

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN PLANTAS DE CALA (*Zantedeschia* spp.)

DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN CALLA LILY PLANTS (*Zantedeschia* spp.)

Pamela A. Leal-Rojas¹, Ana Gutiérrez-Moraga¹, Luis Destefano-Beltrán³, Adolfo A. Salvo-Garrido¹ y Manuel Gidekel^{1,2}

¹Laboratorio de Biología Molecular Aplicada. Instituto de Agroindustria. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Universidad de La Frontera. Avenida Francisco Salazar 01145. Temuco, Chile. ²Vitrogen S. A. ³Departamento de Agricultura (USDA). Fargo. Dakota del Norte. EE.UU. (mgidekel@ufro.cl)

RESUMEN

Las especies de *Zantedeschia* Spreng. (Familia Araceae) son monocotiledóneas, herbáceas, perennes, de fotoperíodo neutro y dormantes durante el invierno, que poseen un órgano de almacenamiento subterráneo (tubérculo). Varios cultivares de *Zantedeschia* contribuyen a la floricultura internacional, pero se conoce muy poco acerca de los cambios en el metabolismo y la expresión diferencial de genes durante la dormancia y crecimiento activo de la planta. El objetivo de esta investigación fue estudiar la expresión diferencial de genes en tubérculo, hoja y brote de *Zantedeschia* spp. mediante despliegue diferencial de ARN mensajero. Se utilizaron plantas de *Zantedeschia* spp. multiplicadas *in vitro* en el Laboratorio de Biología Molecular Aplicada de la Universidad de la Frontera, Temuco, Chile. Con las combinaciones de iniciadores se obtuvieron 45 cADN parciales y algunos fueron tejido-específicos. La expresión diferencial fue corroborada mediante la técnica de transferencia de fragmentos de ARN Northern, para ocho clones seleccionados. Para obtener las secuencias completas de los clones se construyeron bibliotecas de expresión a partir de ARN total de los diferentes órganos y los cADN parciales se usaron como sonda para explorar dichas bibliotecas. El análisis de sus secuencias reveló homología con genes descritos en la literatura, que incluyen proteínas despolimerizante de actina, proteínas inducidas por elicitador y deshidratación, proteínas de respuesta a bajas temperaturas y salinidad, proteínas tipo Fap y Skp1 y una activadora de rubisco.

Palabras clave: *Erwinia*, *Zantedeschia*, cADN, expresión tejido-específica, Northern blot, tubérculo.

INTRODUCCIÓN

Las especies de *Zantedeschia* Sprengel (Familia Araceae), originarias del sur de África, son plantas perennes, herbáceas, de fotoperíodo neutro y dormantes durante el invierno (Robinson *et al.*, 2000). Este género se clasifica en la sección *Zantedeschia* o cala blanca, y la sección *Aestivae* o

ABSTRACT

Zantedeschia spp. Spreng. species (Araceae Family) are monocotyledons, herbaceous, perennial, with neutral photoperiod, and winter-dormant plants, which have an underground storage organ (tuber). Several *Zantedeschia* cultivars contribute to the international floriculture market, but little is known about the changes in metabolism and the differential expression of genes taking place within the tuber during dormancy and active growth of the plant. The objective of the present study was to study the differential gene expression in tuber, leaves and sprout of *Zantedeschia* spp. through mRNA differential display. Plants of *Zantedeschia* spp. were used, multiplied *in vitro* in the Applied Molecular Biology Laboratory at the Universidad de la Frontera, Temuco, Chile. From the different combinations of primers, 45 partial cDNAs were obtained, some of which were tissue-specific. Differential expression was assessed by Northern blot analysis for eight selected clones. To obtain complete sequences of the clones, expression libraries were constructed from total RNA of different organs and the partial cDNAs were used as probe to screen these libraries. Sequence analysis revealed homology to genes described in the literature, including actin depolymerizing protein, proteins induced by elicitor and dehydration, low temperature and salinity response proteins, Skp1-like and FAP proteins and Rubisco activase protein.

Key words: *Erwinia*, *Zantedeschia*, cDNA, tissue-specific expression, Northern blot, tuber.

INTRODUCTION

The *Zantedeschia* Sprengel species (Araceae Family), originating from the south of Africa, are plants that are perennial, herbaceous, with neutral photoperiod and winter-dormant (Robinson *et al.*, 2000). This genus is classified in the sections, *Zantedeschia* or white calla, and the section *Aestivae* or colored calla (Funnell, 1993). The plants of the *Zantedeschia* section have an underground basal organ similar to a rhizome, maintain the aboveground part active throughout the year and flower from the end of winter to spring. In the plants of the *Aestivae* section,

Recibido: Octubre, 2005. Aprobado: Octubre, 2006.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 41: 141-152. 2007.

cala de color (Funnell, 1993). Las plantas de la sección *Zantedeschia* tienen un órgano basal subterráneo similar a un rizoma, mantienen la parte aérea activa durante todo el año y florecen desde fines del invierno hasta la primavera. En las plantas de la sección *Aestivae* el órgano basal subterráneo es un tubérculo y su follaje sufre una senescencia completa tras el verano, época en la que florecen (Singh *et al.*, 1996).

La marchitez bacteriana causada por *Erwinia carotovora* es la principal enfermedad que ataca a las plantas del género *Zantedeschia* (Kuehny, 2000; Wright y Burge, 2000). La especie *Z. aethiopica* (sección *Zantedeschia*) es la más resistente a esta bacteria; sin embargo, no es posible incorporar esta resistencia a genotipos *Aestivae* debido a barreras de compatibilidad (Snijder *et al.*, 2004). El objetivo de esta investigación fue estudiar la expresión diferencial de genes en plantas de cala a través del aislamiento de cADN tejido-específico y la obtención de sus secuencias completas. Se espera que los resultados de esta investigación permitan entender en *Zantedeschia*, a la función de estos genes en procesos de desarrollo, fotosíntesis y respuesta a patógenos, que permitiría modificar genotipos *Aestivae* mediante la introducción de genes con características antifúngicas o antibacterianas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron plantas de *Zantedeschia* spp. cv Cameo multiplicadas *in vitro* en el Laboratorio de Biología Molecular Aplicada de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. Las plantas crecieron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), a 25 ± 2 °C y fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Además, se utilizaron plantas de *Zantedeschia* sp. cv Cameo cultivadas en sustrato de tierra de hoja/perlita (90:10) y aclimatadas en invernadero (19 ± 2 °C, 24 h luz y 65-80% HR).

Aislamiento del ARN y técnica de transferencia de fragmentos de ARN Northern

El ARN se extrajo con el reactivo Trizol (Invitrogen) y las recomendaciones del fabricante. El análisis de transferencia de fragmentos de ARN Northern (Northern blot) se realizó según Sambrook *et al.* (1989). Se separaron 10 µg de ARN de hoja, brote y tubérculo mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% con formaldehído, y el ARN fue transferido a una membrana de nilón (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) e hibridada con cada fragmento de cADN marcado con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. La hibridación se hizo a 65 °C por 18 h en una solución de hibridación (Na_2HPO_4 0.5 M, pH 7.5; sodio dodecilsulfato (SDS) 7% y albúmina de suero bovino (BSA) 1%). Para eliminar el exceso de la sonda radioactiva, las membranas se lavaron dos veces con

the underground basal organ is a tuber and its foliage undergoes complete senescence after summer, which is the season in which flowering takes place (Singh *et al.*, 1996).

Bacterial wilting caused by *Erwinia carotovora* is the most important disease in plants of the genus *Zantedeschia* (Kuehny, 2000; Wright and Burge, 2000). *Z. aethiopica* (*Zantedeschia* section) is the most resistant species to this bacteria; however, it is not possible to incorporate this resistance to *Aestivae* genotypes due to barriers of compatibility (Snijder *et al.*, 2004). The objective of the present study was to examine the differential expression of genes in calla plants through the isolation of tissue-specific cDNAs and to obtain its complete sequences. It is expected that the results of this investigation will make it possible to understand the function of these genes in *Zantedeschia* during the developmental processes, photosynthesis and response to pathogens, which would permit in time the modification of *Aestivae* genotypes through the introduction of genes with antifungal or antibacterial characteristics.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and growth conditions

Plants of *Zantedeschia* spp. cv Cameo were used throughout this research; plants were multiplied *in vitro* in the Applied Molecular Biology Laboratory at the Universidad de la Frontera, Temuco, Chile. Plants were grown in MS medium (Murashige and Skoog, 1962), at 25 ± 2 °C with photoperiod of 16 h light/8 h darkness. Also, plants that were cultivated in leaf/perlite soil substrate (90:10) and acclimated in the greenhouse (19 ± 2 °C, 24 h light and 65-80% HR) were used.

Isolation of RNA and Northern blot technique

Total RNA was extracted with the reactive Trizol (Invitrogen) with the recommendations of the manufacturer. Northern blot analysis was carried out according to Sambrook *et al.* (1989). Ten µg of leaf, sprout and tuber total RNA were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gels with formaldehyde, and RNA was transferred to a nylon membrane (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) and hybridized with each cDNA fragment labeled with [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP. Hybridization was made at 65 °C for 18 h in a hybridizing solution (Na_2HPO_4 0.5 M, pH 7.5; sodium dodecylsulfate (SDS) 7% and albumin of bovine serum (BSA 1%). To eliminate the excess of the radioactive probe, the membranes were washed twice with a high-stringent solution (Na_2HPO_4 100 mM, pH 7.5, SDS 0.5%, EDTA 1 mM) and twice with a low-stringent solution (Na_2HPO_4 40 mM, pH 7.5, SDS 0.5%, EDTA 1%). Each wash was carried out for 15 min at 65 °C; the membrane was then exposed to an X-ray film

una solución de alta astringencia (Na_2HPO_4 100 mM, pH 7.5, SDS 0.5%, EDTA 1 mM) y dos veces con una solución de baja astringencia (Na_2HPO_4 40 mM, pH 7.5, SDS 0.5%, EDTA 1%). Cada lavado se hizo por 15 min a 65 °C; luego la membrana fue expuesta a una película de rayos X (Kodak) y llevada a -70 °C por 2 d. Para la normalización de los resultados, las membranas fueron hibridadas con un fragmento del gen rARN 28S, de expresión constitutiva.

Despliegue diferencial de mRNA

El despliegue diferencial de los cADN se realizó según Liang y Parde (1992), mediante el oligonucleótido dT_{11}NX marcado radiactivamente con $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP. Para este análisis se utilizó 1 μg de ARN de hojas emergentes, tubérculos de 2 cm de diámetro y brotes de 0.75 cm. Para subdividir la población de mRNA se utilizaron cuatro iniciadores anclados por dos bases T_{11}GC , T_{11}CG , T_{11}CA y T_{11}CC . Para la amplificación por PCR se utilizaron 20 iniciadores arbitrarios 5' de 13-mer, con una mezcla de amortiguador 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 8.4, KCl 50mM), 25 μM de cada dNTP; 0.4 μM de uno de los 20 iniciadores arbitrarios; 1.3 μM de cada oligonucleótido T_{11}NX -(^{32}P); 1.2 mM MgCl_2 y 1 U de Taq polimerasa; en un volumen de 20 μL . Las condiciones de amplificación en el termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) fueron: 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 40 °C por 2 min, 72 °C por 30 s, 1 ciclo de 72 °C por 7 min y una etapa final a 4 °C.

Los cADN amplificados fueron separados en un gel de secuenciación de poliácridamida al 6%, con urea 8 M (p/v). Cada fragmento diferencial fue reamplificado por PCR con las mismas condiciones anteriores y purificado mediante alineación de la autorradiografía con el gel, usando marcas fosforescentes puestas sobre éste antes de exponer; luego se cortaron las bandas del gel a través de la película de rayos X. Después el ADN fue eluido usando el kit prep-A-gene (Bio-Rad). Estos cADN purificados fueron ligados al vector pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, EE.UU.) y transformados en células de *E. coli* cepa JM109 por electroporación.

Para verificar la presencia y tamaño de los insertos, el ADN plasmidial se digirió con la enzima EcoRI y se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa 1%. La expresión diferencial se corroboró mediante la técnica de transferencia de fragmentos de ARN Northern usando como sonda los fragmentos diferenciales, marcados con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Hexalabe™ DNA Labeling Kit, Fermentas). Finalmente, los cADN diferenciales se secuenciaron para determinar su posible función.

Construcción de las bibliotecas de cADN tejido-específico

Para construir las bibliotecas de cADNs se utilizó SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech, Palo Alto, CA, EE. UU.) y el Gigapack II Gold Packaging Extract (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante. Se construyeron cuatro bibliotecas de expresión a partir de ARN de hojas, brotes y tubérculos. Los cADN fueron clonados en el vector $\lambda\text{TriplEx}$ y empacados en el fago (Clontech), determinándose el título de cada biblioteca.

(Kodak) and brought to -70 °C for 2 d. For normalization of the signals, membranes were hybridized with a fragment of the gene rRNA 28S, of constitutive expression.

Differential display of mRNA

Differential display of the cDNAs was carried out according to Liang and Pardee (1992), by means of the oligonucleotide dT_{11}NX radioactively labeled with $[\alpha^{32}\text{P}]$ -dATP. For this analysis, 1 μg of total RNA of emergent leaves, tubers of 2 cm diameter and sprouts of 0.75 cm were used. To subdivide the population of mRNA, four primers anchored by two bases T_{11}GC , T_{11}CG , T_{11}CA and T_{11}CC were used. For amplification by PCR, 20 arbitrary 5' of 13-mer primers were used with a buffer mixture 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 8.4, KCl 50 mM), 25 μM of each dNTP; 0.4 μM of each of the 20 arbitrary primers; 1.3 μM of each oligonucleotide T_{11}NX -(^{32}P); 1.2 mM MgCl_2 and 1 U of Taq polymerase; in a volume of 20 μL . The conditions for amplification in the thermocycler GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) were: 40 cycles of 94 °C for 30 s, 40 °C for 2 min, 72 °C for 30 s, 1 cycle of 72 °C for 7 min and a final stage at 4 °C.

Amplified cDNAs were separated in a polyacrylamide sequencing gel at 6%, with urea 8 M (p/v). Each differential fragment was re-amplified by PCR with the same conditions above stated and purified by aligning the autoradiography with the gel, using phosphorescent marks placed over it before exposure; the bands of the gel were then cut out through the X-ray film. Next, the DNA was eluted using the prep-A-gene kit (Bio-Rad). These purified cDNAs were ligated to the vector pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) and transformed in cells of *E. coli* strain JM109 by electroporation.

To verify the presence and size of the inserts, the plasmidial DNAs were digested with the enzyme EcoRI and analyzed by electrophoresis in 1% agarose gels. Differential expression was corroborated through Northern blot technique using differential fragments as the probes, labeled with $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Hexalabe™ DNA Labeling Kit, Fermentas). Finally, differential cDNAs were sequenced to determine their possible function.

Construction of the tissue-specific cDNA libraries

For cDNA libraries construction, the SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) and the Gigapack II Gold Packaging Extract (Stratagene, La Jolla, CA, USA) were used according to the manufacturer's instructions. Four expression cDNA libraries were constructed from leaves, sprouts and tubers RNA. The cDNAs were cloned in the vector $\lambda\text{TriplEx}$ and packed in the phage (Clontech); the title of each library was determined.

To determine the average size of the fragments, restriction of randomly selected phages was made. For amplification of the library, different dilutions of phages and XL_1 -blue cells were used. The mixture was grown in Luria Bertani medium (LB) supplemented with 10 mM of MgSO_4 for 18 h at 37 °C. To recover the phages, SM dilution buffer (1 M NaCl, 0.1 M MgSO_4 , 0.35 M Tris-HCl pH 7.5) and chloroform were used. The libraries were stored in

Para determinar el tamaño de los fragmentos se realizó un análisis de restricción de los fagos tomados al azar. Para la amplificación de la biblioteca se usaron distintas diluciones de fagos y células XL₁-blue. La mezcla creció en medio Luria Bertani (LB) más 10 mM de MgSO₄, por 18 h a 37 °C. Para recuperar los fagos se utilizó un amortiguador de dilución SM (1 M NaCl, 0.1 M MgSO₄, 0.35 M Tris-HCL pH 7.5) y una solución de cloroformo. Las bibliotecas se almacenaron en dimetilsulfóxido (DMSO) 7% a -70 °C. Para obtener el clon completo de cADN se realizó un escrutinio en la biblioteca correspondiente, usando como sonda el cADN parcial marcado radiactivamente. Después del tercer escrutinio, los clones seleccionados se verificaron por restricción con las enzimas EcoRI y HindIII, que liberan el fragmento clonado.

Análisis de secuencia

Los fragmentos diferenciales fueron secuenciados en un equipo automático mediante el kit de marcaje para reacciones de secuenciación ABI PRISM (Promega, Southampton, Reino Unido). Las secuencias fueron analizadas en búsqueda de homología en el sitio Web del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI), con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de genes expresados diferencialmente

Se aislaron 70 cADN parciales expresados diferencialmente. En la Figura 1 se presenta un patrón electroforético de los productos del despliegue diferencial de mRNA obtenidos con algunas de las combinaciones de iniciadores. Las flechas corresponden a cADN parciales que mostraron diferencias en intensidad o

dimethylsulfoxide (DMSO) 7% at -70 °C. To obtain the complete cDNA, a screening of the corresponding library was made using the radioactively labeled partial cDNA as probe. After the third screening, the selected clones were verified by restriction with EcoRI and HindIII, which release the cloned fragments.

Sequence analysis

Differential fragments were sequenced in an automatic apparatus by means of the sequencing kit for ABI PRISM (Promega, Southampton, UK). Sequences were analyzed in the Web site of the Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI), with the program BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of differentially expressed genes

Seventy differentially expressed partial cRNAs were isolated. An electrophoretic pattern of the products of the differential display of mRNA obtained with some combinations of primers is shown in Figure 1. The arrows correspond to partial cDNAs that show differences in intensity or that are found induced in different tissues of the plant; that is, they correspond to differentially expressed genes. To confirm the expression pattern, the differential cDNA fragments were recovered from the gel and re-amplified with the same combinations of primers and conditions of chain reaction of the polymerase (PCR).

Of the 70 differential bands, 45 presented a size greater than 300 pairs of bases. A screening was

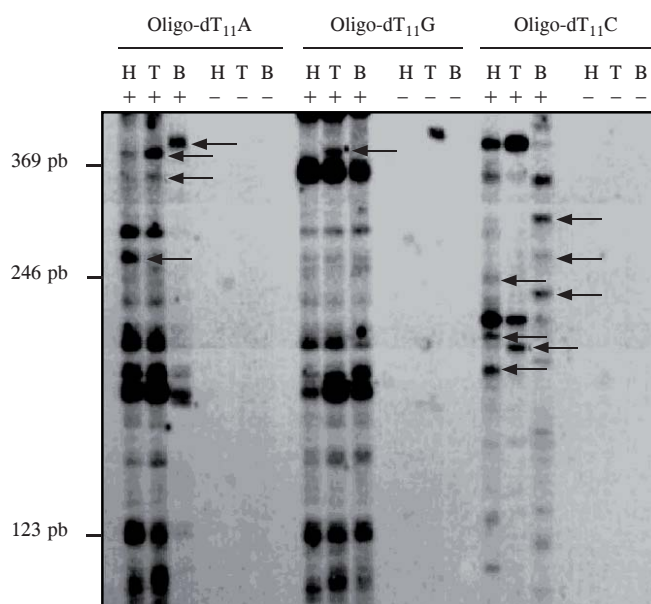


Figura 1. Expresión diferencial de genes en *Zantedeschia* spp. Patrón de bandeado obtenido con algunas de las combinaciones de iniciadores utilizadas. Las bandas corresponden a cADN sintetizados a partir de ARN extraído de hoja (H), brote de 0.75 cm de altura (B) y tubérculo de 2 cm de diámetro (T), y las flechas indican algunos de los cADN expresados diferencialmente.

Figure 1. Differential expression of genes in *Zantedeschia* spp. Band pattern obtained with some of the combinations of primers used. The bands correspond to cDNA synthesized from RNA extracted from leaf (H), sprout of 0.75 cm height (B) and tuber of 2 cm diameter (T), and the arrows indicate some of the differentially expressed cDNAs.

que se encuentran inducidos en los distintos tejidos de la planta; es decir, corresponden a genes expresados diferencialmente. Para confirmar el patrón de expresión, los fragmentos de cADN diferenciales fueron recuperados desde el gel y reamplificados con las mismas combinaciones de iniciadores y condiciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

De las 70 bandas diferenciales, 45 presentaron un tamaño superior a 300 pares de bases. Luego se realizó un escrutinio en las bibliotecas de expresión para algunos de los cADN diferenciales. En resumen, se aislaron 15 cADN provenientes de la biblioteca de tubérculo, 10 cADN de la biblioteca de hoja y 20 cADN de la biblioteca de brote. Estos cADN fueron secuenciados y su secuencia comparada con la base de datos NCBI, en busca de homologías.

Varios cultivares de *Zantedeschia* contribuyen a la floricultura internacional, pero se conoce poco acerca de los cambios en el metabolismo o la expresión diferencial de genes en la planta, durante la dormancia y crecimiento activo. Una revisión detallada de la base de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez), revela únicamente 16 entradas para *Z. aethiopica* en 1999. Por tanto, los cADN diferenciales identificados en este estudio constituyen la base para futuros estudios moleculares para aislar y caracterizar regiones regulatorias que dirijan la expresión específica de genes, para su incorporación en la planta mediante ingeniería genética.

Técnica de transferencia de fragmentos de ARN Northern

De acuerdo con las secuencias analizadas, se seleccionaron ocho clones para el análisis de expresión. En la Figura 2 se muestra el resultado del análisis Northern blot para los productos seleccionados. El fragmento parcial B36 se expresa sólo en la hoja de la planta, hibridando con un transcrito de 600 pb. El fragmento H36 hibrida con un transcrito de 1.5 kb inducido en hoja y brote. El fragmento T14 hibrida con un transcrito 750 pb, expresado en hoja y tubérculo. Para el fragmento T32 se observa una señal más débil en tubérculo y brote, mientras que en tejido de hoja no hay expresión del mRNA. Para el fragmento T35, un transcrito de 2.3 kb es inducido en hoja y brote. Hay tres productos que muestran una expresión tejido-específica. La sonda H11 hibrida con un transcrito de 1.8 kb inducido específicamente en la hoja, mientras que los fragmentos T2.10 y T2.3 hibridan con un transcrito de 1.0 kb, que se expresa fuertemente en tejido de brote-tubérculo y tubérculo.

Todos los cultivares *Aestivae* son susceptibles a la bacteria *Erwinia* spp. y no existen investigaciones

then made in the expression libraries for some of the differential cDNAs. In summary, 15 cDNAs were isolated from the tuber library, 10 cDNAs from the leaf library and 20 cDNAs from the sprout library. These cDNAs were sequenced, and their sequence was compared with the NCBI data base with the purpose of finding homologies.

Various cultivars of *Zantedeschia* contribute to international floriculture, but little is known about the changes in metabolism or differential expression of genes in the plant, during dormancy and active growth. A detailed examination of the data base of the GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez), revealed only 16 entrances for *Z. aethiopica* in 1999. Therefore, the differential cDNAs identified in this study constitute the base for future molecular studies to isolate and characterize regulatory regions that direct the specific expression of genes, for its incorporation in the plant through genetic engineering.

RNA Northern blot technique

According to the sequences analyzed, eight clones were selected for expression analysis. The result of a Northern blot for the selected products is shown in Figure 2. Partial fragment B36 is expressed only in the leaf of the plant, hybridizing with a transcript of 600 pb. Fragment H36 hybridizes with a transcript of 1.5 kb expressed in leaf and sprout. Fragment T14 hybridizes with a 750 pb transcript, expressed in leaf and tuber. For fragment T32, a weaker signal is observed in tuber and sprout, whereas in leaf tissue there is no mRNA expression. For fragment T35, a transcript of 2.3 kb is expressed in leaf and sprout. There are three products that show a tissue-specific expression. The probe H11 hybridizes with a transcript of 1.8 kb expressed specifically in the leaf, whereas fragments T2.10 and T2.3 hybridize with a transcript of 1.0 kb, which is strongly expressed in tissue of sprout-tuber and tuber.

All of the *Aestivae* cultivars are susceptible to *Erwinia* spp., and there are no investigations oriented towards determining variation in resistance within *Zantedeschia*. However, genetic engineering of plants offers alternative forms of transferring a resistance gene, without changing the properties of a cultivar. For example, transgenic plants of *Solanum tuberosum* have been obtained that are resistant to *Erwinia* (Düring *et al.*, 1993; Arce-Johnson *et al.*, 1999; Serrano *et al.*, 2000). The results of the present experiment will allow the molecular characterization and isolation of genes and tissue-specific promoters, which is a new finding for this species.

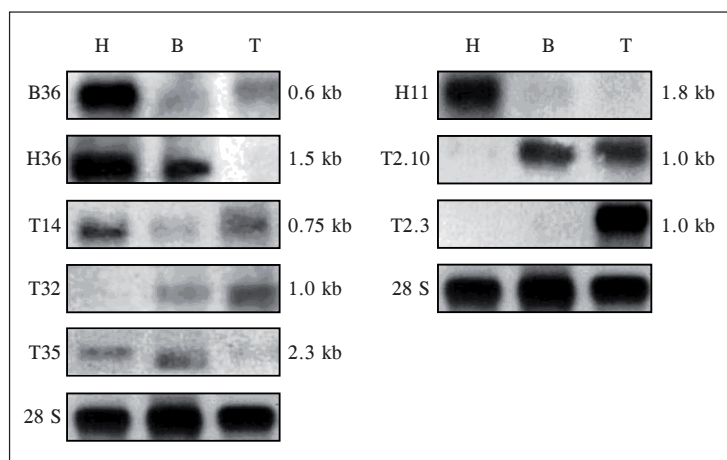


Figura 2. Análisis de transferencia de fragmentos de ARN Northern. El ARN de hoja (H), brote (B) y tubérculo (T) fueron separados en gel de agarosa/formaldehído 1.5% p/v, transferidos a una membrana de nilón e hibridada con el cADN parcial, marcado radiactivamente. Para la normalización de los resultados, se utilizó un fragmento del gen 28S de expresión constitutiva.

Figure 2. Northern blot analysis. RNA of leaf (H), sprout (B) and tuber (T) were separated in agarose/formaldehyde gel 1.5% p/v, transferred to a nylon membrane and hybridized with the partial cDNA, radioactively marked. For normalization of the results, a fragment of the gene 28S with constitutive expression was used.

orientadas a determinar variación en la resistencia dentro de *Zantedeschia*. Sin embargo, la ingeniería genética de plantas ofrece formas alternativas de transferir un gen de resistencia, sin cambiar las propiedades de un cultivar. Por ejemplo, se han obtenido plantas transgénicas de *Solanum tuberosum* resistentes a *Erwinia* (Düring *et al.*, 1993; Arce-Johnson *et al.*, 1999; Serrano *et al.*, 2000). Los resultados del presente experimento permitirán la caracterización molecular y el aislamiento de genes y promotores tejido-específicos, lo cual es un hallazgo nuevo para esta especie.

Análisis de secuencia

Al analizar las secuencias de algunos de los cADN diferenciales, se encontró que presentan homología con genes conocidos. En el Cuadro 1 se presenta un resumen con las principales características y homología de los cADN seleccionados.

Clon T19

Presenta alta homología (84%) con una proteína despolimerizante de actina de petunia Factor 1 (AY038063) y Factor 2 (AF183904); además tiene 83% de homología con una proteína despolimerizante de actina Factor 1 (CAB88325) y Factor 4 (AAM61326), de *Arabidopsis* (Figura 3A). Las proteínas ADP participan en la reorganización de los microfilamentos de actina del citoesqueleto durante varios eventos celulares, que incluyen citocinesis y alargamiento celular (Staiger *et al.*, 1997). La función *in vivo* no ha sido bien establecida en plantas, aunque mutaciones en los genes ADF/cofilina de levadura, *Drosophila* y *C. elegans* producen un defecto en la morfogénesis y división celular (Jeong-Hwan *et al.*, 2000).

Sequence analysis

Upon analyzing the sequences of some of the differential cDNAs, it was found that they present homology with known genes. A summary with the principal characteristics and homologies of the selected cDNAs is shown in Table 1.

Clone T19

This clone presents high homology (84%) with a depolymerizing protein of petunia actin Factor 1 (AY038063) and Factor 2 (AF183904); it also has 83% homology with a depolymerising protein of actin Factor 1 (CAB88325) and Factor 4 (AAM61326), of *Arabidopsis* (Figure 3A). The ADP proteins participate in the reorganization of the microfilaments of actin of the cytoskeleton during various cellular events, which include cytosinesis and cellular elongation (Staiger *et al.*, 1997). The function *in vivo* has not been well established in plants, although mutations in the genes ADF/cofilin of yeast, *Drosophila* and *C. elegans* produce a defect in the morphogenesis and cellular division (Jeong-Hwan *et al.*, 2000).

Clones T21 and T23

These cDNAs present a similar sequence and show homology with various proteins involved with stress response. Clone T21 presents homology with a putative protein of *Oryza sativa* of 163 aminoacids induced by elicitors (NP_921022) and with a protein of *Capsicum annuum* (AAO49266) of 158 aminoacids induced by the tobacco mosaic virus TMV (Figure 3B). Clone T23 presents homology with a protein of *C. annuum* of 184 aminoacids induced by elicitors (AAR83862) and a protein of *Arabidopsis thaliana* (AAM62648) of 182 aminoacids, induced by dehydration (Figure

Cuadro 1. Características y similaridad de secuencias de clones de cADN identificados por despliegue diferencial de ARN mensajero. Table 1. Characteristics and similarity of sequences of clones of cDNA identified by differential display of mRNA.

Clon cADN	Tamaño inserto (pb)	Tamaño transcrito (kb)	Principal homología [†]	Núm. accesión GenBank	Función propuesta
T19	724	N/d	Proteína despolimerizante de actina (factor 1 y 2) de <i>Petunia hybrida</i>	AY038063 AF183904	Morfogénesis celular
T21	654	N/d	Proteína inducida por elicitores de <i>Capsicum annuum</i>	BAB13708	Respuesta a patógenos
T23	809	1	Proteína inducida por deshidratación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	AAM62648	Respuesta a estrés por deshidratación
T14	750	0.75	Proteína inducida por frío y salinidad de <i>Arabidopsis thaliana</i>	AAK50618 AAK50619	Respuesta a estrés por frío
T210	767	1	Proteína asociada a Fimbriata de <i>Antirrhinum majus</i> y proteína homóloga a Skp1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	T17030 T51309	Degradación de proteínas
H11	931	1.8	Activadora de Rubisco de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Zantedeschia aethiopica</i>	NP850320 AAK25801	Fotosíntesis

[†] Corresponde al puntaje más alto de coincidencias con la secuencia de proteínas, N/d significa no determinado.

Clones T21 y T23

Estos cADN presentan una secuencia similar y muestran homología con varias proteínas de respuesta a estrés. El clon T21 presenta homología con una proteína putativa de *Oryza sativa* de 163 aminoácidos inducida por elicitores (NP_921022) y con una proteína de *Capsicum annuum* (AAO49266) de 158 aminoácidos inducida por el virus del mosaico del tabaco TMV (Figura 3B). El clon T23 presenta homología con una proteína de *C. annuum* de 184 aminoácidos inducida por elicitores (AAR83862) y una proteína de *Arabidopsis thaliana* (AAM62648) de 182 aminoácidos, inducida por deshidratación (Figura 3C). Ambos clones presentan homología con una proteína de *C. annuum* de 177 aminoácidos inducida por elicitores (BAB13708) y una proteína de *Lycopersicon esculentum* en respuesta a heridas (AAU03363). Además, presentan homología con algunas proteínas desconocidas de arroz (AAK13138) y una proteína putativa de *Arabidopsis* (AAL84978). El estrés provoca respuestas complejas en las plantas y constituye un problema fundamental para la agricultura, ya que influye sobre la supervivencia y la productividad de los cultivos; el estrés hídrico, que incluye sequía y salinidad, inhibe el crecimiento celular (Zhu, 2000). La expresión de genes inducidos por elicitores es considerada como una reacción de defensa activada por la maquinaria bioquímica de la planta para garantizar la supervivencia, persistencia y competitividad (Radman *et al.*, 2003).

Clon T14

Este cADN muestra homología con proteínas pequeñas de respuesta a bajas temperaturas y salinidad

3C). Both clones present homology with a protein of *C. annuum* of 177 aminoacids induced by elicitors (BAB13708) and a protein of *Lycopersicon esculentum* in response to wounding (AAU03363). In addition, they present homology with some unknown rice proteins (AAK13138) and a putative protein of *Arabidopsis* (AAL84978). Stress triggers complex responses in plants and constitutes a fundamental problem for agriculture, as it influences the survival and productivity of the crops; water stress, which includes drought and salinity, inhibits cellular growth (Zhu, 2000). The expression of genes induced by elicitors is considered to be a defense reaction activated by the biochemical machinery of the plant to guarantee survival, persistence and competitiveness (Radman *et al.*, 2003).

Clone T14

This cDNA presents homology with small proteins of response to low temperatures and salinity (Figure 3D) It especially shows homology with a pair of proteins of *Arabidopsis* of 54 aminoacids denominated RCI12A (NP_187239) and RCI2B (NP_187240). In addition, it shows high homology with another protein of *A. thaliana* denominated LTI6B (AAF23227) and a protein of response to salinity of *Solanum tuberosum* (BAC23051). The molecular and genetic study of responses to abiotic stress makes it possible to identify numerous genes related to stress tolerance (Thomashow, 1999). The first group includes proteins that protect directly the cell from stress, such as LEA proteins, proteins that can be induced by heat (heat shock proteins), proteins induced by cold, and proteins related to the biosynthesis of osmoprotectors.

(Figura 3D); especialmente presenta homología con un par de proteínas de *Arabidopsis* de 54 aminoácidos denominadas RCI12A (NP_187239) y RCI2B (NP_187240). Además, presenta alta homología con otra proteína de *A. thaliana* denominada LTI6B (AAF23227) y una proteína de respuesta a salinidad de *Solanum tuberosum* (BAC23051). El estudio molecular y genético de las respuestas al estrés abiótico permiten identificar numerosos genes relacionados con la tolerancia al estrés (Thomashow, 1999). El primer grupo incluye proteínas que protegen directamente a la célula del estrés, como proteínas LEA, proteínas inducibles por el calor (heat shock), proteínas inducibles por frío, y proteínas relacionadas con la biosíntesis de osmoprotectores. En el segundo grupo hay proteínas regulatorias, que son factores involucrados en la regulación de la expresión génica y la transducción de señales (Shinosaki y Yamaguchi-Shinosaki, 2000).

Clon T210

Su secuencia deducida de aminoácidos muestra 77% de identidad con la proteína asociada a fimbriata (FAP) de *Antirrhinum majus* (T17030) y 73% de identidad con una proteína homóloga a SKP1 de *A. thaliana* (T51309) y homóloga a la proteína Skp1 (AAC14444), de levadura (Figura 3E). Esta proteína de *Arabidopsis*, codificada por el gen At1g75950, es una subunidad del complejo SCF, una E3-ubiquitina-ligasa (Schouten *et al.*, 2000). Esta proteína de 161 aminoácidos es codificada en *A. majus* por *fap1*, que a su vez parece ser miembro de una pequeña familia de genes que incluye también a *fap2* y *fap3*. La familia de proteínas FAP presenta alta similitud con las proteínas SKP1 descritas en levadura y humanos. En estos sistemas las proteínas interactúan con otras que contienen cajas F (Takahashi *et al.*, 2004), para formar un complejo necesario para la degradación de proteínas, especialmente factores de transcripción, y para el control del progreso del ciclo celular (Ingram *et al.*, 1997).

Clon H11

El clon H11 presenta homología significativa con una forma de la activadora de Rubisco de *A. thaliana* (RCA) aún no caracterizada y ubicada en el cromosoma I (80% de identidad; NP850320); una RCA de 426 aminoácidos de *Zantedeschia aethiopica* (AAK25801); una RCA de *Nicotiana tabacum* (1909374A) y una RCA de *Medicago sativa* (AAN15946) de 270 aminoácidos (Figura 3F). La Rubisco activasa es una proteína requerida en plantas superiores para mantener y regular la actividad de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa, enzima conocida como Rubisco

In the second group there are regulatory proteins, which are factors involved in the regulation of genetic expression and the transduction of signals (Shinosaki and Yamaguchi-Shinosaki, 2000).

Clone T210

Its sequence, deduced from amino acid, shows 77% identity with the protein associated to fimbriata (FAP) of *Antirrhinum majus* (T17030) and 73% identity with protein homologous to SKP1 of *A. thaliana* (T51309) and homologous to the protein Skp1 (AAC14444) of yeast (Figure 3E). This protein of *Arabidopsis*, codified by the gene At1g75950, is a subunit of the SCF complex, an E3-ubiquitin ligase (Schouten *et al.*, 2000). This protein of 161 amino acids is codified in *A. majus* by *fap1*, which in turn appears to be a member of a small family of genes that also includes *fap2* and *fap3*. The family of proteins FAP presents high similarity with the SKP1 proteins described in yeast and humans. In these systems, the proteins interact with others that contain F boxes (Takahashi *et al.*, 2004), to form a complex necessary for the degradation of proteins, especially transcription factors, and for control of the cellular cycle progress (Ingram *et al.*, 1997).

Clone H11

Clone H11 presents significant homology with a form of the Rubisco activator of *A. thaliana* (RCA), which has yet to be characterized and is located in chromosome I (80% identity; NP850320); an RCA of 426 amino acids of *Zantedeschia aethiopica* (AAK25801); an RCA of *Nicotiana tabacum* (1909374A) and an RCA of *Medicago sativa* (AAN15946) of 270 amino acids (Figure 3F). Rubisco activase is a protein required in higher plants to maintain and regulate the activity of ribulose 1,5-bisulfate carboxylase/oxygenase, an enzyme known as Rubisco (Portis, 2003). It is a molecular chaperone that is highly conserved in the photosynthetic organisms and is also found in eukaryotes (Roesler and Ogren, 1990). For different plant species, a variable number of genes has been reported: in dicotyledons, the RCA is codified by one to five genes (Werneke *et al.*, 1988); in monocotyledons, two genes have been detected (Zhang and Komatsu, 2000).

CONCLUSIONS

Forty-five differentially expressed partial cDNAs were isolated and cloned in *Zantedeschia* spp. Some of these partial cDNAs were studied using the

Figura 3A.

Clon T19	A S R R M R K P T G	S L G T L D L G S E	F C Q F R K H P A L	V V L V A I A S C S	S P K M A N A A S G
AAM61326	M A N A A S G M A V	H D D C K L R F L E	L K A K R T H R F I	V Y K I E E K Q K Q	V I V E K V G E P I
AY038063	M A N A A S G M A V	H D D C K L R F L E	L K A K R T H R F I	V Y K I E E K Q K Q	V V V E K I G E P T
AF183904	M A N A A S G M A V	H D D C K L K F L E	L K A K R T Y R F I	I Y K I E E K Q K E	V V V E K L G E P T
CAB88325	M A N A A S G M A V	H D D C K L R F L E	L K A K R T H R F I	V Y K I E E K Q K Q	V V V E K V G Q P I
Clon T19	M A V N D D C K L K	F L E L K A K R T H	R F V I F K I D E K	L K Q V V V E K V G	E P T L S Y E D F T
AAM61326	L T Y E D F A A S L	P A D E C R Y A I Y	D F D F V T A E N C	Q K S K I F F I A W	C P D V A K V R S K
AY038063	E S Y E D F A A S L	P E N E C R Y A V Y	D F D F V T A E N C	Q K S R I F F I A W	C P D T A R V R S K
AF183904	E S Y E D F T A G L	P A D E C R Y A V Y	D F D F M T K E N H	Q K S R I F F I A W	S P D T A R V R S K
CAB88325	Q T Y E E F A A C L	P A D E C R Y A I Y	D F D F V T A E N C	Q K S K I F F I A W	C P D I A K V R S K
Clon T19	A S L P A N E C R Y	A I Y D F D F V T E	E N C Q K S K I F F	I A W S P D T S R V	R S K M L Y A S S K
AAM61326	M I Y A S S K D R F	K R E L D G I Q V E	L Q A T D P T E M D	L D V L K S R V N -	- - - - - - - - -
AY038063	M I Y A S S K D R F	K R E L D G I Q V E	L Q A C D P T E M D	L D V I Q S R A N -	- - - - - - - - -
AF183904	M I Y A S S K D R F	K R E L D G I Q V E	L Q A T D P T E M D	L D V L K S R A G G	I E C - - - - -
CAB88325	M I Y A S S K D R F	K R E L D G I Q V E	L Q A T D P T E M D	L D V L K S R A N -	- - - - - - - - -

Figura 3B.

Clon T21	G T T F E H T Q T K	Q D G A Q G R T H H	L P L P R R H H H P	P C C I K A A R G R	R V P V H H L R P N
BAB13708	M G V A H Q V N Q F	W F P L I I L L L S	I T I S S T S G A E	S N C V Y T A Y I R	T G P F M E D A T D
NP_921022	M N K L S L A L A S	Y L I L F L A A A A	T A A T T R C T F E	I V V K T D G R R N	A G T D A R V S L Q
AAU03363	M G V A A Q V N Q M	W F N L M I V L F F	V S I S S I S A E D	C V Y T A Y I R T G	S I I K A G T D S N
AAO49266	M Q E T N N C I Y T	A Y V R T G P F D E	D A T D S K I T L T	L Y D A N G H G I R	I N N L V A W G G L
Clon T21	R * H S * C R H R R	R R Q P R H L R P P	R R G Q G P R H S Q	L A G V G P D G A W	L R L L R E G K S R
BAB13708	S K I S L T L Y D A	S G Y G I R I K N L	V A W G G L M G S G	Y N Y F E T D H S D	M F S G H G P C L T
NP_921022	V R A A R G P T L T	V A N L E S W G Q M	A A G H D Y F E K G	N L D R F R G A G D	C M P S E P C N M V
AAU03363	I S L T L Y D A N G	Y G L R I K N I E A	W G G L M G P G Y N	Y F E R G N L D I F	S G K G P C V N G P
AAO49266	M G K G Y N Y F E R	E N L D M F S G K G	P C L N G T I C K M	V L A S D G T G R N	H E W F C N Y V E V
Clon T21	L L F R P G E L S L	R P A L L D V A R P	R R H W Q Q T W V V	R * P R L G D H G S	L G Q C A R R P A P
BAB13708	G P I C K M V L T S	D G T G R Q S A W Y	C S Y V E V T S T G	D H K Q C S Q Q L F	N V D Q W L S T D R
NP_921022	L T S D G S G N K P	G W Y V S Y V M V T	Q L G Q G R L P S M	T H R W A V D Q W L	A I D E A P H M L T
AAU03363	I C K M N L T S D G	T G P H H G W Y C N	Y V E V T V T G A K	K Q C N Q Q L F T V	N Q W L G T D V S P
AAO49266	T S T G A H K R C S	Q Q L F T V D Q W L	S T N R S P Y Q L S	A T R N N C R M S	D E Q Q P L Y D S E
Clon T21	V Q G * P V A G A G	R V A K P A G D Y A	E R L R Q * Q * H *	D A I R V A G C R V	A P L G * A C E D Q
BAB13708	S P Y Q L T A T R N	N C R R M S G D Q Q	P I V V D V I - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -
NP_921022	A E R R G C G I G A	A A P - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -
AAU03363	Y K L T A I R N N C	K N K Y E S G E L K	P L Y D S E S E S I	V D V I - - - - -	- - - - - - - - -
AAO49266	S N H V V D V I - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -

(Portis, 2003). Es una chaperona molecular muy conservada en los organismos fotosintéticos y se encuentra también en eucariontes (Roesler y Ogren, 1990). Para distintas especies vegetales se ha reportado un número variable de genes: en plantas dicotiledóneas la RCA está codificada por uno a cinco genes (Werneke *et al.*, 1988); en monocotiledóneas se han detectado dos genes (Zhang y Komatsu, 2000).

CONCLUSIONES

Se aislaron y clonaron 45 cADN parciales expresados diferencialmente en *Zantedeschia* spp. Algunos de estos cADN parciales se estudiaron mediante la

Northern blot technique and at least three clones were identified with expression in leaf, sprout and tuber. The sequence T2.10 is particularly interesting due to its possible function in the specific degradation of transcription factors. The partial sequences in T2.3 and in H11 present significant homologies with a putative protein of *A. thaliana* induced by elicitor, and with a form of Rubisco activase of *A. thaliana* which has not yet been characterized and is located in chromosome I, respectively. Based on the function of the analyzed products, it can be concluded that the differential display of mRNA is a useful technique for studying genetic expression in *Zantedeschia* spp. The isolation of the complete sequence of these three genes

Figura 3C.

Clon T23	D T T F V H T Q R K	Q G N M A L K A V L	I S P F F F L F L A	G I I T L P A S K	Q L G E G E C L Y T
AAR83862	M G V A Q V N H I W	F Y L M I I L F S I	S I S S I A A S E D	D C V Y T A Y I R T	G A I I K A G T D S
AAU03363	M G V A A Q V N Q M	W F N L M I V L F F	V S I S S I S A E D	C U Y T A Y I R T G	S I I K A G T D S N
AAM62648	M P R R D V L F L S	L L L V I A T V S A	V A L A D D E A D C	V Y T F Y L R T G S	T F K A G T D S I I
BAB13708	M G V A H Q V N Q F	W F P L I I L L L S	I T I S S T S G A E	S N C V Y T A Y I R	T G P F M E D A T D
Clon T23	I Y V Q T G D I A D	A A T D A V V S L V	I S D H P G A G W L	R L L R E G K S R L	L F R P G E L P L R
AAR83862	N I S L T L Y D A D	G Y G L R I K N I E	A W G G L M G P G Y	N Y F E R G N L D I	F S G R G P C L A G
AAU03363	I S L T L Y D A N G	Y G L R I K N I E A	W G G L M G P G Y N	Y F E R G N L D I F	S G K G P C V N G P
AAM62648	S A R V Y D K Y G D	Y I G I R N L E A W	G G L M G P G Y N Y	Y E R G N L D I F S	G K A P C L P S P V
BAB13708	S R I S L T L Y D A	S G Y G I R I K N L	V A W G G L M G S G	Y N Y F E T D H S D	M F S G H G P C L T
Clon T23	P A L L D A A R P R	Q H W Q Q T W V V R	R P R I G D H G A P	G Q R A R R P A L V	Q G * P V A G A G R
AAR83862	P I C K M N L T S D	G T G P H H G W Y C	N Y V E V T V T G A	H K Q C I Q Q L F N	V E Q W L G T D V S
AAU03363	I C K M N L T S D G	T G P H H G W Y C N	Y V E V T V T G A K	K Q C N Q Q L F T V	N Q W L G T D V S P
AAM62648	C S L N L T S D G S	G D H H G W Y V N Y	V E V T T A G V H A	K C S Y Q S F D V E	Q W L A S D T S P Y
BAB13708	G P I C K M V L T S	D G T G R Q S A W Y	C S Y V E V T S T G	D H K Q C S Q Q L F	N V D Q W L S T D R
Clon T23	V A E P A G D H P K	R L R Q * Q * H * D	V I R L A G C H G S	S Q R R G E * A D G	W Q R T Q A N V T S
AAR83862	P Y K L T A I R N N	C N K P K S S E E Q	P I Y D S E S Y T T	V D V I - - - - -	- - - - -
AAU03363	Y K L T A I R N N C	K N K Y E S G E L K	P L Y D S E S F S I	V D V I - - - - -	- - - - -
AAM62648	E L S A V R N N C P	V S L R E S V G R V	G S E I R K T L S W	I V - - - - -	- - - - -
BAB13708	S P Y Q L T A T R N	N C R R M S G D Q Q	P I V V D V I - - -	- - - - -	- - - - -

Figura 3D.

Clon T19	I Q Q L P S L R L L	S L L S L W Q S R F	E K V R G R E G G G	R * V A D S P G G G	G S I W P A A R L L
AAM61326	M S T A T F V E I I	L A I I L P P L G V	F L K F G C K V E F	W I C L I L T L F G	Y L P G I L Y A L Y
AY038063	M S T A T F V E I I	L A I I L P P L G V	F L K F G C K V E F	W I C L I L T L F G	Y L P G I L Y A L Y
AF183904	M S T A T F V D I I	I A I I L P P L G V	F L R F G C G V E F	W I C L V L T L L G	Y I P G I I Y A I Y
CAB88325	M G D S T M T C V D	I L L A I I L P P L	G V F L K F G C K V	E F W I C V L L T L	F G W L P G I V Y A
Clon T19	L S T Y C W P S S F	P L S A S S S S L D	A R W S F G S A W C	* R C S G T S P A S	S T P C M P S P S R
AAM61326	I I T K - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
AY038063	I I T K - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
AF183904	V L T K - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
CAB88325	V W V L T K - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -

Figura 3E.

Clon T210	A S Q H N R E P L P	L L P P P A I S P S	P F A F A F V F S A	A G R S V H G S R R	G G G R L E E A D
AAC14444	M S A K K I V L K S	S D G E S F E V E E	A V A L E S Q T I A	H M V E D D C V D N	G V P L P N V T S K
T17030	L K T K K I T L R S	S D G E V F E V E E	S L A L E S Q T I K	H M I E D D C A D N	V I P L P N V T S K
T51309	M S A K K I V L K S	S D G E S F E V E E	A V A L E S Q T I A	H M V E D D C V D N	G V P L P N V T S K
Clon T210	T E E L R R G G V R	G G G D G S H G V A	D H P E P D R G R L	H R R R R P A A Q R	H R E D P R Q G D R
AAC14444	I L A K V I E Y C K	R H V E A A A S K A	E A V E G A A T S D	D D L K A W D A D F	M K I D Q A T L F E
T17030	I L S K V I E Y C K	R H V D A A A A K A	D D K L A S T G T S	D D E L K A F D A D	F V K V D Q A T L F
T51309	I L A K V I E Y C K	R H V E A A A S K A	E A V E G A A T S D	D D L K A W D A D F	M K I D Q A T L F E
Clon T210	V L Q E A R G D R R	P * G G R G R G P S	R R R G A Q G L G C	R L R E G R P D H P	L R P H P G S K L F
AAC14444	L I L A A N Y L N I	K N L L D L T C Q T	V A D M I K G K T P	E E I R T T F N I K	N D F T P E E E E E
T17030	D L I L A A N Y L N	I K T L L D L T C Q	T V A D M I K G K T	P E E I R K T F N I	K N D F T P E E E E
T51309	L I L A A N Y L N I	K N L L D L T C Q T	V A D M I K G K T P	E E I R T T F N I K	N D F T P E E E E E
Clon T210	E H Q E P A * S D L	S N C C * H D Q R E	D P R G D Q E D F *	H Q E R L H S R G K	K R G T P * E P M G
AAC14444	V R R E N Q W A F E	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
T17030	E V R R E N Q W A F	E - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
T51309	V R R E N Q W A F E	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -

Figura 3F.

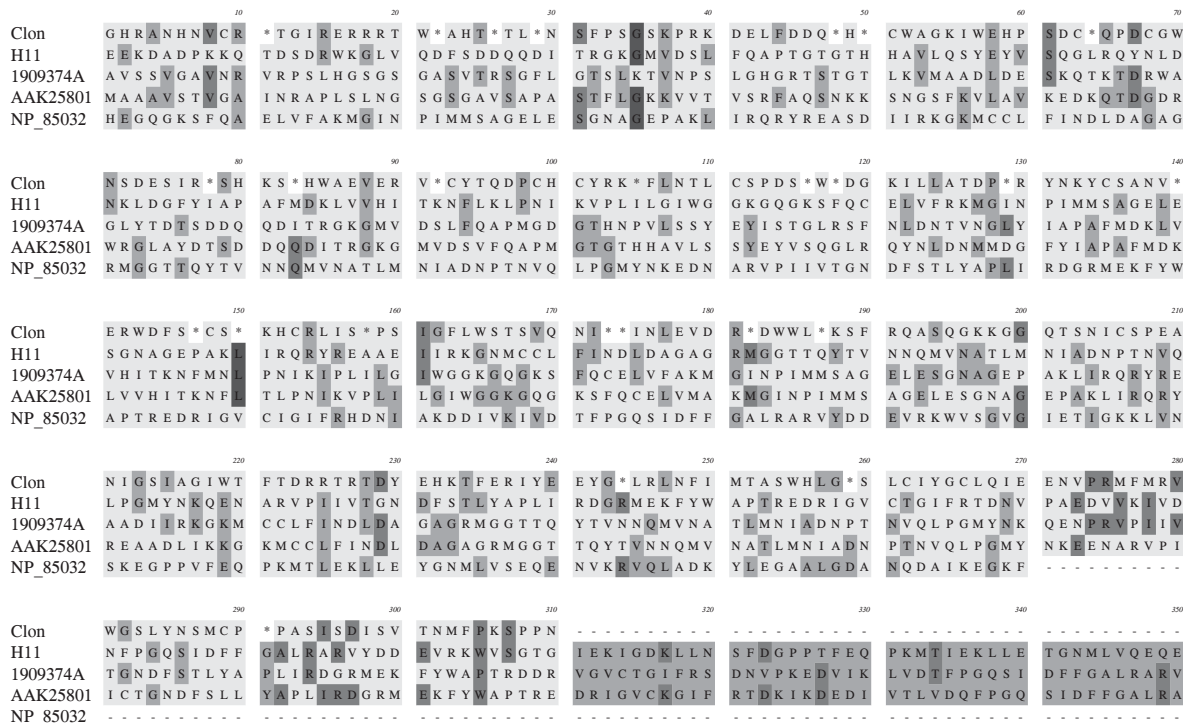


Figura 3. Alineamientos múltiples de la secuencias deducida de aminoácidos de cada clon con las proteínas del banco de genes del NCBI. El alineamiento múltiple se hizo con el algoritmo Clustal W y la matriz BLOSUM en el programa DS Gene. EL color gris muestra el porcentaje de similitud entre los aminoácidos analizados. Figura 3A. Alineamiento múltiple del Clon T19. Figura 3B. Alineamiento múltiple del Clon T21. Figura 3C. Alineamiento múltiple del Clon T23. Figura 3D. Alineamiento múltiple del Clon T14. Figura 3E. Alineamiento múltiple del Clon T210. Figura 3F. Alineamiento múltiple del Clon H11.

Figure 3. Multiple alignments of the amino acid deduced sequences for each clone with the proteins from the NCBI gene bank. Multiple alignment was performed with the Clustal W algorithm and BLOSUM matrix in the DS Gene program. Gray color shows similarity percentage between analyzed amino acids. Figure 3A. Multiple alignment of T19 Clone. Figure 3B. Multiple alignment of T21 Clone. Figure 3C. Multiple alignment of T23 Clone. Figure 3D. Multiple alignment of T14 Clone. Figure 3E. Multiple alignment of T210 Clone. Figure 3F. Multiple alignment of H11 Clone.

técnica de transferencia de fragmentos ARN Northern y se identificaron al menos tres clones con expresión en hoja, brote y tubérculo. La secuencia T2.10 es particularmente interesante por su posible función en la degradación específica de factores de transcripción. Las secuencias parciales en T2.3 y en H11 presentan homologías significativas con una proteína putativa de *A. thaliana* inducida por elicitador, y con una forma de Rubisco activasa de *A. thaliana* aún no caracterizada y ubicada en el cromosoma I, respectivamente. Con base en la función de los productos analizados, se puede concluir que el despliegue diferencial de mRNA es una técnica útil para estudiar la expresión génica en *Zantedeschia* spp. El aislamiento de la secuencia completa de estos tres genes y el análisis detallado de su patrón de expresión, representan un avance para entender la función que cumplen en los distintos procesos que ocurren en

and the detailed analysis of their expression pattern, represent an advancement for understanding the function they have in the different processes occurring in the development, photosynthesis and response to pathogens in *Zantedeschia* spp.

—End of the English version—



el desarrollo, fotosíntesis y respuesta a patógenos en *Zantedeschia* spp.

AGRADECIMIENTOS

Los autores queremos agradecer el apoyo brindado por Pamela Leal becaria de la Dirección de Postgrado de la Universidad de La Frontera, Adolfo Salvo becaria de la Fundación Andes 13640 -10

(Fundación Andes, Chile), al proyecto DIUFRO 120202, MECESUP FRO0002, MECESUP FRO9802 (Ministerio de Educación, Gobierno de Chile) y a VitroGen S. A. por los fondos entregados para desarrollar esta línea de investigación.

LITERATURA CITADA

- Arce-Johnson, P., M. Moreno, I. Acuña, M. Gebauer, P. Dell'Orto, H. Torres, P. Oligier, A. Venegas, X. Jordana, J. Kalazich, and L. Holuigue. 1999. Enhanced resistance to bacterial infection in transgenic potato plants expressing the attacin and the cecropin SB-37 genes. *Am. J. Potato Res.* 75: 1-9.
- Düring, K., P. Porsch, M. Fladung, and H. Lörz. 1993. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *Plant J.* 3: 587-598.
- Funnell, K. 1993. *Zantedeschia*. In: *The Physiology of Flower Bulbs*. De Hertogh, A., and M. Lenard (eds). Elsevier. Amsterdam. pp: 683-703.
- Ingram, G., S. Doyle, R. Carpenter, E. Schultz, R. Simon, and E. Coen. 1997. Dual role for fimbriata in regulating floral homeotic genes and cell division in *Antirrhinum*. *EMBO J.* 16: 6521-6534.
- Jeong-Hwan, M., Y. Hee-Ju, L. Hyeon-Se, K. Young-Myung, L. Jong-Seob, L. Ilha, and K. Sang-Gu. 2000. Two closely related cDNAs encoding actin-depolymerizing factors of petunia are mainly expressed in vegetative tissues. *Gene* 257: 167-176.
- Kuehny, J. 2000. Calla history and culture. *HortTechnology* 10: 267-274.
- Liang, P., and A. Parde. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15: 473-497.
- Portis, A. Jr. 2003. Rubisco activase: Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynth. Res.* 75: 11-27.
- Radman, R., T. Saez, C. Bucke, and T. Keshavarz. 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37: 91-102.
- Robinson, A., C. Clark, and J. Clemens. 2000. Using ¹H magnetic resonance imaging and complementary analytical techniques to characterize developmental changes in the *Zantedeschia* Spreng tuber. *J. Exp. Botany* 51: 2009-2020.
- Roesler, K., and W. Ogren. 1990. Primary structure of *Chlamydomonas reinhardtii* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase and evidence for a single polypeptide. *Plant Physiol.* 95: 1837-1841.
- Sambrook, L., E. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. Chapter 6: 6.33-6.64 and Chapter 7: 7.21-7.45.
- Schouten, J., R. de Kam, K. Fetter, and J. Hoge. 2000. Overexpression of *Arabidopsis thaliana* SKP1 homologues in yeast inactivates the Mig1 repressor by destabilizing the F-box protein Grr1. *Mol. Gen. Genet.* 263(2): 309-19.
- Serrano, C., P. Arce-Johnson, H. Torres, M. Gebauer, M. Gutiérrez, M. Moreno, X. Jordana, A. Venegas, J. Kalazich, and L. Holuigue. 2000. Expression of the chicken lysozyme gene in potato enhances resistance to infection by *Erwinia carotovora* Subs. Atroseptica. *Am. J. Potato Res.* 77: 191-199.
- Shinozaki, K., and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 217-223.
- Singh, Y., A. Van Wyk, and H. Bajnath. 1996. Taxonomic notes on the genus *Zantedeschia* Spreng (Araceae) in southern Africa. *South Afr. J. Bot.* 62: 321-324.
- Snijder R., H. Cho, M. Hendriks, P. Lindhout, and J. Van Tuyl. 2004. Genetic variation in *Zantedeschia* spp. (Araceae) for resistance to soft rot caused by *Erwinia carotovora* Subsp. *carotovora*. *Euphytica* 135: 119-128.
- Staiger, C., B. Gibbon, D. Kovar, and L. Zonia. 1997. Profilin and actin-depolymerizing factor: modulators of actin organization in plants. *Trends Plant Sci.* 2: 275-281.
- Takahashi, N., H. Kuroda, T. Kuromori, H. Hirayama, M. Seki, K. Shinozaki, H. Shimada, and M. Matsui. 2004. Expression and interaction analysis of arabidopsis Skp1-related genes. *Plant Cell Physiol.* 45(1): 83-91.
- Thomashow, M. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 571-599.
- Werneke, J., R. Zielinski, and W. Ogren. 1988. Structure and expression of spinach leaf complementary DNA encoding ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase activase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:787-791.
- Wright, P., and G. Burge. 2000. Irrigation, sawdust mulch, and enhance (R) biocide affects soft rot incidence, and flower and tuber production of calla. *New Z. J. Crop Hort. Sci.* 28: 225-231.
- Zhang, Z., and S. Komatsu. 2000. Molecular cloning and characterization of cDNAs encoding two isoforms of ribulose-1,5- biphosphate carboxylase/oxygenase activase in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Biochem* 128: 383-389.
- Zhu, J. 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 124: 941-948.