- BERNIER, M., CARPENTER, R. (1995). The action of mercury on the binding of the extrinsic polypeptides associated with the water oxidizing complex of PSII. *FEBS Lett.* 360 (3): 251-254.
- BERTHOLD, D.A., BABCOCK, G.T., YOCUM, C.A. (1981). A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS Lett.* 134: 231-234.

- BERZAL-HERRANZ, A., DE LA CRUZ, A., TENLLADO, F., DÍAZ-RUIZ, J.R., LÓPEZ, L., SANZ, A.I., VAQUERO, C., SERRA, M.T., GARCÍA-LUQUE, I. (1995). The *Capsicum* L<sup>3</sup> gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. *Virology* 209: 498-505.
- BETTS, S.D., ROSS, J.R., PICHESKY, E., YOCUM, C.F. (1997). Mutation Val235Ala weakens binding of the 33-kDa manganese stabilizing protein of photosystem II to one of two sites. *Biochemistry* 36 (13): 4047-4053.
- BETTS, S.D., LYDAKIS-SIMANTIRIS, N. ROSS, J.R., YOCUM, C.F. (1998). The carboxyl-terminal tripeptide of the manganese-stabilizing protein is required for quantitative assembly into photosystem II and for high rates of oxygen evolution activity. *Biochemistry* 37 (40): 14230-14236.
- BILGER, W., BJÖRKMAN, O. (1990). Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 25: 173-186.
- BILLETTER, M.A., WISSMAN, C., WARNER, R.C. (1966). Replication of double stranded RNA from *Escherichia coli* infected with bacteriophage MS2. *J. Mol. Biol.* 17: 145-173.
- BJÖRKMAN, O., DEMMING, B. (1987). Photon yield of O<sub>2</sub>-evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504.
- BRICKER, T.M., ODOM, W.R., QUEIROLO, C.B. (1988). Close association of the 33 kDa extrinsic protein with the apoprotein of CPa-1 in Photosystem II. *FEBS Lett.* 231: 111-117.
- BRICKER, T.M. (1990). The structure and function of CPa-1 and CPa-2 in photosystem II. *Photosynth. Res.* 24:1-13
- BRICKER, T.M., FRANKEL, L.K. (1998). The structure and function of the 33 kDa extrinsic protein of Photosystem II: A critical assesment. *Photosynth. Res.* 56: 157-173.
- BRO E., MEYER, S., GENTY, B. (1996). Heterogeneity of leaf CO<sub>2</sub> assimilation during photosynthetic induction. *Plant Cell Environ.* 19: 1349-1358. Fe de erratas en *Plant Cell Environ.* 20: 275-276.
- BRUCE, B.D. (2000). Chloroplast transit peptides: structure, funtion and evolution. *Trends Cell Biol.* 10: 440-447.
- BRUCE, B.D. (2001). The paradox of plastid transit peptides: conservation of functon despite divergence in primary structure. *Biocim. Biophys. Acta* 1541: 2-21.

- BUKHOV, N.G., HEBER, U. SHUVALOV, V.A. (2001). Energy dissipation in photosynthesis: Does the quenching of chlorophyll fluorescence originate from antenna complexes of photosystem II or from the reaction center. *Planta* 212: 749-758.
- BURDA, K., SCHMID, G.D. (2001). Heterogeneity of the mechanisms of water splitting in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1506: 47-54.
- BUSCHMANN, C., LICHTENTHALER, K. (1998). Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants. *J Plant Physiol* 152: 297-314.
- CAMPBELL, K.A., GREGOR, W., PHAM, D.P., PELOQUIN, J.M., DEBUS, R.J., BRITT, R.D. (1998). The 23 and 17 kDa extrinsic proteins of photosystem II modulate the magnetic properties of the S<sub>1</sub>-state manganese cluster. *Biochemistry* 37: 5039-5045.
- CARDON, Z.G., MOTT, K.A, BERRY, J.A. (1994). Dynamics of patchy stomatal movements, and their contribution to steady-state and oscillating stomatal conductance calculated using gas-exchange techniques. *Plant Cell and Environ.* 17: 995-1007.
- CHAERLE, L., VAN CAENEGHEM, W., MESSENS, E., LAMBERS, H., VAN MONTAGU, M., VAN DER STRAETEN, D. (1999). Presymptomatic visualization of plant-virus interactions by thermography. *Nature Biotech.* 17: 813-16.
- CHAERLE L., VAN DER STRAETEN, D. (2000). Technical focus: imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends in Plant Science* 5: 495-503.
- CHAERLE, L., VAN DER STRAETEN, D., (2001). Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health. *Biochim. Biophys. Acta* 1519: 153-166.
- CHAERLE, L., VALCKE, R., VAN DER STRAETEN, D. (2002). Imaging techniques in plant physiology: from simple to multispectral approaches. *Adv. Plant Physiol.* 5: 135-155.
- CHENG, N.H., SU, C. L., CARTER, S.A., NELSON, R.S. (2000). Vascular invasion routes and systemic accumulation patterns of tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 23: 349-362.
- CHOU, H.M., BUNDOCK, N., ROLFE, A.S., SCHOLES, D.J. (2000). Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Mol. Plant Pathol.* 2 (1): 99-113.
- CISCATO, M., VALCKE, R. (1998). Chlorophyll fluorescence imaging of heavy metal treated plants. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, Ed. Garab G. (Kluwer Ac.), IV, 2661-2663.

- CISCATO, M., VANGRONSVELD, J., VALCKE, R. (1999). Effects of heavy metals on the fast chlorophyll fluorescence induction kinetics of photosystem II: a comparative study. *Z. Naturforsch C.* 54: 735-739.
- CISCATO, M., SOWINSKA, M., VANDE VEN, M., HEISEL, F., DECKERS, T., BONANY, J., VALCKE R. (2000). Fluorescence imaging as a diagnostic tool to detect physiological disorders during storage of apples. *Acta Hort.*, 553, 507-512
- CLINE, K., ETTINGER, W., THEG, S.M. (1992). Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two luminal proteins are transported in the absence of ATP. *J Biol Chem.* 267: 2688-2696.
- COLE JL, YACHANDZA VK, MCDERMOTT AE, GUILLES RD, BRITT RD. 1987. Structure of the manganese complex of photosystem II upon removal of the 33 kDa extrinsic protein. An X-ray absorption study. *Biochemistry* 26:5967-73
- CONTI, G.G., VEGETTI, G., BASSI, M., FAVALI, M.A. (1972). Some structural and cytochemical observations on chinese cabbage leaves infected with cauliflower mosaic virus. *Virology* 47: 649-700.
- CORRUZI, G., BROGLIE, R., CASHMORE, A., CHUA, N.H. (1983). Nucleotide sequences of tow pea cDNA clones encoding the small subunit of ribulose 1,5-biphosphate carboxilase and the major chlorophyll a/b-binding thylakoid polypeptide. *J. Biol. Chem.* 258: 1399-1402.
- CREIGHTON, A.M., HULFORD, A., MANT, A., ROBINSON, D., ROBINSON, C. (1995). A monomeric, tightly folded stroma intermediate on the  $\Delta$ pH dependent thylacoidal protein transport pathway. *J. Biol. Chem.* 270 (4): 1663-1669.
- CRITCHLEY, C., RUSSEL, A.W. (1994). Photoinhibition of photosynthesis in vivo: The role of protein turnover in photosystem II. *Physiol. Plant.* 92: 188-196.
- CRITCHLEY, C.H. (1997). The structure and Function of Photosystem II. *Handbook of Photosynthesis*, Cap. 14, (Pessarakli, M.Ed.): 231-239. New York-Basel-Hong Kong.
- CROFTS, A.R., YERKES, C.T. (1994). A molecular mechanism for q<sub>E</sub>-quenching *FEBS Lett.* 352: 265-270.
- DAWSON, W.O., LEHTOK, M. (1990). Regulation of tobamovirus gen expression. *Adv. Virus Res.* 38: 307-342.
- DAWSON, O.W. (1992). Tobamovirus-Plant Interactions. *Virology.* 186: 359-367.
- DARDICK, C.D., TARAPOREWALA, Z., LU, B., CULVER, J.N. (1999). Comparison of tobamovirus coat protein structural features that affect elicitor activity in pepper, eggplant, and tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 247-251.



- DE VITRY, C., OLIVE, J., DRAPIER, D., RECOUVREUR, M., WOLLMAN, F.A. (1989). Post-translational events leading to the assembly of photosystem II protein complex: A study using photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 109: 991-1006
- DEBUS, R.J. (1992). The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta.* 1102: 269-352.
- DE LA CRUZ, A., LÓPEZ, L., TENLLADO, F., DÍAZ-RUIZ, J.R., SANZ, A.I., VAQUERO, C., SERRA, M.T., GARCÍA-LUQUE, I. (1997). The coat protein is required for the elicitation of the *Capsicum L<sup>2</sup>* gene-mediated resistance against tobamoviruses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10, 107-113.
- DE LAS RIVAS J, HEREDIA P. (1999). Structural predictions on the 33 kDa extrinsic protein associated to the oxygen evolving complex of photosynthetic organisms. *Photosynthesis Research* 61(1): 11-21.
- DEMMIG-ADAMS, B.Y., ADAMS, W.W.III (1992). Photoprotection and other responses of plants to light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 43: 599-626.
- DU, L.F., LIU, H., LIANG, H.G. (2001) Thermal unfolding of the manganese stabilizing 33 kD protein photosystem II: implications for a molten globular state. PS2001. Proceeding CSIRO Publishing.
- DUNCAN, J.L., NIELD J., BARBER J. (2001). Structural characterisation of the photosystem two reaction centre from *Synechococcus elongatus* using electron microscopy and single particle analysis. PS 2001 *Proceeding CSIRO Publishing*.
- EISENBERG-DOMOVICH, Y., OELMÜELLER, R., HERRMANN, G.R. OHAD, I. (1995). Role of the RCII-D1 protein in the reversible association of the oxygen-evolving complex proteins with the luminal side of photosystem II. *J. Biol. Chem.* 270 (50): 30181-30186.
- EMANUELSON, O., NIELSEN, H., BRUNA, K.J., vonHEIJNE, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300: 1005-1016.
- ENAMI, I., TOMO, T., KITAMURA, M., KATOH, S. (1994). Immobilization of the three extrinsic proteins in spinach oxygen-evolving photosystem II membranes: roles of the proteins in stabilization of binding of Mn and Ca<sup>2+</sup>. *Biochim. Biophys. Acta* 1185: 75-80.
- ENAMI, I., TOHRI, A., KAMO, M., OHTA, H., SHEN, J.R. (1997). Identification of domains on the 43 kDa chlorophyll-carrying protein (CP43) that are shielded from

- tryptic attack by binding of the extrinsic 33 kDa protein with photosystem II complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1320 (1): 17-26.
- FENTON, M. J., CROFTS, R.A. (1990). Computer aided fluorescence imaging of photosynthetic systems: Application of video imaging to the study of fluorescence induction in green plants and photosynthetic bacteria. *Photosynth. Res.* 26: 59-66.
- FORD, R.C., EVANS, M.C.W. (1983). Isolation of a PSII preparation from higher plants with highly enriched oxygen-evolution activity. *FEBS Lett.* 160: 159-164.
- FÖSTER, B., OSMOND, C.B., BOYNTON, J.E. (2001). Very high light resistant mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* responses of Photosystem II, nonphotochemical quenching and xanthophyll pigments to light and CO<sub>2</sub>. *Photosyn. Res.* 67: 5-15.
- FRANKEL, L.K., BRICKER, T.M. (1995). Interaction of the 33-kDa extrinsic protein with photosystem II: identification of domain on the 33-kDa protein that are shielded from NHS-biotinylation by photosystem II. *Biochemistry* 34 (22): 7492-7497.
- FUKS, B., SCHNELL, J.D. (1997). Mechanisms of protein transport across the chloroplast envelope. *Plant Physiol.* 114: 405-410.
- FUNAYAMA, S., HIKOSAKA, K., YAHARA, T. (1997a). Effects of virus infection and growth irradiance on fitness components and photosynthetic properties of *Eupatorium makinoi* (Compositae). *American J. Botany* 84: 823-839.
- FUNAYAMA, S., SONOIKE, K., TERASHIMA, I. (1997b). Photosynthetic properties of leaves of *Eupatorium makinoi* infected by a geminivirus. *Photosynthesis Research* 53: 253-261.
- GALLIE, D.R., WALBOT, V. (1992). Identification of the motifs within the TMV 5' leader responsible for enhancing translation. *Nuc. Acid Res.* 20: 4631-4638.
- GALLIE, D.R. (1996). Translational control of cellular and viral mRNA. *Plant Mol. Biol.* 32: 145-158.
- GARCÍA-LUQUE, I., FERRERO, M.L., RODRÍGUEZ, J.M., ALONSO, E., DE LA CRUZ, A., SANZ, A.I., VAQUERO, C., SERRA, M.T., DÍAZ-RUÍZ, J.R. (1993) The nucleotide sequence of the coat protein genes and 3' non-coding regions of two resistance-breaking tobamoviruses in pepper shows that they are different viruses. *Archiv Virol.* 131: 75-88.
- GARCÍA-LUQUE, I., SERRA, M.T., ALONSO, E., WICKE, B., FERRERO, M.L., DÍAZ-RUÍZ, J.R. (1990). Characterization of a Spanish strain of pepper mild mottle virus (PMMoV-S) and its relationships to other tobamoviruses. *J. Phytopathol.* 129: 1-8.

- GAVEL, Y., VON HEIJNEN G. (1990). A conserved cleavage-site motif in chloroplast transit peptides. *FEBS Lett.* 261: 455-458.
- GENTY, B., BRIANTAIS, J.-M., BAKER, R.N. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta.* 990: 87-92.
- GILMORE, A.M., MOHANTY, N., YAMAMOTO, H.Y. (1994). Epoxidation of zeaxanthin and antheraxanthin reverses non-photochemical quenching of photosystem II chlorophyll a fluorescence in the presence of trans-thylakoid  $\Delta$ pH. *FEBS Lett* 350: 271-274.
- GIRALDI, P., GARCÍA-LUQUE, I., SERRA, M.T. (1998). Pepper mild mottle virus coat protein alone can elicit the *Capsicum* spp. L<sup>3</sup> gene-mediated resistance. *Mol. Plant Microb Interac.* 11: 1253-1257.
- GILARDI, P., WICKE, B., CASTILLO, S., DE LA CRUZ, A., SERRA, M.T., GARCÍA-LUQUE, I. (1999). Resistance in *Capsicum* spp. against the tobamoviruses. In: *Recent Research Developments in Virology 1*. pp. 547-558. S.G. Pandalai, ed. Transworld Research Network. India.
- GILARDI, P. (2000). Análisis de los inductores virales de la resistencia frente a los tobamovirus en el género *Capsicum*. Tesis doctoral. UCM.
- GILLESPIE, T., BOEVINK, P., HAUPT, S., ROBERTS, A. G., TOTH, R., VALENTINE, T., CHAPMAN, S., OPARKA K. J. (2002). Functional analysis of a DNA-shuffled movement protein reveals that microtubules are dispensable for the cell-to-cell movement of tobacco mosaic virus. *Plant Cell*, 14: 1207-1222.
- GOLDBACH, R., WELLING, J. (1988). Evolution of plus-strand RNA viruses. *Intervirology* 29: 260-267.
- GOODMAN, R.N., KIRÁLY, Z., WOODS, R.K. (1986). *The biochemistry and physiology of plant disease*. Columbia: University Press.
- GORBALENYA, A.E., KOONIN, E.V. (1993) Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Op. Struct. Biol.* 3: 419-429.
- GÖRLACH, J., SCHMID, J., AMRHEIN, N. (1993). The 23 KDa Protein of the Oxygen-evolving Complex: a Multi-gene Family in Tomato. *Plant Cell Physiol.* 34 (3): 497-501.
- GROVER, M., GAUR, T., KOCHHAR, A., MAHESHWARI, S.C., TYAGI, A.K. (1999). Nucleotide sequence of *psbQ* gene for 16-kDa protein of oxygen-evolving complex from *Arabidopsis thaliana* and regulation of its expression. *DNA Res.* 6 (3): 173-177.

- GRUSZECKI, W.I., KERNEN, P., KRUPA, Z., STRASSER, R.J. (1994). Involvement of xanthophyll pigments in regulation of light-driven excitation quenching in light-harvesting complex of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1188: 235-242.
- GRUDZINSKI, W., KRUPA, Z., GARSTKA, M., MAKSYMIEC, W., SWARTZ, T.E., GRUSZECKI, W.I. (2002). Conformation rearrangements in light harvesting complex II accompanying light-induced chlorophyll a fluorescence quenching. *Biochim. Biophys. Acta* 1554: 108-117.
- GUNASINGHE, U. B. AND BERGER, P. H. (1991). Association of Potato Virus and Gene Products with Chloroplasts in Tobacco. *Mol. Plant - Microbe Interac.* 4 (5): 452-457.
- HAGIWARA, K., ICHIKI, T., OGAWA, U.Y., OMURA, T., AND TSUDA, S. (2002). A single amino acid substitution in 126-kDa protein of *Pepper mild mottle virus* associates with symptom attenuation in pepper; the complete nucleotide sequence of an attenuated strain, C-1421. *Arch Virol.* 147: 833-840.
- HANKAMER, B., BARBER, J., BOEKEMA, E.J. (1997). Higher plant PSII structure and membrane organization. *Annu. Rev. Plant Phys. Mol. Biol.* 48: 641-671.
- HANKAMER, B., MORRIS, E., NIELD, J., CARNE, A., BARBER, J. (2001a). Subunit positioning and transmembrane helix organisation in the core dimer of photosystem II. *FEBS Lett.* 504: 142-151.
- HANKAMER, B., MORRIS, E., NIELD, J., GERLE, C., BARBER, J. (2001b). Three dimensional structure of the photosystem II core dimer of higher plants determined by electron microscopy. *J. Struc. Biol.* 135: 262-269.
- HARRISON, E.P., WILLIGHAM, N.M., LLOYD, J.C., RAINES, C.A. (1998). Reduced pseudoheptulose-1,7-bisphosphatase levels in transgenic tobacco lead to decreased photosynthetic capacity and altered carbohydrate accumulation. *Planta* 204: 27-36.
- HASHIMOTO, A., YAMAMOTO, Y., THEG, M.S. (1996). Unassembled subunits of the photosynthetic oxygen-evolving complex present in the thylakoid lumen are long-lived and assembly-competent. *FEBS Lett.* 391: 29-34.
- HAVELDA, Z., MAULE, A.J. (2000). Complex spatial responses to cucumber mosaic virus infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons. *The Plant Cell* 12: 1975-1985.
- HEATHCOTE, P., FYLE, P.K., JONES, M.R. (2002). Reaction centers: the structure and evolution of biological solar power. *Trends Biochem. Sci.* 27 (2): 79-87.
- HELMS, K., WARDLAW, I.F. (1977). Effect of temperature on symptoms of tobacco mosaic virus of photosynthate in *Nicotiana glutinosa*. *Phytopathology* 67: 344-350.

- HELSEL, F., SOWINSKA, M., MIEHE, J.A., LANG, M., LICHGENTHALER, H.M. (1996). Detection of nutrient deficiencies of maize by laser induced fluorescence imaging. *J. Plant Physiol.* 148: 622-631.
- HENMI, T., ENEMOTO, K., YAMAMOTO, Y. (2001). Degradation of OEC33 during strong illumination of the PSII: possible participation of reactive oxygen species generated at the luminal side of PSII. PS2001. Proceeding CSIRO Publishing.
- HENRY, R., KAPAZOGLU, A., McCAFFREY, M., CLINE, K. (1994). Differences between lumen targeting domains of chloroplast transit peptides determine pathway specificity for thylakoid transport. *J Biol Chem.* 269: 10189-10192.
- HENRY, R., CARRIGAN, M., McCAFFERY, M., MA, X., CLINE, K. (1997). Targeting determinants and proposed evolutionary basis for the Sec and  $\Delta$ pH protein transport systems in chloroplast thylakoid membranes. *J. Cell Biol.* 136 (4): 823-832.
- HERBERS, K., TAKAHATA, Y., MELZER, M., MOCK, H.P., HAJIREZAEI, M., SONNEWALD, U. (2000). Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Mol. Plant Pathol.* 7 (1): 51-59.
- HERRANEN, M., ARO, E.M., TYYSTJARVI, T. (2001). Two distinct mechanisms regulate the transcription of photosystem II genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Physiol. Plant.* 112 (4): 531-539.
- HIGGINS D., THOMPSON J., GIBSON T., THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- HILL, R., BENDALL, F. (1960). Function of two cytochrome components in chloroplasts: A working hypothesis. *Nature* 186: 136-137.
- HIRASHIMA, K., WATANABE, Y. (2001). Tobamovirus replicase coding region is involved in cell-to-cell movement. *J. Virol.* 75, 8831-8836.
- HODGSON A. J. R. BEACHY, N. R. PAKRASI, H. (1989). Selective inhibition of photosystem II in spinach by tobacco mosaic virus: an effect of the viral coat protein. *FEBS Lett* 245: 267-270.
- HOLT, C.A., BEACHY, R.N. (1991). *In vitro* compartmentation of infection transcripts from mutant tobacco mosaic virus cDNAs in transgenic plants. *Virology* 181: 109-117.
- HOMANN, P.H. (2002). Chloride and calcium in Photosystem II: from effects to enigma. *Photosynth. Res.* 73: 169-175.

- HORTON, P., RUBAN, A.V., WALTERS, R.G. (1994). Regulation of Light Harvesting in Green Plants (Indication by Nonphotochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence). *Plant Physiol.* 106: 415-420.
- HORVÁTH, G., ARELLANO, J.B., DROPPA, M., BARÓN, M. (1998). Alterations in photosystem II electron transport as revealed by thermoluminescence of Cu-poisoned chloroplasts. *Photosynth. Res.* 57: 175-182.
- HUA, S.B., DUBE, S.K., BARNETT, N.M., KUNG, S.D. (1989). Polymorphism and mendelian inheritance of photosystem II 23-kilodalton polypeptide. *Planta* 179: 397-402.
- HUA, S.B., DUBE, S.K., BARNETT, N.M., KUNG, S.D. (1991a). Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding 23 kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II in tobacco, *Nicotiana tabacum* L. *Plant Mol. Biol.* 16 (4): 749-750.
- HUA, S.B., DUBE, S.K., BARNETT, N.M., KUNG, S.D. (1991b). Nucleotide sequence of gene *oe2-A* and its cDNA encoding 23 kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 17: 551-553.
- HUA, S.B., DUBE, S.K., BARNETT, N.M., KUNG, S.D. (1992). Photosystem II 23 kDa polypeptide of oxygen-evolving complex is encoded by a multigene family in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 18: 997-999.
- HUA, S.B., DUBE, K.S., KUNG, S.D. (1993). Molecular evolutionary of the psbP gene family of the photosystem II oxygen-evolving complex in *Nicotiana*. *Genome.* 36: 483-488.
- HULFORD, A., HAZELL, L., MOULD, M.R., ROBINSON, C. (1994). Two distinct mechanisms for the translocation of proteins across the thylakoid membrane, one requiring the presence of a stromal protein factor and nucleotide triphosphates. *J. Biol. Chem.* 269 (5): 3251-3256.
- HULL, R. (2002). *Matthew's Plant Virology*. 4th ed. Academic Press.
- HUNTER, C. S. PEAT W. E. (1973). The effect of tomato aspermy virus on photosynthesis in the young tomato plant. *Physiol. Plant Path.* 3: 517-524.
- HUNTER, T.R., HUNT, T., KNOWLAND, J., ZIMMERH, D. (1976). Messenger RNA for the coat protein of TMV. *Nature* 260: 759-764.
- HUYBRECHTS, C., DECKERS, T. VALCKE, R. (2002). Predicting fruit quality and maturity of apples by fluorescence imaging: effect of ethylene and AVG. *Acta Hort.*, in press.
- HUYBRECHTS, C., DECKERS, T., VALCKE, R. (2003). Assessing apple quality and storage capability by means of fluorescence imaging. *Acta Hort.*, in press.

- IFUKU, K., NAKATU, T., KATO, H., SATO, F. (2001). The extrinsic 18kDa protein in PSII restores the ion-retention activity of a mutant extrinsic 23 kDa protein lacking 19 amino-acid residues on the amino terminus. PS2001. Proceeding CSIRO Publishing.
- IFUKU, K., SATO, F. (2001). Importance of the N-terminal sequence of the extrinsic 23 kDa polypeptide in photosystem II in ion retention in oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta* 1546: 196-204.
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- ISHIKAWA, M., MESHI, T., MOTOYOSHI, F., TAKAMATSU, N., OKADA, Y. (1986). *In vitro* mutagenesis of the putative replicase genes of TMV. *Nucleic Acid Res.* 14: 8291-8305.
- ISHIKAWA, M., MESHI, T., MOTOYOSHI, F., TAKAMATSU, N., OKADA, Y. (1991). Specific cessation of minus-strand RNA accumulation at an early stage of tobacco mosaic virus infection. *J. Virol.* 65: 861-868.
- JAIN, P.K., KOCHHAR, A., KHURANA, J.P., TYAGI, AK. (1998). The *psbO* gene for 33-kDa precursor polypeptide of oxygen-evolving complex in *Arabidopsis thaliana* nucleotide sequence and control of its expression. *DNA Res.* 5 (4): 221-228.
- JANSEN T, ROTHER C, STEPPUHN J, REINKE H, BEYREUTHER K, JANNSON C, ANDERSSON B, HERRMANN RG. (1987). Nucleotide sequence of cDNA clones encoding the complete 23-kDa and 16-kDa precursor proteins associated with the photosynthetic oxygen evolving complex from spinach. *FEBS Lett.* 216:234-40
- JARVIS , P., SOLL, J. (2002). Toc, Tic, and chloroplast protein import. *Biochim. Biophys. Acta* 1590: 177-189.
- JIN, E., POLLE, J.E.W., MELIS, A. (2001). Involvement of zeaxanthin and of the Cbr protein in the repair of photosystem II from photoinhibition in the green alga *Dunaliella salina*. *Biochim. Biophys. Acta* 1506: 244-259.
- JOHNSON, G.N., YOUNG, A.J., HORTON, P. (1994). Activation of non-photochemical quenching in thylakoids and leaves. *Planta* 194: 550-556.
- JOLIOT, P., JOLIOT, A. (1968). Polarographic method for detection of O<sub>2</sub> production and reduction of Hill reagent by isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 153: 625-634.
- KAMIYA, N., SHEN, J.R. (2003). Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3,7 Å resolution. *PNAS* 100 (1): 98-103.
- KAPER, J.M., GEELEN, J.L.M.C. (1971). Studies on stabilizing forces of simple RNA viruses II. Stability, dissociation and reassembly of CMV. *J. Mol. Biol.* 56: 227-294.



- KASTEN, B., BUCK, F., NUSKE, J. (1997). Cytokinin affects nuclear- and plastome-encoded energy-converting plastid enzymes. *Planta*. 201: 261-272.
- KAUTSKY, H., HIRSCH A. (1931). Neue Versuche zur Kohlenstoffassimilation. *Naturwissenschaften*. 19: 964-971.
- KENTARO, I., FUMIHIKO, S. (2001). Importance of the N-terminal sequence of the extrinsic 23 kDa polypeptide on photosystem II in ion retention in oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta* 1546: 196-204.
- KIESELBACH, T., HAGMAN, Å., ANDERSSON, B., SCHRÖDER, W.P. (1998). The thylakoid lumen of chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 273 (12): 6710-6716.
- KIESELBACH, T., BYSTEDT, M., HYND, P., ROBINSON C., SCHRÖDER, W. (2000). A peroxidase homologue and novel plastocyanin located by proteomics to the *Arabidopsis* chloroplast thylakoid lumen. *FEBS Letts.* 480: 271-276.
- KLEGAN, A.L., BUCHANAN, B.B. (1988). Powdery mildew infection alters fructose-2,6-bisphosphate content and sucrose to starch ratio in leaves of wheat plants actively forming grain. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32: 221-227.
- KLÖSGEN, R.B., BROCK, I.W., HERRMANN, R.G., ROBINSON, C. (1992). Proton gradient-driven import of the 16 kDa oxygen-evolving complex protein as the full precursor protein by isolated thylakoids. *Plant Mol Biol.* 18: 1031-1034.
- KNORR, D.A., DAWSON, W.O. (1988). A point mutation in the TMV capsid protein gene induces hypersensitivity in *Nicotiana sylvestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 170-174.
- KOCHHAR, A., KHURANA, J.P., TYAGI, A.K. (1996). Nucleotide sequence of the *psbP* gene encoding precursor of 23-kDa polypeptide of oxygen-evolving complex in *Arabidopsis thaliana* and its expression in the wild-type and a constitutively photomorphogenic mutant. *DNA Res.* 3 (5): 277-285.
- KOIWA, H., KOJIMA, M., YOSHIDA, Y. (1989). Ultrastructural observations on chloroplasts in tomato plants infected with virulent or attenuated strain (L11A) of tobacco mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55: 41-48.
- KOIWA, H., KOJIMA, M., IKEDA, T., YOSHIDA, Y. (1992). Fluctuations of particles on chloroplast thylakoid membranes in tomato plants infected with virulent or attenuated strain of tobacco mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 58: 58-64.
- KOK, B. FORBUSH B., MCGLLOIN M. (1970). Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution. A linear four step mechanism. *Photochem. Photobiol.* 11: 457-475.
- KOZLOV, Y.N., KLIMOV, V.V. (1998). Possible relationship of mechanisms of Mn<sup>2+</sup> oxidation and formation of plant photosystem II manganese cluster. *Membr. Cell Biol.* 12 (5): 585-591.



- KUNG, S.D., ZHU, Y.S., SHEN, G.F. (1982). *Nicotiana* chloroplast genome III. Chloroplast genome evolution. *Theor. Appl. Genet.* 61: 73-79.
- KUWABARA, T., MURATA N. (1983). Quantitative analysis of the inactivation of photosynthetic oxygen evolution and the release of polypeptides and manganese in photosystem II particles of spinach chloroplasts. *Plant CellPhysiol.* 24: 741-747.
- KUWABARA, T., MURATA, T., MIYAO, M., MURATA, N. (1986). Partial degradation of the 18-kDa protein of the photosynthetic oxygen-evolving complex: a study of a binding-site. *Biochim. Biophys. Acta* 850:146-55
- KUWABARA, T., MURATA, T., MIYAO, M., MURATA, N. (1987). Proline rich structure at amino-terminal region of the 18 kDa protein of photosynthetic oxygen evolving complex. In *Progress in Photosynthesis Research*, ed. N Murata, Vol. 1, pp. 705-708. The Netherlands: Kluwer
- KUWUBARA, T., SUZUKI, K. (1995). Reversible changes in conformation of the 23 kDa protein of PSII and their relationships to the susceptibility of the protein to a proteinase from PSII membranes. *Plant Cell Physiol.* 36 (3): 495-504.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LANG, M., LICHTENTHALER, K.H., SOWINSKA, M. (1996). Fluorescence imaging of water and temperature stress in plant leaves. *J. Plant Physiol.* 148: 613-621.
- LEAL, N., LASTRA, R. (1984). Altered metabolism of tomato plants infected with tomato yellow mosaic virus. *Physiol. Plant Path.* 24: 1-7.
- LI, H., SHERMAN, L.A. (2000). A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 182 (15): 4268-4277.
- LICHTENTHALER, H.K. (1996). Vegetation stress: an introduction to the stress concept plants. *J. Plant Physiol.* 148: 4-14.
- LICHTENTHALER, H.K., LANG, M., SOWINSKA, M., HEISEL, F., MIEHÉ, J.A. (1996). Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *J. Plant. Physiol.* 148: 599-612.
- LICHTENTHALER, H.K., LANG, M., SOWINSKA, M., SUMM, P., HEISEL, F., MIEHE, J.A. (1997). Uptake of the herbicide diuron as visualised by the fluorescence imaging technique. *Bot. Acta* 110: 158-163.
- LICHTENTHALER, H.K., MIEHE, J.A. (1997). Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Sci.* 2 (8): 316-320.

- LICHTENTHALER, K.H., BABANI, F. (2000). Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 889-895.
- LICHTENTHALER, H.K., BABANI, F., LANGSDORF, G., BUSCHMANN, C. (2000). Measurement of differences in red chlorophyll fluorescence and photosynthetic activity between sun and shade leaves by fluorescence imaging. *Photosynthetica* 38 (4): 521-529.
- LINDBECK, A. G. C. DAWSON, W. O., THOMSON, W. W. (1991). Coat protein-related polypeptides from in vitro tobacco mosaic virus coat protein mutants do not accumulate in the chloroplasts of directly inoculated leaves. *Mol. Plant-Microbe Inter.* 4 (1): 89-94.
- LJUNGBERG, U, ÅKERLUND, H.E., LARSSON, C., ANDERSSON, B. (1984). Identification of polypeptides associated with the 23 and 33 kDa proteins of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta* 767: 145-152
- LJUNGBERG, U., HENRYSSON, T., ROCHESTER, C.P., ÅKERLUND, H.E., ANDERSSON, B. (1986). The presence of low molecular-weight polypeptides in spinach photosystem II core preparations. Isolation of a 5 kDa hydrophilic polypeptide. *Biochim. Biophys. Acta* 849: 112-120
- LOGEMAN, J., SCHELL, J., WILLMITZER, L. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. *Analytical Biochemistry.* 163: 16-20.
- LUCAS, W.J., OLESINSKI, A., HULL, R.J., HAUDENSHIELD, J.S., DEOM, C.M., BEACHY, R.N., WOLF, S. (1993). Influence of the tobacco mosaic virus 30-kDa movement protein on carbon metabolism and photosynthate partitioning in transgenic tobacco plants. *Planta* 190: 88-96.
- MACLACHLAN, D.J., NUGENT, J.H.A., BRATT, P.J., EVANS, M.C.W. (1994). The effects of calcium depletion on the O<sub>2</sub> evolving complex in spinach PSII: the S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> and S<sub>3</sub> states and the role of the 17 kDa and 23 kDa extrinsic polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1186: 186-200.
- MAYES SR, COOK KM, SELF SJ, ZHANG Z, BARBER J. 1991. Deletion of the gene encoding the PSII 33kDa protein from *Synechocystis* PCC 6803 does not inactivate water splitting but increases vulnerability to photoinhibition. *Biochim. Biophys. Acta* 1060:1-12
- MERKLE, T.H., KRENZ, M., WENNG, A., SCHÄFER, E. (1990). Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a gene encoding the 23kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex from mustard (*Sinapis alba* L.). *Plant Molecular Biology.* 14: 889-890.

- MEYER, S., GENTY B. (1998). Mapping intercellular CO<sub>2</sub> mole fraction (C<sub>i</sub>) in *Rosa rubiginosa* leaves fed with Abscisic acid by using chlorophyll fluorescence imaging. Significance of C<sub>i</sub> estimated from leaf gas exchange. *Plant Physiol* 116: 947-57.
- MEYER, S., GENTY B. (1999). Heterogeneous inhibition of photosynthesis over the leaf surface of *Rosa rubiginosa* L. during water stress and abscisic acid treatment: induction of a metabolic component by limitation of CO<sub>2</sub> diffusion. *Planta* 210: 126-131.
- MITCHELL, P. (1961). Coupling of fosforilation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*. 191: 144-148.
- MIURA, T., SHEN, J.R., TAKAHASHI, S., KAMO, M., NAKAMURA, E., OHTA, H., KAMEI, A., INOUE, Y., DOMAE, N., TAKIO, K., NAKAZATO, K., ENAMI, I. (1997). Identification of damoains on the extrinsic 33-kDa protein possibly involved in electrostatic interaction with photosystem II complex by means of chemical modifications. *J. Biol. Chem.* 272 (6): 3788-3798.
- MIYAO, M., MURATA, N. (1984). Role of the 33-kDa polypeptide in preserving Mn in the photosynthetic oxygen-evolution system and its replacement by chloride ions. *FEBS Lett.* 170 (2): 350-354.
- MIYAO, M., MURATA, N. (1985). The Cl<sup>-</sup> effect on photosynthetic oxygen evolution: Interaction of Cl<sup>-</sup> with 18-kDa, 24 kDa, and 33 kDa proteins. *FEBS Lett.* 180: 303-308.
- MIYAO, M., FUJIMURA, Y., MURATA, N. (1988). Partial degradation of the extrinsic 23-kDa protein of the Photosystem II complex of spinach. *Biochim. Biophys. Acta* 936: 465-474.
- MONTALBINI, P., LUPATTELLI, M. (1989). Effect of localizad and systemic tobacco mosaic virus infection on some photochemical and enzymatic activities of isolated tobacco chloroplasts. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34: 147-162.
- MORELAND, D.E. (1992). Research on biochemistry of herbicides: An historical overview. *Z.naturforsch.* 48 c, 121-131.
- MORI, H., CLINE, K. (2001). Post-translational protein translocation into thylakoids by the Sec and ΔpH-dependent pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1541: 80-90.
- MORI, H., CLINE, K. (2002). A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid ΔpH/Tat translocase. *J. Cell Biol.* 157 (2): 205-210.
- MOULD, R.M., ROBINSON, C. (1991). A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem.* 266: 12189-12193.

- MURAKAMI, R., IFUKU, K., TAKABAYASHI, A., SHIKANAI, T., ENDO, T., SATO, F. (2002). Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant with impair *psbO*, one of two genes encoding extrinsic 33 kDa proteins in PSII. FEBS Lett. 523: 138-142.
- MURATA, N., MIYAO, M. (1985). Extrinsic membrane proteins in the photosynthetic oxygen-evolving complex. Trends Biochem. Sci. 10: 122-124.
- NAIDU, R. A., KRISHNAN, M., RAMANAJAM, P., GNANAM, A., NAYUDU, M.V. (1984). Studies on peanut green mosaic virus infected peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaves. I. Photosynthesis and photochemical reactions. Physiological Plant Pathology. 25:181-190.
- NAIDU, R.A., KRISHNAN, M., NAYUDU, M.V., GNANAM, A. (1986). Studies on peanut green mosaic virus infected peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaves. III. Changes in the polypeptides of photosystem II particles. Physiol Mol Plant Pathol 29: 53-58.
- NEDBAL, L., TRTÍLEK, M., KAFTAN, D. (1999). Flash fluorescence induction: a novel method to study regulation of Photosystem II. J. Photochem. Photobiol. 48: 154-157.
- NEDBAL, L., SOUKUPOVÁ, J., KAFTAN, D., WHITMARSH, J., TRTILEK, M. (2000). Kinetic imaging of chlorophyll fluorescence using modulated light. Photosynth. Res. 66: 3-12.
- NEDBAL, L., SOUKUPOVÁ, J., WHITMARSH, J., TRTÍLER, M. (2000). Postharvest imaging of chlorophyll fluorescence from lemons can be used to predict fruit quality. Photosynthetica 38 (4): 571-579.
- NELSON R.S., VAN BEL, A.J.E. (1998). The mystery of virus trafficking into, through and out of the vascular system. Prog. Bot. 59: 476-533,
- NIELD, J., BALSERA, M., DE LAS RIVAS, J., BARBER, J. (2001). Fitting of a two domain model for PsbO into a 3D map of the PSII-LHCII supercomplex obtained by electron cryo-microscopy. PS2001. Proceeding CSIRO Publishing.
- NIELD, J., BALSERA, M., DE LAS RIVAS, J., BARBER, J. (2002). Three dimensional electron cryo-microscopy study of the extrinsic domains of the oxygen-evolving complex of spinach. J. Biol. Chem. 277 (17): 15006-15012.
- NIELD, J., KRUSE, O., RUPRECHT, J., da FONSECA, P., BÜCHEL, C., BARBER, J. (2000a). Three dimensional structure of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synochococcus elongatus* photosystem II complexes allows for comparison of their oxygen evolving complex organization. J. Biol. Chem. 275 (36): 27940-27946.
- NIELD, J., ORLOVA, E.V., MORRIS, E.P., GOWEN, B., VAN HEEL, M., BARBER, J. (2000b). 3D map of the plant photosystem II supercomplex obtained by cryoelectron microscopy and single particle analysis. Nat. Struct. Biol. 7 (1): 44-47.

- NIELSEN, V.S., MANT, A., KNOETZEL, J., MØLLER, B.L., ROBINSON, C. (1994). Import of barley photosystem I subunit N into the thylakoid lumen is mediated by a bipartite presequence lacking an intermediate processing site. Role of the delta pH in translocation across the thylakoid membrane. *J Biol Chem.* 269: 3762-3766.
- NILSON, H.E. (1995). Remote sensing and image analysis in plant pathology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 15: 489-527.
- NING, L.E., GERALD, E., EDWARDS, G., STROBEL, A., LARRY, S., DALEY, CALLIS, J.M. (1995). Imaging fluorometer to detect pathological and physiological changes in plants. *Applied Spectroscopy* 49 (10): 1381-1389.
- O'FARRELL, P.Z., GOODMAN, H.M., O'FARRELL, P.H. (1977). High resolution two dimensional of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12: 1133-1142.
- OGAWA, T., WATANABE, Y., MESHI, T., OKADA, Y. (1991). Transcomplementation of virus-encoded replicase components of TMV. *Virology* 185: 580-584.
- OJA, V., LAISK, A. (2000). Oxygen yield from single turnover flashes in leaves: non-photochemical excitation quenching and the number of active PSII. *Biochim. Biophys. Acta* 1460: 291-301.
- OLESINSKI, A.A., ALMON, E., NAVOT, N., PERL, A., GALUN, E., LUCAS, W.J., WOLF, S. (1996). Tissue-specific expression of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic potato plants alters plasmodesmal function and carbohydrate partitioning. *Plant Physiol.* 111 (2): 541-550.
- OMASA, K., SHIMAZAKI, K., AIGA, I., LARACHER, W., ONOE, M. (1987). Image analysis of chlorophyll fluorescence transients for diagnosing the photosynthetic system of attached leaves. *Plant Physiol.* 84: 748-752.
- ONO, T., INOUE, Y. (1985). S-state turnover in the O<sub>2</sub>-evolving system of CaCl<sub>2</sub>-washed photosystem II particles depleted of three peripheral proteins as measured by thermoluminescence Removal of 33 kDa protein inhibits S3 to S4 transition. *Biochim. Biophys. Acta.* 806: 331-340.
- OPARKA, K.J., SANTA CRUZ, S. (2000). The great escape: floem transport and unloading of macromolecules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 323-347.
- OSMAN, T.A., BUCK, K.W. (1996). Complete replication *in vitro* of tobacco mosaic virus RNA by a template-dependent, membrane-bound RNA polymerase. *J. Virol.* 70: 6227-34.
- OSMOND, C.B., AUSTIN, M.P. BERRY, J.A., BILLINGS, W.D., BOYER, J.S., DALEY, J.W.H., NOBEL, P.S., SMITH, S.D., WINNER, W.E. (1987). Stress physiology and the distribution of plants. *Bioscience* 37: 38-48.

- OSMOND, C.B., BERRY, J.A., BALACHANDRAN, S., BÜCHEM, OSMOND, C., DALEY, P.F., HODGSON, R.A.J. (1990). Potential consequence of virus infection for shade-sur acclimation in leaves. *Bot Acta*. 103: 226-229.
- OSMOND, B., SCHWARTZ, O., GUNNING, B. (1999). Photoinhibitory printing on leaves, visualised by chlorophyll fluorescence imaging and confocal microscopy, is due to diminished fluorescence from grana. *Aust J Plant Physiol*. 26: 717-724.
- OXBOROUGH, K., BAKER, N.R. (1997a). An instrument capable of imaging chlorophyll-alpha fluorescence from intact leaves at very-low irradiance and at cellular and subcellular levels of organization. *Plant Cell Environ*. 20: 1473-1483.
- OXBOROUGH, K., BAKER, N.R. (1997b). Resolving chlorophyll-a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components-calculation of qP and Fv/Fm without measuring F0. *Photosynth. Res*. 54: 135-142.
- PAZOS, F., HEREDIA, P., VALENCIA, A., DE LAS RIVAS, J. (2001). Threading structural model of the manganese-stabilizing protein PsbO reveals presence of two possible beta-sandwich domains. *Proteins* 45 (4): 372-381.
- PELTIER, J.B., FRISO, G., KALUME, D.E., ROEPSTORFF, P., ADAMSKA, I., VAN WIJK, K.J. (2000). Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins. *The Plant Cell* 12: 319-341.
- PELTIER, J.B., EMANUELSON, O., KALUME, D.E., YTTERBERG, J., FRISO, G., RUDELLA, A., LIBERLES, D.A., SÖDERBERG, L., ROEPSTORFF, P., VON HEIJNE, G., VAN WIJK, K.J. (2002). Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *The Plant Cell* 14: 211-236.
- PETERSON, R.B., AYLOR, D.E. (1995). Chlorophyll fluorescence induction in leaves of *Phaseolus vulgaris* infected with bean rust (*Uromyces appendiculatus*). *Plant Physiol*. 108: 163-171.
- POCH, O., SAUVAGET, I., DELARUE, M., TORDO, N. (1989) Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *The EMBO J.*, 8: 3867-3874.
- POPELKOVA, H., IM, M.M., D'AURIA, J., BETTS, S.D., LYDAKIS-SIMANTIRIS, N., YOCUM, C.F. (2002a). N-terminus of the photosystem II manganese stabilizing protein: effects of sequence elongation and truncation. *Biochemistry* 41 (8): 2702-2711.
- POPELKOVA, H., IM, M.M., YOCUM, C.F. (2002b). N-terminal truncations of manganese stabilizing protein identify two amino acid sequences required for binding of the

- eukariotic protein to photosystem II and removal the absence of one binding-related sequence in cyanobacteria. *Biochemistry* 41 (31): 10038-10045.
- QUADT, R., JASPARS, E.M.J. (1989). RNA polymerases of plus-strand RNA viruses of plants. *Mol. Plant Microb. Interact.* 2: 219-223.
- RAHOUTEI, J., GARCÍA-LUQUE, I., CREMONA, V., BARÓN, M. (1998). Effect of tobamovirus infection on PSII complex of infected plants. En *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. G. Garab ed. Kluwer Academic Publishers, vol IV, 2761-2764.
- RAHOUTEI, J., BARÓN, M., GARCÍA-LUQUE, I., DROPPA, M., NEMÉNYI, A., HORVATH, G. (1999). Effect of tobamovirus infection on the thermoluminescence characteristics of chloroplast from infected plants. *Z. Naturforsch.* 54c, 634-639.
- RAHOUTEI, J. (2000). Efecto de la infección viral en el proceso fotosintético de la planta huésped. Tesis Doctoral. Universidad de Granada
- RAHOUTEI, J., GARCÍA-LUQUE, I. BARÓN, M. (2000). Inhibition of photosynthesis by viral infection: Effect on PSII structure and function. *Physiol. Plant.* 110: 286-292.
- RASCHKE, K., PATZKE, J., DALEY, F.P., BERRY, A.J. (1990). Spatial and temporal heterogeneities of photosynthesis detected through analysis of chlorophyll-fluorescence images of leaves. *Curr. Res. in Photosynth.*, vol. IV, pp 573-578 (Baltscheffsky, M., Ed.). Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- REINERO, A. BEACHY, N. R. (1986). Association of TMV coat protein with chloroplast membranes in virus-infected leaves. *Plant Mol. Biol.* 6: 291-301.
- REINERO, A. BEACHY, N. R. (1989). Reduced photosystem II activity and accumulation of viral coat protein in chloroplasts of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Plant Physiol.* 89: 111-116.
- RESKI, R. (1997). Cytokinin affects nuclear-and plastome-encoded energy-converting plastid enzymes. *Planta.* 201:261-272.
- RHEE, K.H. (2001). Photosystem II: The solid Structural Era. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30: 307-328.
- RHEE, K.H., MORRIS, E.P., ZHELEVA, D., HANKAMER, B., KÜHLBRANDT, W., BARBER, J. (1997). Two dimensional structure of plant photosystem II at 8 Å resolution. *Nature* 389: 522-526.
- RHEE, K.H., MORRIS, E.P., BARBER, J., KÜHLBRANDT, W. (1998). Three dimensional structure of the photosystem II reaction center at 8 Å. *Nature* 396: 283-286.



- RICHTER, S., LAMPPA, G.K. (2002). Determinants for removal and degradation of transit peptides of chloroplast precursor proteins. *J. Biol. Chem.* 277 (46): 43888-43894.
- ROBERTS, A.G., SANTA CRUZ, S., ROBERTS, I.M., PRIOR, D.A.M., TURGEON, R., OPARKA, K.J. (1997). Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana* comparison of a fluorescent solute with fluorescent virus. *The Plant Cell* 9: 1381-1396.
- ROBINSON, C., CAI, D., HULFORD, A., HAZELL, L., MICHL, D., BROCK, I., SCHIMDT, I., HERRMANN, R.G., KLÖSGEN, R.B. (1994). The presequence of a chimeric construct dictates which of two mechanisms are utilized for translocation across the thylakoid membrane: evidence for the existence of two distinct translocation systems. *EMBO J.* 13: 279-285.
- ROBINSON, C., THOMPSON, S.J., WOOLHEAD, C. (2001). Multiple pathways used for the targeting of thylakoid proteins in chloroplast. *Traf. C.* 2: 245-251.
- RODERMEL, S. (1999). Subunit control of Rubisco biosynthesis: a relic of an endosymbiotic past? *Photosyn. Res.* 59: 105-123.
- ROGNER, M., BOEKEMA, E.J., BARBER, J. (1996). How does photosystem 2 split water? The structural basis of efficient energy conversion. *Trends Biochem Sci.* 21: 44-49.
- ROKKA, A., ZHANG, L., ARO, E.M. (2001). Rubisco activase: an enzyme with a temperature-dependent dual function? *The Plant Journal* 25 (4): 463-471.
- ROLFE, A.S., SCHOLE, D.J. (1995). Quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *New Phytol.* 131: 69-79.
- RUBAN, A.V., HORTON, P. (1995). Regulation of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 221-230.
- RUSSO, M., MARTELLI, G.P. (1981). Ultrastructure of turnip crinkle- and saguaro cactus virus infected 57. *Virology* 118: 109-116.
- RUTHERFORD, W., FALLER, P. (2001). The hearth of photosynthesis in glorious 3D. *TIBS* 26: 341-344.
- SAITO, T., MESHI, T., OKADA, Y. (1987). Coat protein gene sequence of TMV encodes host response determinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 6074-6077.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, F. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- SAMUEL, G. (1934). The movement of tobacco mosaic virus within the plant. *Ann. Appl. Biol.* 21: 90-111.



- SÁNCHEZ DE JIMÉNEZ, E., MEDRANO, L., MARTÍNEZ-BARAJAS, E. (1995). Rubisco-activase, a possible new member of the molecular chaperone family. *Biochemistry* 34: 2826-2831.
- SCHLEIFF, E., SOL, J. (2000). Travelling of proteins through membranes: translocation into chloroplasts. *Planta* 211: 449-456.
- SCHNELL, J.D. (1998). Protein targeting to the thylakoid membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 97-126.
- SCHOLES, J.D. (1992). Photosynthesis: Cellular and tissue aspects in diseased leaves. Pests and Pathogenes: Plant responses to foliar attack. Pags. 85-106. (P.G. Ayres, ed.). Bios Scientific Publishers, Oxford.
- SCHOLES, J.D., LEE, P.J., HORTON, P., LEWIS, D.H. (1994). Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytol* 126: 213-22.
- SCHOLES, J.D., ROLFE, S.A. (1996). Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* 199: 573-582.
- SCHREIBER, U., BILGER, W., NEUBAUER, C. (1994). Chlorophyll fluorescence as a non intrusive indicator for rapid assesment of in vivo photosynthesis. En: *Ecophysiology of Photosynthesis. Ecological studies* 100: 49-70. Schulze ED and Caldwell MM (eds). Springer Verlag, Berlin.
- SCHREIBER, U., SCHLIWA, U., BILGER, W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer.- *Photosynth Res* 10: 51-62.
- SCHUBERT, M., PETERSSON, U.A., HAAS, B.J., FUNK, C., SCHÖDER, W.P., KIESELBACH, T. (2002). Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277 (10): 8354-8365.
- SCHUMAN, S., SCHWER, B. (1995), RNA capping enzymes and DNA ligases, a superfamily of covalent nucleotidyl transferases. *Mol. Microbiol.* 17: 405-410.
- SEIDLER, A. (1996a). The extrinsic polypeptides of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1277: 35-60.
- SEIDLER, A. (1996b). Intermolecular and intramolecular interactions of the 33-kDa protein in photosystem II. *Eur. J. Biochem.* 242 (3): 485-490.
- SHACKLETON, B.J., ROBINSON, C. (1991). Transport of proteins into chloroplast. The thylakoidal processing peptidase is a signal-type peptidase with stringent substrate requirements at the -3 and -1 positions. *J. Biol. Chem.* 266 (19): 12152-12156.

- SHEEN, J. (1990). Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* 2: 1027-38.
- SHEN, J.R., INOUE, Y. (1993). Binding and functional properties of two new extrinsic components, cytochrome c-550 and a 12-kDa protein cyanobacterial photosystem II. *Biochemistry* 32: 1825-1832.
- SHUTOVA, T., DEIKUS, G., ZIETZ, B., KLIMOV, V., GILIBRO, T., SAMUELSSON, G., RENGGER, G. (2001). Studies on the structural and functional role of the extrinsic manganese stabilizing protein in higher plants. PS 2001 Proceeding CSIRO Publishing.
- SIEBKE, K., WEIS E. (1995a). Assimilation images of leaves of *Glechoma hederacea*: Analysis of non-synchronous stomata related oscillations. *Planta* 196: 155-165.
- SIEBKE, K., WEIS, E. (1995b). Imaging of chlorophyll-a-fluorescence in leaves-topography of photosynthetic oscillations in leaves of *Glechoma hederacea*. *Photosynth. Res.* 45: 225-237.
- SIMÓN-BUELA, L, GARCIA-ARENAL, F. (1999). Virus particles of cucumber green mottle mosaic tobamovirus move systemically in the phloem of infected. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12:112-218.
- SOWINSKA, M., HEISEL, F., MIEHÉ, J.A., LANG, M., LICHTENTHALER, K.H., TOMASINI, F. (1996). Remote sensing of plants by streak camera lifetime measurements of the chlorophyll a emission. *J. Plant Physiol.* 148: 638-644.
- SPETEA, C., HUNDAL, T., ANDERSON, B. (2001). The 33 kDa subunit of photosystem II is a GTP-binding protein- presence of nucleotides in the thylakoid lumen. PS 2001 Proceeding CSIRO Publishing.
- STEWART, A.C., LJUNGERG, U., ÅKERLUND, H.E., ANDERSON, B. (1985). Studies of the polypeptide composition of the cyanobacterial oxygen-evolving complex. *Biochim. Biophys. Acta* 808: 353-362.
- STITT, M. (1994). Manipulation of carbohydrate partitioning. *Curr. Op. Biotech.* 5: 137-143.
- STRAUSS, J.H., STRAUSS, E.G. (1988). Evolution of RNA viruses. *Ann. Rev. of Microbiol.* 42: 657-683.
- SUZUKI, T., MINIGAWA, J., TOMO, T., SONOIKE, K., OHTA, H., ENAMI, I. (2003). Binding and functional properties of the extrinsic proteins in oxygen-evolving photosystem II particle from green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, having His-tagged CP47. *Plant Cell Physiol.* 44 (1): 76-84.
- SWIATEK, M., REGEL R.E., MEURER, J., WANNER, G., PAKRASI, H.B., OHAD, I, HERRMANN R.G. (2003) Effect of selective inactivation of individual genes for low-

- molecular mass subunits on the assembly of photosystem II, as revealed by chloroplast transformation: the *psbEFLJ* in *Nicotiana tabacum*. *Mol. Gen. Genomics* 268: 699-710.
- SYNKOVÁ, H., VAN LOVEN, K., POSPISILOVA, J., VALCKE, R. (1999). Photosynthesis of transgenic Pssu-ipt tobacco. *J. Plant Physiol.* 155: 173-182.
- SYNKOVÁ, H., VALCKE, R. (2001). Response to mild water stress in transgenic Pssu-ipt tobacco. *Physiol. Plant.* 112: 513-523.
- TAKAHASHI, H., EHARA, Y., HIRANO, H. (1991). A protein in the oxygen-evolving complex in the chloroplasts is associated with symptom expression on tobacco leaves infected with cucumber mosaic virus strain Y. *Plant Mol Biol.* 16: 689-698.
- TAKAHASHI, H., EHARA, Y. (1992). Changes in the activity and the polypeptide composition of the oxygen-evolving complex in photosystem II of tobacco leaves infected with cucumber mosaic virus strain Y. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 5 (3): 269-272.
- TÉCSI, L.I., MAULE, A.J., SMITH, A.M., LEEGOOD, R.C. (1994a). Complex, localized changes in CO<sub>2</sub> assimilation and starch content associated with the susceptible interaction between cucumber mosaic virus and cucurbit host. *The Plant Journal* 5 (6): 837-847.
- TÉCSI, L.I., MAULE, A.J., SMITH, A.M., LEEGOOD, R.C. (1994b). Metabolic alterations in cotyledons of *Cucurbita pepo* infected by cucumber mosaic virus. *J. Exp. Bot.* 45 (280): 1541-1551.
- TÉCSI, L.I., SMITH, A.M., MAULE, A.J., LEEGOOD, R.C. (1996). A spatial analysis of physiological changes associated with infections of cotyledons of marrow plants with cucumber mosaic virus. *Plant Physiol.* 111: 975-985.
- TELFER, A., FROLOV, D., BARBER, J., ROBERT, B., PASCAL, A. (2003). Oxidation of the beta-carotene molecules in the photosystem II reaction center. *Biochemistry* 42 (4): 1008-1015.
- THOMPSON, L.K. Y BRUDVIG, G.W. (1988) Cytochrome b559 may function to protect photosystem II from photoinhibition. *Biochemistry* 27, 6653-6658
- TOHRI, A., SUZUKI, T., OKUYAMA, S., KAMINO, K., MOTOKI, A., HIRANO, M., OHTA, H., SHEN, J.R., YAMAMOTO, Y., ENAMI, I. (2002). Comparison of the structure of the extrinsic 33 kDa protein from different organisms. *Plant Cell Physiol.* 43 (4): 429-439.
- TOWBIN, L., STAEGELIN, T., GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4354.

- VALCKE, R., CISCATO, M., HEISEL, F., MIEHE, J., SOWINSKA, M. (1999). Analysis of heavy-metal stressed plants by fluorescence imaging. Proc. SPIE, 13th Annual International Symposium on Aerosense, 3707, 82-90.
- VALCKE, R. (2002) Fluorescence imaging: the stethoscope of the plant physiologist. Adv. Plant Physiol., in press.
- van DOOREN, G.G., SCHWARTZBACH, S.D., OSAFUNE, T., McFADDEN G.I. (2001). Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. Biochim. Biophys. Acta 1541: 34-53.
- van KOOTEN, O., MEURS, C., VAN LOON, L. C. (1990). Photosynthetic electron transport in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. Physiol. Plant. 80:446-452.
- van WIJK, K.J. (2000). Proteomics of the chloroplast: experimentation and prediction. Trends Plant Sci. 5 (10): 420-425.
- van WIJK, K.J., SCHNETTGER, B., GRAF, H., KRAUSE, G.H.(1993). Photoinhibition and recovery in relation to heterogeneity of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta 1142: 59-68.
- VASS, I. ONO T., INOUE Y. (1987). Removal of 33 kDa extrinsic protein specifically stabilizes the S<sub>2</sub>Q<sub>A</sub>-charge pair in photosystem II. FEBS Lett. 211: 215-220.
- VAAS, I., STYRING, S. (1992). Charge equilibrium between the water-oxidizing complex and the electron donor tyrosine D in photosystem II. Biochemistry. 31: 5957-5963.
- VERMAAS, W.F.J., WILLIAMS, J.G.K., ARNTZEN, C.J. (1987). Sequencing and modification of psbB, the gene encoding the CP-47 protein of photosystem II, in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. Plant Mol. Biol. 8: 317-26
- VERMAAS, W.F.J., WILLIAMS, J.G.K., RUTHERFORD, A.W., MATHIS P, ARNTZEN CJ. 1986. Genetically engineered mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 lacks the photosystem II chlorophyll-binding protein CP-47. Proc. Natl. Acad.Sci. USA. 83: 9474-77
- von SCHAEWEN, A., STITT, M., SCHMIDT, R., SONNEWALD, U., WILLMITZER, L. (1990). Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and Arabidopsis plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. the EMBO J. 9 (10): 3033-3044.
- VRETTOS, J.S., STONE, D.A., BRUDVIG, G.W. (2001). Quantifying the ion selectivity of the Ca<sup>2+</sup> site in photosystem II: evidences for direct involvement of Ca<sup>2+</sup> in O<sub>2</sub> formation. Biochemistry 40: 7937.7945.

- WALES, R., NEWMAN, B. J., PAPPIN, D., GRAY, J. C. (1989a). The extrinsic 33 kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II is a putative calcium-binding protein and is encoded by a multi-gene family in pea. *Plant Mol. Biol.* 12: 439-451.
- WALES R, NEWMAN BJ, ROSE SA, PAPPIN D, GRAY JC. (1989b). Characterization of cDNA clones encoding the extrinsic 23kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II in pea. *Plant Mol. Biol.* 13:573-82.
- WANG, Y., SUN, J., CHITNIS, P.R. (2000). Proteomic study of the peripheral proteins from thylakoid membranes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PPC 6803. *Electrophoresis* 21: 1746-1754.
- WEBBER AN, PACKMAN LC, GRAY JC. 1989. A 10 kDa polypeptide associated with the oxygen-evolving complex of photosystem II has a putative C-terminal non-cleavable thylakoid transfer domain. *FEBS Lett.* 242:435-38
- WENNG, A., EHMANN, B., SCHÄFER, E. (1989). The 23 kDa polypeptide of the photosynthetic oxygen-evolving complex from mustard seedlings (*Sinapis alba* L.). Nucleotide sequence of cDNA and evidence for phytochrome control of its mRNA abundance. *FEBS Lett.* 246 (1,2): 140-144.
- WETTER, C. (1984). Serological identification of four tobamoviruses infecting pepper. *Plant Dis.* 68: 597-599.
- WETTER, C., CONTI, M., ALSCHUH, D., TABILLION, R., VAN REGEMORTEL, M.H.V. (1984). Pepper mild mottle virus, a tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. *Phytopathology* 74: 405-410.
- WHITE, J.L., BRAKKE, M.K. (1983). Protein chnges in wheat infected with wheat streak mosaic virus and in barley infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Plant Pathol.* 13: 253-258.
- WITT, H.T., ZOUNI, A., KERN, J., FROMME, P., KRAUB, N., SAENGER, W., ORTH, P. (20019). Crystal structure of photosystem II and aspects of its function. PS 2001 Proceeding CSIRO Publishing.
- WOLLMAN, F.A., MINAI, L., NECHUSHAI, R. (1999). The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1411: 21-85.
- WRIGHT, D.P., BALDWIN, B.C., SHEPHARD, M.C., SCHOLE, J.D. (1995). Source - sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. II. Changes in the regulation of the Calvin cycle. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 47: 255-267.
- WRIGHT, D.P., SCHOLE, J.D., READ, D.J., ROLFE, S.A. (2000). Changes in carbon allocation and expression of carbon transporter genes in *Betula pentula* Roth. colonized

- by the ectomycorrhizal fungus *Pxillus involutus* (Batsch) Fr. *Plant, Cell and Environ.* 23: 39-49.
- XU, Q., NELSON, J., BRICKER, T.M. (1992). Secondary structure of the 33 kDa, extrinsic protein of Photosystem II: a far-UV circular dichroism study. *Biochim. Biophys. Acta* 1188:427-31
- YAMAMOTO, Y., ISHIKAWA, Y., NAKATANI, E., YAMADA, M., ZHANG, H., WYDRZYNSKI, T. (1998). Role of an extrinsic protein of photosystem II in the turnover of the reaction center-binding protein D1 during photoinhibition. *Biochem.* 37 (6): 1565-1574.
- YAMAMOTO, Y., SHIMADA, S., NISHIMURA, M. (1983). Purification and molecular properties of 3 polypeptides released from a highly active O<sub>2</sub>-evolving photosystem II preparation by Tris-treatment. *FEBS Lett.* 151 (1): 49-53.
- YAMASAKI, K., SAKUMA, S., HENMI, T., YAMAMOTO, Y. (2001). The D1 protein, CP43 and OEC33 are neighboring polypeptides at the luminal disc of PSII: evidence from a photo-induced cross-linking study. PS2001. *Proceeding CSIRO Publishing.*
- YOUNG, M.T., ZATLIN, M. (1986). An analysis of TMV replicative structures synthesized in vitro. *Plant Mol. Biol.* 6: 455-465.
- YOUNG, M.T., FORNEY, J., ZATLIN, M. (1987). TMV replicase and replicative structures. *J. Cell Sci. Suppl.* 7: 277-285.
- ZHANG, H., ISHIKAWA, Y., YAMAMOTO, Y., CARPENTIER, R. (1998). Secondary structure and thermal stability of the extrinsic 23 kDa protein of PSII studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *FEBS Lett.* 426: 347-351.
- ZHANG, L. AND ARO, E.-M. (2002) Synthesis, membrane insertion and assembly of the chloroplast-encoded D1 protein into Photosystem II. - *FEBS Lett.* 512: 13-18.
- ZHANG, X.P., GLASER, E. (2002). Interaction of plants mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *TRENDS Plant Sci.* 7: 14-21.
- ZOUNI, A., WITT, H.T., KERN, J., FROMME, P., KRAUSS, N., SAENGER, W., ORTH, P. (2001). Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3,8 Å resolution. *Nature* 409: 739-742.



Biblioteca Universitaria de Granada



01066951