

TRANSFERENCIA DEL GEN *SKI2* DE LEVADURA AL TABACO

TRANSFER OF THE YEAST GENE *SKI2* TO TOBACCO

Cecilia M. Rodríguez-García¹, Françoise Vilaine² y Christophe Robaglia³

¹Centro de Investigación Científica de Yucatán. Unidad de Biotecnología. Apartado Postal 87. Cordemex. 97310 Mérida, Yucatán. (koyi@cicy.mx). ²Institute National de la Recherche Agronomique. Laboratoire de Biologie Cellulaire. Versailles 78026. Route de Saint Cyr, France. Fax: 0033130833099. ³Département d'Ecophysiologie Végétale et Microbiologie, CEA. Cadarache 13108, Saint Paul lez Durance Cedex, France. (robaglia@dsvsud.cea.fr)

RESUMEN

En la búsqueda de nuevas estrategias de resistencia antiviral, se estudió la expresión del gen *SKI2* obtenido mediante PCR a partir del ADN genómico de una cepa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en tabaco (*Nicotiana tabacum*). El gen codifica una proteína que bloquea la traducción de ARN virales que no poseen cofia y cola de poli(A). Existen virus de plantas con iguales características, como el virus de la necrosis del tabaco (VNT) y el virus Y de la papa (VYP). Se obtuvieron plantas transgénicas de tabaco portando el gen *SKI2*, en los cuales se observaron eventos de inactivación del transgen; plantas sensibles a la kanamicina portando el transgen *NPTII* completo y plantas resistentes a la kanamicina sin expresar el gen *SKI2*, a excepción de una planta resistente que expresó un fragmento del gen *SKI2*. Las plantas transgénicas no mostraron resistencia a la infección por VNT y VYP.

Palabras clave: *Nicotiana tabacum*, *Saccharomyces cerevisiae*, plantas transgénicas.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de métodos de transformación de plantas y el conocimiento de las bases moleculares del ciclo viral han permitido la aplicación de nuevas estrategias de resistencia, como la creación de plantas transgénicas que expresan genes de origen viral. La expresión de estos genes en una célula hospedera puede interferir con el ciclo viral, que es la base del concepto de resistencia derivada del patógeno (Sanford y Johnston, 1985). Sin embargo, además de la resistencia específica que se genera, existen riesgos potenciales de encapsidación de partículas virales heterólogas (heteroencapsidación) y de recombinación que podrían cambiar las características del virus así como su capacidad patogénica (Tepfer, 1993). Por ello, la búsqueda de nuevas estrategias para crear una resistencia de amplio espectro ha conducido a la utilización de genes de origen no viral. Por

ABSTRACT

In the search for novel antiviral resistance strategies, the expression of the yeast gene *SKI2*, obtained by PCR from genomic DNA of a single yeast strain (*Saccharomyces cerevisiae*) in tobacco (*Nicotiana tabacum*) was studied. This gene encodes a protein which blocks the translation of non-capped, non-polyadenylated viral RNA. There are plant viruses with these characteristics, such as tobacco necrosis virus (TNV) and potato virus Y (PVY). Transgenic tobacco plants were obtained which carried the *SKI2* gene and in which the following silencing events were observed: kanamycin-sensitive plants carrying the complete *NPTII* gene, kanamycin-resistant plants which did not express the *SKI2* gene, and one kanamycin-resistant plant which expressed a fragment of the *SKI2* gene. None of the transgenic plants showed resistance to TNV or PVY viral infection.

Key words: *Nicotiana tabacum*, *Saccharomyces cerevisiae*, transgenic plants.

INTRODUCTION

The development of plant transformation methods and the knowledge of the molecular basis of the viral cycle have permitted the implementation of new strategies for obtaining viral resistance in plants such as the creation of transgenic plants expressing viral genes. The expression of these genes in a host cell can also interfere with the viral cycle; the basis of the pathogen-resistance hypothesis (Sanford and Johnston, 1985). However, besides the specific resistance generated, there are potential risks such as the encapsidation of heterologous viral particles (heteroencapsidation) and recombination, which could change the viral characteristics and its virulence (Tepfer, 1993). For this reason the search for new strategies to create a wide-spectrum resistance has been conducted using non-viral genes. For example, the expression of animal genes such as those coding for synthetase 2', 5' oligoadenylate and L ribonuclease (enzymes involved in the mechanism of mammalian antiviral resistance) transfer resistance to cucumber mosaic virus in tobacco (CMV) (Ogawa *et al.*,

Recibido: Abril, 2001. Aprobado: Octubre, 2002.

Publicado como NOTA en *Agrociencia* 36: 675-681. 2002.

ejemplo, la expresión de genes animales, como los que codifican la 2', 5' oligoadenilato sintetasa y la ribonucleasa L (enzimas involucradas en mecanismos de resistencia antiviral en mamíferos) confieren al tabaco resistencia al virus del mosaico del pepino (VMC), (Ogawa *et al.*, 1996). Estos resultados sugieren que mecanismos de defensa antiviral existentes en un organismo pueden ser funcionales en otro; esto es, un gene involucrado en el sistema antiviral de la levadura podría ser funcional en tabaco. El gen *SKI2* de la levadura codifica una proteína que regula la traducción de ARNm virales, y aunque el mecanismo de acción de esta proteína es desconocido, los resultados de Widner y Wickner (1993) sugieren que esta proteína altera la estructura del ribosoma, limitando la traducción de los ARNm virales sin cofía y sin cola de poli(A). El objetivo de este estudio fue demostrar si la transferencia y expresión de un gen heterólogo como lo es el gen *SKI2* en tabaco, crearía resistencia contra virus fitopatógenos constituidos por ARN sin cofía y sin cola de poli(A).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del gen *SKI2*

El gen de 3.9 kb fue aislado mediante la reacción de polimerización en cadena (PCR; Perkin Elmer 9600, California, EE.UU.) partiendo de ADN genómico de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) ABI1380. Se utilizaron la polimerasa Pfu (Stratagene) y dos oligonucleótidos específicos complementarios a la secuencia codificante del gen correspondiente a la proteína ski2p, 5' CTAATTTATATGTC-TGAGGG 3' (sentido) y 5' CAAACATAAATATCTCT-CGAG 3' (antisentido).

Construcciones realizadas

El gen *SKI2* clonado en el sitio *EcoRV* de pBlueScriptKS (Stratagene) fue digerido con *Sall* y *XbaI*. Las extremidades del inserto fueron llenadas parcialmente con los nucleótidos C y T para subclonarlo en pBlueScriptKS+*NotI* (vector modificado), previamente digerido con *BamHI* y *HindIII*, y sometido a un llenado parcial de sus extremidades por los nucleótidos A y G. El vector pBlueScriptKS+*NotI*/*SKI2* fue digerido por *NotI* para obtener el fragmento conteniendo el gen *SKI2* y subclonarlo en el sitio *NotI* del vector pFl61, un vector de expresión en levadura (Minet *et al.*, 1992). Para construir el vector pKYLX71/*SKI2*, el gen fue escindido del vector pBlueScriptKS/*SKI2* con las enzimas *Sall* y *XbaI* y fue clonado en los sitios *XbaI* y *XhoI* del vector binario pKYLX71, un vector de expresión en planta que porta el gen *NPTII* de resistencia a la kanamicina y el promotor 35S² de origen viral (Scharidl *et al.*, 1987).

Complementación de la levadura mutante para *SKI2*

Para verificar que el fragmento obtenido correspondía al gen *SKI2* y que ninguna mutación había sido creada durante la amplificación,

1996). These results suggest that the antiviral defense mechanism present in one organism can be functional in another. For instance, a gene involved in the yeast antiviral system could be functional in tobacco. The yeast gene *SKI2* encodes a protein that regulates the viral mRNA translation and although its mechanism is not yet known, the results from Widner and Wickner (1993) suggest that this protein changes the ribosome structure, limiting the translation of non-capped and non-polyadenylated viral mRNA. The purpose of this study was to demonstrate that the transfer and expression of the heterologous gene *SKI2* in tobacco could confer resistance to a virus consisting of non capped and non-polyadenylated viral RNA.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of the *SKI2* gene

The 3.9 kb gene was isolated by polymerization chain reaction (PCR; Perkin Elmer 9600, California, U.S.A.) from ABI1380 yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) genomic DNA. The Pfu polymerase (Stratagene) and two specific complementary oligonucleotides to the sequence coding the protein ski2p, 5' CTAATTTATATGTC-TGAGGG 3' (sense) and 5' CAAACATAAATATCTCTCGAG 3' (antisense) were used.

Constructions

The *SKI2* gene cloned in the *EcoRV* site of pBlueScriptKS (Stratagene) was digested with *Sall* and *XbaI*. The ends of the insert were partially filled-in with the C and T nucleotides to insert it in pBlueScriptKS+*NotI* (modified vector), which was also digested with *BamHI* and *HindIII* and filled-in with the A and G nucleotides. The pBlueScriptKS+*NotI*/*SKI2* vector was digested by *NotI* to obtain the fragment with the *SKI2* gene and to insert it in the *NotI* site of the yeast expression pFl61 vector (Minet *et al.*, 1992). To construct the pKYLX71/*SKI2* vector, the gene was cut from pBlueScriptKS/*SKI2* with *Sall* and *XbaI* and was inserted in the *XbaI* and *XhoI* sites from the pKYLX71 binary vector, which is a plant expression vector that contains the *NPTII* resistance gene to kanamycin and the 35S² promoter of viral origin (Scharidl *et al.*, 1987).

SKI2 mutant yeast complementation

To verify that the obtained fragment was the *SKI2* gene and that no mutation was created during the amplification, a new strategy was followed: the complementation of a well characterized mutant yeast (donated by Reed Wickner, Department of Health and Human Services, Maryland, U.S.A.). This strategy permits the rapid confirmation of gene function without the necessity of confirming the sequence of the amplified fragment. The mutant strain to *SKI2* gene and the *URA3* gene (sensitive at 8 °C) were transformed with the pFL61/*SKI2* vector. The lithium acetate method was used for transformation (Rose *et al.*, 1990). To verify mutant yeast complementation by the pFL61/*SKI2*

se siguió como nueva estrategia la complementación de una levadura mutante bien caracterizada y proporcionada por Reed Wickner (Department of Health and Human Services, Maryland, EE.UU.). Esta estrategia permite confirmar rápida y verazmente la funcionalidad de un gen sin tener que confirmar la secuencia del fragmento amplificado. La cepa mutante para el gen *SKT2* y el gen *URA3*, sensible a 8 °C, fue transformada con el vector PFL61/*SKT2*. La transformación se hizo siguiendo el método de acetato de litio (Rose *et al.*, 1990). Para verificar que la complementación de la levadura mutante se debió al vector pFL61/*SKT2*, las clonas obtenidas fueron replicadas en un medio sin uracilo conteniendo ácido 5-fluoro-otico (5-FOA) a 8 °C. (Sikorski y Boeke, 1991).

Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

El vector pKYLX71/*SKT2* fue introducido por electroporación (Gene Pulser II, BIO-RAD, EE.UU.) a la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 que porta el plásmido pMP90, el cual posee un gen de resistencia a la gentamicina (Koncz y Schell, 1986). La descarga eléctrica fue de 15 kV cm⁻¹, 25 µF y 200Ω, en cámaras de electroporación de 0.1 cm. Después del choque eléctrico se agregó medio LB (NaCl 10g L⁻¹, Bactotripton 10g L⁻¹, extracto de levadura 5 g L⁻¹, ajuste de pH 7.2 con NaOH 10 N) incubándose a 28 °C durante una hora antes de seleccionarlas en medio conteniendo kanamicina (100 mg L⁻¹) y gentamicina (50 mg L⁻¹).

Transformación de *Nicotiana tabacum*

La transformación de tabaco se realizó via *Agrobacterium tumefaciens* por infección de explantes foliares de tabaco (XHFD8). Los explantes foliares, previamente desinfectados con dicloroisocianurato de sodio, fueron incubados 30 minutos a temperatura ambiente en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) conteniendo la cepa GV3101(pMP90) transformada con pXYLX71/*SKT2*. Después fueron transferidos a medio MS+agar 7 g L⁻¹ durante 48 horas, y posteriormente colocados en medio conteniendo kanamicina (100 mg L⁻¹), cefotaxima (500 mg L⁻¹) benziladenina (1mg L⁻¹) y ácido naftalen acético (0.1mg L⁻¹). Los brotes transformados se transfirieron a un medio selectivo sin hormona de crecimiento y una vez enraizados se pasaron al invernadero.

Análisis de tipo Southern y Northern blot

Se aisló ADN genómico de hojas de plantas transformadas de tabaco siguiendo el procedimiento descrito por Dellaporta *et al.* (1983). Se digirieron 10 µg de ADN total con enzimas de restricción (BRL o Amersham), se fraccionó en un gel de agarosa (0.8%) y se transfirió a una membrana de nylon (Hybond N+, Amersham). Las membranas fueron hibridadas a 65 °C con sondas marcadas con α³²P-dCTP de 800 Ci/mMole (NEN Dupont, Nemours, Bélgica) en SDS (7%), formamida (50%), Na₂HPO₄ (0.25M; pH 7.2), EDTA (1mM), pirofosfato de sodio (0.01%), ADN fragmentado por ultrasonido y desnaturalizado de esperma de salmón (100 µg ml⁻¹) y heparina 100 (µg ml⁻¹). Las membranas se lavaron a 65 °C en 0.2X SSC, 1% SDS y expuestas a una película Kodak X-Omat.

vector, obtained clones were replicated on synthetic media without uracil and containing 5-fluoro-otric acid (5-FOA) at 8 °C (Sikorski and Boeke, 1991).

Agrobacterium tumefaciens transformation

The pKYLX71/*SKT2* vector was introduced by electroporation (Gene Pulser II, BIO-RAD, U.S.A.) into the GV3101 strain from *Agrobacterium tumefaciens*, which carries the gene conferring resistance to gentamycin (Koncz and Schell, 1986). The electric charge was 15 kV/cm, 25 µF and 200Ω, in electroporation chambers of 0.1 cm. After the electric shock, the medium LB (NaCl 10g/L, Bactotryptone 10g L⁻¹, yeast extract 5 g L⁻¹, adjusted to pH 7.2 with NaOH 10 N) was added and the agrobacteria were incubated at 28 °C for one hour before streaking them on media containing kanamycin (100 mg L⁻¹) and gentamycin (50 mg L⁻¹).

Nicotiana tabacum transformation

The tobacco transformation was done via *Agrobacterium tumefaciens* by infection of foliar explants of the XHFD8 line. The foliar explants were previously disinfected with sodium dicloroisocyanurate and incubated for 30 min at room temperature in MS medium (Murashige and Skoog, 1962), which contained the GV3101(pMP90) strain transformed with pXYLX71/*SKT2*. Subsequently foliar explants were transferred onto MS+agar (7 g L⁻¹) media for 48 hours and finally onto media containing kanamycin (100 mg L⁻¹), cefotaxime (500 mg L⁻¹) benzyladenine (1 mg L⁻¹) and naphthaleneacetic acid (0.1 mg L⁻¹). The transformed buds were transferred to selective media without growth regulator and, once rooted, they were transferred to the greenhouse.

Southern and Northern blot analysis

Genomic DNA from transformed tobacco leaves was isolated following the method described by Dellaporta *et al.* (1983). Ten micrograms of total DNA were digested with restriction enzymes (BRL o Amersham), size-fractionated on agarose (0.8%) gel and blotted onto nylon membrane (Hybond N+, Amersham). The membranes were hybridized at 65 °C with probes labelled with α³²P-dCTP of 800 Ci/mMole (NEN Dupont, Nemours, Belgium) in SDS (7%), formamide (50%), Na₂HPO₄ (0.25M; pH 7.2), EDTA (1mM), sodium pyrophosphate (0.01%), salmon sperm DNA fragmented by ultrasound and denatured (100 µg ml⁻¹) and heparin 100 (µg ml⁻¹). Blots were washed at 65 °C in 0.2X SSC, 1% SDS and exposed to Kodak X-Omat film.

Total RNA was isolated according to Verwoerd *et al.* (1989), separated in denaturing gels, transferred to nylon membranes and hybridized with antisense RNA radioactive probes obtained by *in vitro* transcription from the pBlueScript/*SKT2* construction. The hybridizations were made at 65 °C in the solution described above.

Resistance test

The virus TNV was donated by Frank Meulewaeter (Plant Genetic Systems, Belgium) and the necrotic variant of PVY was obtained from

Se extrajo ARN total según Verwoerd *et al.* (1989), se separó en geles desnaturalizantes, se transfirió a membranas de nylon y se hibridó con sondas radiactivas de ARN antisentido, obtenidas por transcripción *in vitro* a partir de la construcción pBlueScript/SKI2. Las hibridaciones se efectuaron a 65 °C en la solución mencionada anteriormente.

Pruebas de resistencia

El virus VNT fue proporcionado por Frank Meulewaeter (Plant Genetic Systems, Bélgica) y el VYP variante necrótica fue obtenido del Departamento de Patología Vegetal del INRA (Versalles, Francia). Los inóculos se prepararon moliendo hojas de plantas infectadas con Na_2HPO_4 (0.06M), K_2HPO_4 (0.06M) a pH 7.2 y β -mercaptoetanol (0.05%). Las hojas de las plantas transformadas se frotaron con carborundum antes de aplicarles 50 μL del inóculo. Las heridas causadas por el frotamiento con el carborundum permitieron al virus infectar la planta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se efectuaron dos transformaciones independientes de tabaco obteniéndose 34 y 28 transformantes primarios por cada evento de transformación. La descendencia F_1 de las plantas que transmitieron la resistencia a la kanamicina mostró una segregación de tipo 3:1.

Inactivación del gen de resistencia a la kanamicina

La pérdida de la resistencia a la kanamicina de la descendencia F_1 de las plantas números 19 y 30, y la presencia del transgen completo *NPTII* detectado por Southern blot en estas plantas (carriles 8 y 1 de la Figura 1), sugieren un fenómeno de inactivación epigenético. Esto es, la expresión del transgen se inactivó sin sufrir éste un cambio en la secuencia, como se ha descrito previamente en la literatura (Matzke y Matzke, 1995; Fagard y Vaucheret, 2000). Se ha demostrado que una secuencia repetitiva (SRP) de ADN genómico de *Petunia hybrida* rica en AT (60%) induce la inactivación de un transgen GUS marcador, por hipermetilación de un sitio Hha de SRP en plantas de tabaco (Lohuis *et al.*, 1995). Diferentes factores pueden haber inactivado el gen de resistencia a la kanamicina (*NPTII*) en las líneas 19 y 30: la composición del ADN del transgen *SKI2*, la inserción del transgen en regiones hipermetiladas del genoma o próximas a ellas, la metilación del promotor viral 35S² fenómeno reportado por Vaucheret *et al.* (1998). Un análisis de metilación permitiría verificar esta hipótesis. Además, la existencia de un gen ortólogo a *SKI2* en *A. thaliana* permite pensar que algo similar existe en tabaco, por lo que el gen endógeno podría desencadenar una inactivación de *SKI2*, en las plantas transformadas, estimulada por una homología de secuencias entre el transgen y el gen

Laboratoire de Patologie Vegetale, INRA (Versalles, France). The inoculates were prepared by grinding leaves from infected plants with Na_2HPO_4 (0.06M), K_2HPO_4 (0.06M) at pH 7.2 and β -mercaptoethanol (0.05%). Leaves of transformed plants were abraded with carborundum before the inoculation of 50 μl of the inoculates. Wounds caused by the friction with the carborundum allowed the viral infection.

RESULTS AND DISCUSSION

Two independent transformations of tobacco were done resulting in 34 and 28 primary transformants from each transformation event. The F_1 descendent of the plants which transmitted the kanamycin resistance showed a segregation type 3:1.

Kanamycin resistance gene inactivation

The loss of kanamycin resistance of the F_1 descendent from the plants number 19 and 30 and the presence of the *NPTII* complete transgene (line 8 and 1, Figure 1), detected by Southern blot in these plants, suggest an epigenetic inactivation event. This suggests that the transgene expression was inactivated without a sequence change as has been previously described in the literature (Matzke and Matzke, 1995; Fagard and Vaucheret, 2000). It has been demonstrated that a repetitive sequence (SRP) of genomic DNA from *Petunia hybrida* rich in AT (60%) induces the GUS marker transgene inactivation by hypermethylation of the Hha site of SRP in tobacco plants (Lohuis *et al.*, 1995). Different factors could have inactivated the kanamycin resistance gene (*NPTII*) in the lines 19 and 30: the DNA composition of the *SKI2* transgene, its insertion into hypermethylated regions of the genome or adjacent to them, the methylation of the 35S² viral promoter, as reported by Vaucheret *et al.* (1998). An analysis of methylation would verify this hypothesis. Moreover, the presence of an orthologous *SKI2* gene in *A. thaliana* could indicate that a similar event has occurred in tobacco. In this case, endogenous gene could promote an inactivation of *SKI2* in the transformed plants, which could be stimulated by homology of sequences between the transgene and the endogenous gene (Meyer and Saedler, 1996); this has been associated with methylation of DNA (Ingelbrecht *et al.*, 1994). It was not possible to detect an orthologous gene to the yeast *SKI2* gene in the control plants.

Kanamycin resistant plants

Of the 62 transformants evaluated, only the transformant line 28 of the second transformation expressed a transcript of small size, which at 2.8 kb, was lower than the expected size (3.9 kb; line 3, Figure 2). As detected by Southern blot (line 10, Figure 1) the gene

endógeno (Meyer y Saedler, 1996) que podría estar asociada con la metilación del ADN (Ingelbrecht *et al.*, 1994). No fue posible detectar un gen ortólogo al *SKI2* de levadura en las plantas testigo.

Plantas resistentes a la kanamicina

De los 62 transformantes evaluados, una planta proveniente de la segunda transformación (la número 28) expresó un transcrito de tamaño inferior al esperado: 2.8 kb en lugar de 3.9 kb (carril 3, Figura 2). Se constató por un análisis Southern blot (carril 10, Figura 1) que el gen estaba completo, por lo que se pensó que la reducción del transcrito pudo deberse a una terminación prematura de la transcripción del gen *SKI2* ocasionada por una señal específica reconocida por la ARN polimerasa en la región codificante, o a un problema de maduración del ARN. Un análisis de la secuencia del fragmento detectado permitiría verificar estas hipótesis.

En las demás plantas transgénicas resistentes al antibiótico, la expresión del gen *SKI2* no se detectó por hibridaciones realizadas sobre los ARN poliA+ ni por la técnica de retrotranscripción por PCR (RT-PCR). Sin embargo, en el análisis del ADN se observó una integración completa del transgen (Carriles 4, 6, 7, y 9, Figura 1) o por lo menos parcial (Carril 5, Figura 1). Otra posible causa de la inactivación del gen *SKI2*, además de las mencionadas, podría ser una degradación rápida de los ARNm del *SKI2* debido a la presencia de ciertas regiones genómicas inestables en plantas. Por ejemplo, una señal potencial de poliadenilación AATAAA que puede afectar la maduración y la poliadenilación de los ARNm vegetales (Joshi, 1987) fue encontrada en la región codificante del gen *SKI2*. Aunado a esto, la evidencia de la existencia de un gen *SKI2* ortólogo al de levadura, en *A. thaliana* (Número de acceso CAB61942) y en el hombre (Dangel *et al.*, 1995), sugiere que este gen se ha conservado a través de la evolución de los eucariotes. Por otro lado, considerando que el gen *SKI2* de levadura está involucrado en un sistema antiviral en levadura, y que el gen ortólogo *SKI2W* del hombre se localiza en una región genómica asociada a la resistencia y sensibilidad de numerosas enfermedades, podría suponerse que el gen tiene una función importante dentro de la resistencia natural de las células eucarióticas.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos sugieren que la expresión del gen *SKI2* de la levadura en tabaco pudo ser inhibida por factores como la composición o la inactivación del mismo gen. En consecuencia, no fue posible constatar si dicho gen puede conferir una resistencia contra los virus fitopatógenos constituidos por ARN sin cofía y sin cola

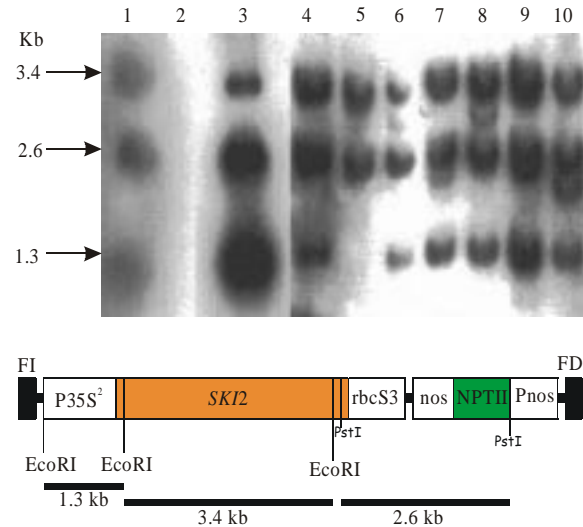


Figura 1. Análisis de ADN genómico de hojas de plantas transformadas y no transformadas de tabaco. El ADN fue digerido con *EcoRI* y *PstI* e hibridado con tres fragmentos del ADN de transferencia de 1.3, 2.6 y 3.4 kb. Carril 2, planta no transformada. Carril 3, plásmido pKYLX71/SKI2 digerido con *EcoRI* y *PstI*. Carriles 1 y 8, plantas números 30 y 19 sensibles a kanamicina. Carriles 4, 6, 7, 9 y 10: plantas números 1, 8, 15, 24 y 28 resistentes a kanamicina. Carril 5: planta número 3 resistente al antibiótico que no presentó la banda correspondiente al promotor 35S2, probablemente debido a una transferencia parcial del ADN de transferencia.

Figure 1. Genomic DNA analysis of leaves from transformed and non-transformed plants of tobacco. DNA was digested with *EcoRI* and *PstI* and was hybridized with three fragments of the T-DNA of 1.3, 2.6 and 3.4 kb. Line 2: non-transformed plant; Line 3: plasmid pKYLX71/SKI2 digest with *EcoRI* and *PstI*; Lines 1 and 8: kanamycin-sensitive plants numbers 30 and 19; Lines 4, 6, 7, 9 and 10: kanamycin-resistant plants numbers 1, 8, 15, 24 and 28; Line 5: kanamycin-resistant plant number 3 that did not show the band corresponding the 35S2 promoter, probably due to the DNA partial transfer.

was complete, and it was concluded that the reduction of the transcript could be either due to the premature termination of the *SKI2* gene transcription caused by a specific signal recognized by the polymerase RNA in the coding region, or complications in RNA maturation. This hypothesis could be verified by sequence analysis of the detected fragment.

In the other transgenic plants resistant to the antibiotic, *SKI2* gene expression was not detected by hybridization of the polyA+ RNA nor by the PCR retrotranscription technique (RT-PCR). However, in the DNA analysis a complete integration of the transgene (lines 4, 6, 7, and 9 Figure 1) or a partial integration (line 5, Figure 1) was observed. Another reason for *SKI2* gene inactivation might be the rapid degradation of the *SKI2* mRNA, which might be stimulated by the presence of certain unstable genomic regions in plants. For example, AATAAA,

de poli(A). Asimismo, la inactivación del gen de resistencia a la kanamicina y la transferencia parcial del ADN-T observadas en algunas de las plantas transformadas, indican que la expresión de un transgen no siempre puede pronosticarse, y que la aplicación potencial de la transformación genética por métodos no convencionales para el mejoramiento de plantas tiene límites considerables.

LITERATURA CITADA

- Dangel, A.W., L. Shen, A. R. Mendoza, L-C. Wu, and C. Y. Yu. 1995. Human helicase gene *SKI2W* in the HLA class III region exhibits striking structural similarities to the yeast antiviral gene *SKI2* and to the human gene KIAA0052: emergence of a new gene family. *Nuclei Acids Research* 12: 2120-2126.
- Dellaporta, S. L., J. Wood, and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology* 1: 19-21.
- Fagard, M. and H. Vaucheret. 2000. (Trans)gene silencing in plants: How many mechanisms?. *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 5: 167-194.
- Ingelbrecht, I., H. Van Houdt, M. Van Montagu, and A. Depicker. 1994. Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proceedings National Academic Sciences* 91: 10502-10506.
- Joshi, C. P. 1987. Putative polyadenylation signal in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis. *Nuclei Acids Research* 15: 9627-9640.
- Koncz, C. and J. Schell. 1986. The promoter of TL-DNA gene 5' controls the tissue specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular General Genetics* 204: 383-396.
- Lohuis, M. ten, A. Muller, I. Heidmann, I. Niedenhof, and P. Meyer. 1995. A repetitive DNA fragment carrying a hot spot for de novo DNA methylation enhances expression variegation in tobacco and petunia. *Plant Journal* 8 (6): 919-932.
- Matzke, M. A., and A. J. M. Matzke. 1995. How and why do plants inactive homologous (trans)genes?. *Plant Phys.* 107: 679-685.
- Meyer, P. and H. Saedler. 1996. Homology-dependent gene silencing in plants. *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 24-48.
- Minet, M., M-E. Dufour, and F. Lacroute. 1992. Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant Journal* 2: 417-422.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15: 473-497.
- Ogawa, T., T. Hori, and I. Ishida. 1996. Virus-induced cell death in plants expressing the mammalian 2', 5' oligoadenylate system. *Nature Biotechnology* 14: 1566-1569.
- Rose, D. M., F. Winston, and P. Hieter. 1990. *Methods in yeast genetics*. Publication: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp: 122 y 123.
- Sanford, J. C., and S. A. Johnston. 1985. The concept of parasite-derived resistance deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal Theoretical Biology* 113:395-405.
- Schardl, C. L., A. D. Byrd, G. Benzion, M. A. Altschuler, D. F. Hildebrand, and A. G. Hunt. 1987. Design and construction of a versatile system for the expression of foreign genes in plants. *Gene* 61: 1-11.
- Sikorski, R. and J. D. Boeke. 1991. *In vitro* mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast. *In: Guide to yeast genetics and molecular biology*. Guthrie, C., and G. R. Fink (eds.). *Methods in Enzymology* 194, 305-306.
- Tepfer, M. 1993. Viral genes and transgenics plants. *Biotechnology* 11: 1125-1132.

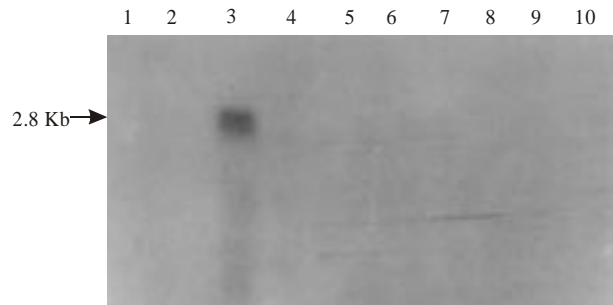


Figura 2. Análisis de ARN total de hojas de plantas transformadas de tabaco. Carril 1, planta no transformada. Carril 2, vacío. Carril 3, planta número 28 expresando un fragmento del transcrito *SKI2*. Carriles 4 a 10, muestra de plantas (24, 19, 15, 13, 8, 3 y 1) en donde no se detectó en transcrito *SKI2*.

Figure 2. Total RNA analysis of leaves from transformed tobacco plants. Line 1: non transformed plant; Line 2: empty; Line 3: plant number 28 expressing a fragment of the *SKI2* transcript; Lines 4-10: sample of plants (24, 19, 15, 13, 8, 3 y 1) where the *SKI2* transcript was not detected.

potencial polyadenylation signal, which can affect the maturation and the polyadenylation of the plant mRNA (Joshi, 1987), has been found in the *SKI2* gene coding region. Moreover, the presence of an orthologous *SKI2* gene in *A. thaliana* (accession number CAB61942) and in humans (Dangel *et al.*, 1995), suggests that this gene has been conserved throughout the evolution of eukaryotes. On the other hand, considering that the yeast *SKI2* gene is involved in the yeast antiviral system and that the human *SKI2W* orthologous gene is located in a linked-resistance and sensitive region of many human diseases, suggests that this gene plays an important role in the natural disease resistance of eukaryotic cells.

CONCLUSION

The results suggest that the yeast *SKI2* gene in tobacco could be inhibited by factors such as the composition and/or the inactivation of the *SKI2* gene. Therefore, it was not possible to determine if the *SKI2* gene could transfer resistance against the viral phytopathogene by RNA without cap and without poly(A). Also, the inactivation of the kanamycin resistance gene and the partial transfer of T-DNA observed in some of the transformed plants, showed that transgene expression cannot always be predicted and that the potential application of genetic transformation by non-conventional methods in plants has considerable limitations.

—End of the English version—



- Vaucheret, H., C. Beclin, T. Elmayan, F. Feuerbach, C. Godon, J-B. Morel, P. Mourrain, J-C. Palauqui, and S. Vernhettes. 1998. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant Journal* 16 (6): 651-659.
- Verwoerd, T. C., B. M. M. Dekker, and A. Hoekema. 1989. A small-scale procedure for rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic acids Research* 17: 23-62.
- Widner, W. R., and R. B. Wickner. 1993. Evidence that the SKI antiviral system of *Saccharomyces cerevisiae* acts by blocking expression of viral mRNA. *Molecular Cell Biology* 7: 4331-4341.