

**MATERIAL RECOPILADO
EN PROGRAMA DE FORMACIÓN**

BID-FP-V-2003-1-A-014

Comparative analysis of the self-incompatibility (*S*-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity

Tetsuyuki Entani, Megumi Iwano, Hiroshi Shiba, Fang-Sik Che, Akira Isogai and Seiji Takayama*

Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5 Takayama, Ikoma 630-0101, Japan

Abstract

Background: Self-incompatibility (SI) in the Solanaceae, Rosaceae and Scrophulariaceae is gametophytically controlled by a single polymorphic locus, termed the *S*-locus. To date, the only known *S*-locus product is a polymorphic ribonuclease, termed *S*-RNase, which is secreted by stylar tissue and thought to act as a cytotoxin that degrades the RNA of incompatible pollen tubes. However, understanding how *S*-RNase causes *S*-haplotype specific inhibition of pollen tubes has been hampered by the lack of a cloned pollen *S*-determinant gene.

Results: To identify the pollen *S*-determinant gene, we investigated the genomic structure of the *S*-locus

region of the *S*₁- and *S*₇-haplotypes of *Prunus mume* (Japanese apricot), and identified 13 genes around the *S*-RNase gene. Among them, only one F-box gene, termed *SLF* (*S*-locus F-box), fulfilled the conditions for a pollen *S*-determinant gene: (i) together with the *S*-RNase gene, it is located within the highly divergent genomic region of the *S*-locus, (ii) it exhibits *S*-haplotype specific diversity among three analysed *S*-haplotypes, and (iii) it is specifically expressed in pollen, but not in the styles or leaves.

Conclusion: The results indicate that *SLF* is a prime candidate for the pollen *S*-determinant gene of SI.

Introduction

Self-incompatibility (SI) is a system which prevents inbreeding and promotes outcrossing, and thus retains intraspecific genetic variation in angiosperms. SI involves the reaction of self/non-self discrimination between pollen and pistil, which in many species is controlled by a single genetic locus, the *S*-locus. The *S*-locus is known to be a multigene complex, termed the *S*-haplotype, which contains at least two polymorphic genes, called the *S*-determinant genes. One is expressed in pollen and the other in pistil. Self/non-self discrimination in SI is expected to occur as a result of the interaction between the *S*-determinants of pollen and pistil (McCubbin & Kao 2000).

Classic genetic analyses revealed two major types of SI systems, sporophytic and gametophytic (de Nettancourt 1977). The families of Brassicaceae possess sporophytic SI, and the recognition and rejection of self-pollen

occur on the surface of stigma. Both pollen and pistil *S*-determinants, SP11 (*S*-locus protein 11; also named SCR) and SRK (*S*-receptor kinase), have been identified in Brassicaceae, and the rejection of self-pollen has been shown to occur as a result of an *S*-haplotype specific ligand–receptor interaction between SP11 and SRK (Takayama *et al.* 2001).

In contrast, the Solanaceae, Rosaceae and Scrophulariaceae families possess gametophytic SI, in which the self-pollen tubes are arrested in the transmitting tract of the style. In these families, the only known *S*-locus product is a class of ribonucleases, termed *S*-RNase, secreted by stylar tissue (McClure *et al.* 1989). Molecular and transgenic analyses have shown that *S*-RNase is responsible for pollen rejection by the pistil (Lee *et al.* 1994; Murfett *et al.* 1994), but that it has no role in the pollen expression of SI, which must be mediated by an unidentified pollen *S*-determinant gene. As the ribonuclease activity of *S*-RNase is essential for the rejection of incompatible pollen tubes (Huang *et al.* 1994), *S*-RNase has been proposed to act as a cytotoxin that degrades pollen tube RNA. Understanding how *S*-RNase causes

Communicated by: Kiyotaka Okada

*Correspondence: E-mail: takayama@bs.aist-nara.ac.jp

the *S*-haplotype specific inhibition of pollen tubes has been hampered, however, by the lack of a cloned pollen *S*-determinant gene.

Regardless of the identity of the pollen *S*-determinant gene, it must have the following characteristics: (i) gametophytic expression in pollen, (ii) genetic linkage to the *S*-*RNase* gene, (iii) *S*-haplotype specific polymorphism, and (iv) interaction with *S*-*RNase* in an *S*-haplotype specific manner. Based on these expected characteristics, a number of approaches have been pursued to identify the pollen *S*-determinant gene (Dowd *et al.* 2000; Golz *et al.* 2000; Harboud *et al.* 2000). In *Nicotiana glauca*, a polymorphic cDNA fragment (48/A), expressed primarily in pollen and linked to the *S*-*RNase* gene, was obtained by differential display (DD) (Li *et al.* 2000). In *Petunia inflata*, DD and subtractive hybridization yielded 13 pollen cDNA fragments that are polymorphic and linked to the *S*-locus (Dowd *et al.* 2000; McCubbin *et al.* 2000a). It is, however, still not clear whether any of these genes are in fact the pollen *S*-determinant gene.

The most promising approach for identifying the pollen *S*-determinant gene may be to search the *S*-locus genomic region for genes that are expressed in pollen. The *S*-locus of solanaceous species, such as *P. inflata*, *Lycopersicon peruvianum*, *N. glauca* and *Petunia hybrida*, is, however, located in the subcentromeric region and surrounded by abundant repetitive sequences, which have hampered chromosomal analyses (Coleman & Kao 1992; Matton *et al.* 1995; Bernacchi & Tanksley 1997; ten Hoopen *et al.* 1998; Entani *et al.* 1999). Furthermore, the exact physical size of the *S*-locus is unknown. McCubbin *et al.* (2000b) constructed BAC contigs of the *S*-locus region of *P. inflata* by using the *S*-*RNase* gene and the 13 identified pollen-expressed, *S*-linked genes as markers, and found that these tightly linked markers spanned a huge chromosomal region of over 2 Mb.

Some *Prunus* species in the Rosaceae family are known to possess smaller genome sizes (e.g. *Prunus persica*: $\approx$ 270 Mb) than the solanaceous species (e.g. *P. inflata*: $\approx$ 1176 Mb) (Bennett & Leitch 1995). Furthermore, the *S*-*RNases* in *Prunus* show higher intrasubfamilial similarities than those of Solanaceae (Ushijima *et al.* 1998), suggesting that the *S*-locus of *Prunus* species diverged more recently or evolved at a slower rate, and thus retains a relatively conserved structure. Therefore, the *Prunus* species are expected to be suitable for the comparative genomic analysis of the *S*-locus. In fact, Ushijima *et al.* (2001) compared the *S*-locus region of the *S_c* and *S_d*-haplotypes in almond (*Prunus dulcis*) by Southern blot analysis, and found that outside of the divergent genomic region around the *S_c*-*RNase* gene ($\approx$ 70 kb), the genomic sequence was highly conserved

between the two *S*-haplotypes, suggesting that the $\approx$ 70 kb region contains the entire complement of *S*-determinant genes.

Recently, Lai *et al.* (2002) investigated the *S*-locus genomic sequence of the *Antirrhinum hispanicum* *S₂*-haplotype, a member of the Scrophulariaceae, and identified a candidate pollen *S*-determinant gene, named *AlSLF-S₂* (*A. hispanicum* *S*-locus F-box of *S₂*-haplotype). *AlSLF-S₂* encodes a novel F-box protein that is specifically expressed in anther and pollen grains of the *S₂*-haplotype. However, no gene allelic to *AlSLF-S₂* has been identified in other *S*-haplotypes, and a gene (designated *AlSLF-S₂L*) with an extremely high sequence similarity (97.9% amino acid sequence identity) has been found in other lines with different *S*-haplotypes. Therefore, it was not clear whether *AlSLF-S₂* encoded a real pollen *S*-determinant.

In this study we analysed the genomic structure of the *S*-locus region of a self-incompatible cultivar of Japanese apricot, *Prunus mume* cv. Nanko, which carries the *S₁*- and *S₇*-haplotypes (Yaegaki *et al.* 2001). Nucleotide sequence analysis of cosmid clones spanning the *S₁*- and *S₇*-*RNase* genes demonstrated that *S*-*RNase* genes are present in a gene-rich region that contains at least four independent F-box genes. A comparative analysis of genomic sequences between the *S₁*- and *S₇*-haplotypes revealed that the region around the *S*-*RNase* gene exhibited extreme sequence diversity, as expected for the *S*-locus containing the entire complement of *S*-determinant genes. In contrast, the gene organization outside this divergent region was highly co-linear, and the sequence similarities between the gene pairs were extremely high between the two *S*-haplotypes. Among the identified genes, only the *S*-*RNase* gene and an F-box gene named *SLF* (*S*-locus F-box) were present in this divergent *S*-locus region. *SLF* exhibited an allelic sequence diversity among three analysed *S*-haplotypes, and specific expression in pollen, but not in the styles or leaves. These results strongly suggest that *SLF* is the pollen *S*-determinant gene of *SL*.

Results

The chromosomal region around the *S*-*RNase* gene contains multiple F-box genes in *P. mume*

The *S*-genotype of a self-incompatible cultivar of Japanese apricot, *P. mume* cv. Nanko, has been determined as *S₁S₇* from analysis of *S*-*RNase* genes and by pollination tests (Yaegaki *et al.* 2001). Although the partial nucleotide sequence of *S₁*-*RNase* has been reported, that of the *S₇*-*RNase* was not known. Therefore, we first cloned

a partial cDNA fragment of the *S₇-RNase* gene (DDBJ/EMBL/GENBANK accession no. AB092644) by RT-PCR using an oligo-dT primer and a specific primer designed for *S-RNase* genes of the *Prunus* species (Tao *et al.* 2000).

To analyse the genomic structure of the *S*-locus region, we constructed a cosmid library from Nanko genomic DNA, and searched for clones including *S₁*- and *S₇-RNase* genes by using their partial cDNAs as probes. The complete nucleotide sequencing analysis of the obtained cosmid clones revealed that their contigs covered ≈ 64.0 kb and ≈ 62.5 kb of the *S*-locus regions of the *S₁*- and *S₇*-haplotypes, respectively. Open reading frame (ORF) prediction with GENEMARK (Borodovsky & Lukashin 2000) or GENSCAN (Burge & Karlin 1997) programs and database homology searches with the BLASTX program (Altschul *et al.* 1990) predicted the presence of 13 and 14 genes in these sequenced regions of the *S₁*- and *S₇*-haplotypes, respectively (Table 1). The *S-RNase* genes (*Gene8*) were located in roughly the middle of the sequenced regions. Apart from a gene (*Gene14*) located at the end of the sequenced region of the *S₇*-haplotype, all the other genes were found in pairs from both *S*-haplotypes. Because of the co-linear gene organization (see below) and the sequence similarities, these gene pairs were expected to be in allelic relationships. The characteristics of the identified genes, along with the homologous sequences found by database searches, are summarized in Table 1.

In addition to these predicted ORFs, an *Enhancer/Suppressor-mutator* (*En/Spm*)-type transposon-like sequence and a *Ty1/copia*-type retroelement were detected in the *S₇*-haplotype, and a non-LTR type retroelement was detected in the *S₁*-haplotype. These transposable element-like sequences were also detected in the *S*-locus region of other species (Cui *et al.* 1999; Suzuki *et al.* 1999).

The most significant feature of this genomic region was the presence of four different types of F-box genes. Among 14 genes, *Gene1*, *Gene7*, *Gene9* and *Gene14* were predicted to encode 43–49 kDa proteins with conserved N-terminal F-box domains (Craig & Tyers 1999). The deduced amino acid sequences of these four F-box proteins (designated SLF and SLFL1, 2, and 3; see below) in the *S₇*-haplotype were aligned in Fig. 1. These F-box proteins only had a weak homology to AhSLF-*S₂*, an F-box protein previously found in the *S*-locus region of *A. hispanicum* (Lai *et al.* 2002), with SLF and SLFL1, 2, and 3 exhibiting 24.3%, 27.1%, 25.8% and 27.5% amino acid identity, respectively. Due to these low sequence similarities, we were unable to determine which *P. mume* F-box gene was the orthologue of AhSLF-*S₂*. Although the sequenced *S*-locus region (≈ 63 kb) of *S₂*-haplotype of the *A. hispanicum* *S₂*-haplotype contained only one F-box gene, our data suggested that the *S*-locus region of *P. mume* contained multiple F-box genes.

Table 1 Summary of genes identified by ORF prediction and homology searches

Gene	ORF (amino acids/exons)		Identity* (%)	Homologue (accession no.)†
	<i>S₁</i>	<i>S₇</i>		
1 (<i>SLFL2</i>)	428/1	428/1	99.1	<i>Ah</i> F-box protein (AH1297974)
2	767/8	767/8	99.2	<i>At</i> Unknown (AAG50913)
3	545/2	544/2	99.4	<i>At</i> Pectinesterase (AAF26135)
4	610/2	604/3	97.9	<i>At</i> Pectinesterase (AAF26136)
5	186/3	186/3	100	<i>At</i> 60S ribosomal protein L18 (AAF26138)
6	330/3	330/3	99.7	<i>At</i> Protein phosphatase (AAF26139)
7 (<i>SLF</i>)	376/1‡	377/1‡	81.3	<i>Ah</i> F-box protein (AH1297974)
8 (<i>S-RNase</i>)	224/3	226/3	74.9	<i>Pm</i> <i>S-RNase</i> (AB047100)
9 (<i>SLFL1</i>)	409/1	399/1	92.5	<i>Ah</i> F-box protein (AH1297974)
10	195/7	195/7	100	<i>Os</i> MCT-1 protein-like (AP003535_2)
11	249/3	249/3	97.2	<i>At</i> Unknown (AY039962)
12	133/3	133/3	98.5	<i>Pa</i> Auxin-repressed (U93273)
13	113/1	113/1	100	<i>At</i> Unknown (AY085957)
14 (<i>SLFL3</i>)	—	376/1	—	<i>Ah</i> F-box protein (AH1297974)

*Amino acid identities between *S₁*- and *S₇*-haplotypes.

†Database homologues and their GENBANK accession numbers.

‡5'-UTR cactaius one intron.

Ah, *Antirrhinum hispanicum*; *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Pm*, *Prunus mume*; *Os*, *Oryza sativa*; *Pa*, *Prunus armeniaca*.

S7-SLF	-----MTFSLRKKEILIDITVRLPAKSLVRFLCTCKSWGDLTGSSSFVSIHINRNVTKHA	55
S7-SLFL1	-----MWEEMALRHILPRLPSKSLMRFKCVRKSWYTVINNPTFVENHLSNSMHNKL	51
S7-SLFL2	MMREMATLSKFSSEDMMGNIILSRLPKSLMRFRCLVLSWHDLDKPSFVDHHLISISMDYKV	60
S7-SLFL3	-----MEVOILARLFPKSLMRFKCCKSWHALLNNEHFVAKHLHLNNQPS	46
AhSLF-S2	----MMDRRFPRQDVISEILLFSSVKSLLRFCVSKSWCSLTKSNDIFIDNHLRRQTNGN	56
S7-SLF	H-----MYLLCLHHP-----N--FERQVDPDPYVEQKFHWSIFSNETFEECISK	97
S7-SLFL1	S--ICIVSRFVQSDTNSDEK---LAISFLHLRNDYDDAEHN--LNFVMEIKKEPLSSG	104
S7-SLFL2	TSSIVVLKHNMLTDPISKDEKAVRATLFPNPSNORILLSSLNLGSLMDGLEIENHV	120
S7-SLFL3	S--ICVIFKRSVLSRTEHNKE---LVETELILRNDNEINADHNLINCKMEDLHFPKSMG	101
AhSLF-S2	V-----M--VMKRYVRTPERD---MESEYNINSPELDELPLDLPNPFYFKNIKEDYDYF	104
S7-SLF	LS-----HPLGSTERYGYGSSNGIVCISDEILNFDSPIHWNFSVRKLETPFMSAN	149
S7-SLFL1	R-----FIGEDVESPSILGHGNGIVCLSPCSDN---LVLCPNPAIKEIKLLKSGSL	152
S7-SLFL2	VP-----PPMRGYALSLEISGSDGLICINTFNSD---IVLCNPALEEFYRVLPKSCI	170
S7-SLFL3	LKSRGQFIELPGIELGESVHVHGHGDLFCLSLYTGE---LNFYNPAIKEFVLPKSCCL	157
AhSLF-S2	Y-----LPQR-VNLMGFCNGIICLAYGDC---VLISNPALREIKRLEPTPF	146
S7-SLF	INVKFSH-----VALQFGFHEGLNDYKVVMMRTNKNALA-	184
S7-SLFL1	PDWVGCA-----VGFGYDHSKDYKVSRIASYQAEIDG-	185
S7-SLFL2	LLPPRVPRQFEENEDDDYEEDEDDDEIESNPKCVGFGYDHSKDYKVVBAQFVSGVFT-	229
S7-SLFL3	EDACST-----LGFGYDHSKDYVLLSIVSYGEEIFDD	191
AhSLF-S2	ANPEGHCT-----DIICVYFGNTCNLCYKVLIESVGPEDH-	182
S7-SLF	-----VEVYSIRTDTSWKMIET--IPPWLKCTWQ-HHKGTFFNGVAMHIEK-----	227
S7-SLFL1	---LIPPRVEIIMTLSTDSWREINNNSLETDSCTFFP-DYFQIYFQIGICYWVGMEQPKQS	241
S7-SLFL2	---QHESKVEVYSLAAATWREVP--VDIQPHGSLN-PSYQMYFKGFFYWIAM-----	275
S7-SLFL3	ERLVIHHPQAEIIMTLSTDSWREIETHYLETETTYFWGNETFSAYFNGVFWLGMEEKKEF	251
AhSLF-S2	-----HINIYVYSDINSWKHLEDDSTPIKYIQHFP--CNELFEKGAFFHWAN-----S	229
S7-SLF	----G-----PLFSTMSFDSGSEEFEEFLAPDAICNSWG-----LCIDVYKE	265
S7-SLFL1	VEYED---EEQKPMVIFFLTGDIEIFHNLFFPSFYMYEEGSSYAYEMSYLMYCDLRIILW	298
S7-SLFL2	---WT-----ERNVILSFLMSEEVFHDIALFESGPDAYEYTS-----IAVW	314
S7-SLFL3	VSFYDRLEEKKQVILFLDTFDEVFHNMLPLPCFYEFPS-----HEMSLTVW	298
AhSLF-S2	TDIFY-----ADFLTFDIITEVEKEMAYEHCLAQFSN-----SFLSLMSL	270
S7-SLF	QICLLFTTFYDCEEDMEKSFVWLOEKRWKQLSPFIYPSNCYSTMGISIDNETLMQRRIH	325
S7-SLFL1	DGSIALFGFNRFVCFDSYGVVLLDFDGAKGS-WTKHINFEELMG--IKRVLEFWRSD	355
S7-SLFL2	KDSLALLTPVENEAFKTLQLWVLDEDLKGAKGLWTKHLAIGELEKG-VEAPLVFVKDK	373
S7-SLFL3	NESTALFGFYRCFEF--FEVWVMEFDG---WTKHLSVVEKVDQEVDIPLALWRNE	351
AhSLF-S2	NECLAMVRVKEWMEDELFIWVMNQYGVRES--WTKQYVIGEQVV--VCSHVCKNDE	325
S7-SLF	IKGGADLYLCNYESKQVLETGLRLGTVTYGEIEFLFSMTMIETVLLNSLQY----	377
S7-SLFL1	ILMMTE-DGDIVSFNLAIEKLKLNLEMKIPS---DFETIVVNSILPIT-----	399
S7-SLFL2	LLMMTT-NGDVVNYSLDIQKLKHVERHGLGPTNIQAMPYVNSIVSIKPGNKIESI	428
S7-SLFL3	VLLMDR-DGRIFSYNFDTENLKYLFVHGASR-GDFOAMVCVNSIVSVK-----	397
AhSLF-S2	CLIMEDGNGQLVSCAFRINKIEKLFIYAVEET--LRVLIVDESLISLNRVLNL---	376

Figure 1 Alignment of the predicted F-box proteins encoded around the *S*-locus region of *Prunus mume* (*S*₇-haplotype) and *AhSLF-S*₂. Gaps (hyphens) were introduced to optimize the alignment. Amino acid residues which are the same for three of the five proteins are boxed. A bold bar indicates the F-box domain. GENBANK accession numbers for *S*₇-SLF, *S*₇-SLFL1, *S*₇-SLFL2 and *S*₇-SLFL3 are AB092622, AB092624, AB092626 and AB092627, respectively. Alignment was done by CLUSTALW (Jeanmougin et al. 1998).

An *S-RNase* gene and an F-box gene (*SLF*) exhibits high sequence diversity

Allelic sequence diversity is a critical feature of the genes involved in SI recognition. The *S-RNase* gene, the pistil *S*-determinant gene, exhibited an allelic sequence diversity (74.9% amino acid identity) between the *S*₁- and *S*₇-haplotypes. Among the other allelic genes identified in the *S*-locus region, one F-box gene (*Gene7*, designated as *SLF*) exhibited a high sequence diversity (81.3% amino acid identity) between the two *S*-haplotypes (Fig. 2). Another F-box gene (*Gene9*, designated as *SLFL1*: *SLF* linked-1) exhibited low sequence diversity (92.5% amino acid identity, see Discussion). The other 10 pairs of genes were highly conserved between the two *S*-haplotypes (more than 97.2% amino acid identities). These data suggested that *SLF* was the most probable candidate for the pollen *S*-determinant gene.

To confirm that *SLF* demonstrated *S*-haplotype specific sequence diversity, we analysed *SLF* genes from another line of *P. mume*, Shikanohata-1, the *S*-genotype of which was determined as *S*₇*S*₀ (see Experimental procedures). We designed an *SLF* specific sense primer from the conserved 5'-flanking regions between *S*₁-*SLF* and *S*₇-*SLF* (*SLF* of *S*₁- and *S*₇-haplotypes). Supposing that the other allelic *SLF* genes are also located downstream of *S-RNase* genes, we amplified Shikanohata-1 genomic DNA using the *SLF* specific sense primer and an *S-RNase* specific sense primer. Two types of genomic fragments were obtained. One (≈ 3.7 kb) contained the identical nucleotide sequence to *S*₇-*SLF*, consistent with the fact that Shikanohata-1 carried the *S*₇-haplotype. The other fragment (≈ 4.0 kb) contained an homologous, but not identical sequence to *S*₁-*SLF* and *S*₇-*SLF*, and was suggested to be the *SLF* allele of *S*₀-haplotype (Fig. 2). The deduced amino acid sequence of *S*₀-*SLF* showed

S1	MTFTLGGKKEILIDILVRLPAKSLVRFLCTCKSWSDLIGSSSFVRLHLDNRNVTKHAHVYLL	60
S7	MTFSLRKKEILIDILVRLPAKSLVRFLCTCKSWGDLIGSSSFVSIHLNRNVTKHAHVYLL	60
S9	MAFTLRKKEIVIDILVRLPVKSLVRFLCTCKSWSDLIGSSSFVSTHLNRNVTKHAHVYLL	60
S1	CLHHPNFECAIDPNDPYIEEEVQWSLFSNETFEQCSKLSHPLGSTEHYVIYGSSNGLVCI	120
S7	CLHHPNFERQVDPPDPYVEQKFHWSIFSNETFEECSKLSHPLGSTERYGIYGSSNGLVCI	120
S9	CLNHPNVEYLDPRDDPYVKQEFQWSIFPNEIFEECSKLTHPLRSTEDYMIYGSSNGLVCI	120
S1	SDEILNFDSPHIIWNPSARKLKTTPPISTININIKFSQVVLQFGFHPGVNDYKAVRMMRTNK	180
S7	SDEILNFDSPHIIWNPSVRKLRTPPMSANINIVKFSHVVALQFGFHPGLNDYKAVRMMRTNK	180
S9	SDEILNFDSPHIIWNPSVKKFRTPPMSININIKFSYVALQFGFHPGVNDYKAVRMMRTNK	180
S1	NALAVEVYSLRTNSWKMIETIPPWLKCTWQHKGITFFNGVAYHIIIEKGPIIFSIMSFDSGS	240
S7	NALAVEVYSLRTNSWKMIETIPPWLKCTWQHKGITFFNGVAYHIIIEKGPIIFSIMSFDSGS	240
S9	NALAVEVYSLRTNSWKMIETIPPWLKCTWQHKGITFFNGVAYHIIIEKGPIIFSIMSFDSGS	240
S1	EEFEFFIAPDAICSSGLGCIHVIYKEQICLLSGFYGSEEDMDKIDLWVLQEKRWKQLCPF	300
S7	EEFEFFIAPDAICNSWGLCIDVYKEQICLLFTFYDCEEDMEKSDFWVLQEKRWKQLSPF	300
S9	EEFEFFIAPDAISTPWGLCIDVYREQICLLFDCYFGEGBMEKIDLWVLQEKRWKQLRPF	300
S1	IFPLDHCHRTIGFSADNELLMERDDFIKGIITHLCLCNYESKQVLETGIRLAVMKYGDIEF	360
S7	IYPSN-CYSTMGISIDNELLMORDDHIKGGADLYLCNYESKQVLETGLRLGTVTYGEIEF	359
S9	IYPEDYCYGIIGINVNELLMGRDDLAKGVADLYLCNYESKQVLETGIKGLMSYGEIEF	360
S1	LSAITYIESLVLLNNY--	376
S7	LFSVTYIETLVLLNSLQY	377
S9	LFSITYIESLVLLN----	374

Figure 2 Amino acid sequence alignment of three allelic variants of *SLF*. Gaps (hyphens) were introduced to optimize the alignment. Amino acid residues conserved in all three allelic variants of *SLF* are boxed. GENBANK accession numbers for *S*₁-*SLF* and *S*₇-*SLF* are AB092621 and AB092645, respectively. Alignment was done by CLUSTALW (Jeanmougin *et al.* 1998).

77.8% and 80.2% identity with S_1 -SLF and S_7 -SLF, respectively. These results suggested that the SLF gene exhibited S-haplotype specific sequence diversity in at least three of the S-haplotypes analysed.

The *S-RNase* and *SLF* genes are located within the highly divergent genomic region of the *S*-locus

To further characterize the genomic structure of the *S*-locus region, we compared the S_1 - and S_7 -haplotype regions by Harr plot analysis (Harr *et al.* 1982). As shown in Fig. 3, this pattern matching analysis revealed some striking structural features of this genomic region. First, the regions downstream of *Gene6* and upstream of *Gene9* were gene-rich (*Gene1*–*Gene6*: 1 gene/ $\approx$ 2.8 kb; *Gene9*–*Gene13*: 1 gene/ $\approx$ 2.7 kb), and their gene organizations were highly co-linear. Second, the region between *Gene6* and *Gene9* (S_1 -haplotype: $\approx$ 27 kb; S_7 -haplotype: $\approx$ 15 kb) contained only the *S-RNase* gene (*Gene8*) and *SLF* gene (*Gene7*), and the gene organization was highly divergent. In this region, the sequence similarities were only observed in the *S-RNase* and *SLF* genes, and in some rearranged and duplicated fragments that did not encode proteins (see legend to Fig. 3). Third, the

remaining non-coding region between *Gene6* and *Gene9* was filled with transposable elements (see above) and the sequences that showed no similarities between the two S-haplotypes.

Recombination events between the pistil and the pollen S-determinant genes produced non-functional S-haplotypes and compromised the SI system. Such recombination events have, however, never been observed, despite a long history of SI research, suggesting the existence of some mechanisms which preclude recombination at the *S*-locus. In *Brassica*, the genomic structure of the *S*-locus region, which contains both pistil and pollen S-determinant genes (*SRK* and *SP11*), was shown to be highly divergent (Cui *et al.* 1999; Shiba *et al.* 2003). In this region, the *SRK* and *SP11* genes were surrounded by transposable elements, rearranged sequences and other haplotype-unique genes. All these sequences were expected to contribute to the heteromorphism in the *S*-locus, helping to suppress recombination and maintaining the S-determinant gene pair as one genetic unit. In contrast, the sequence outside of this region, i.e. the *S*-locus flanking region, contains many conserved genes, with a highly co-linear genomic structure (Cui *et al.* 1999).

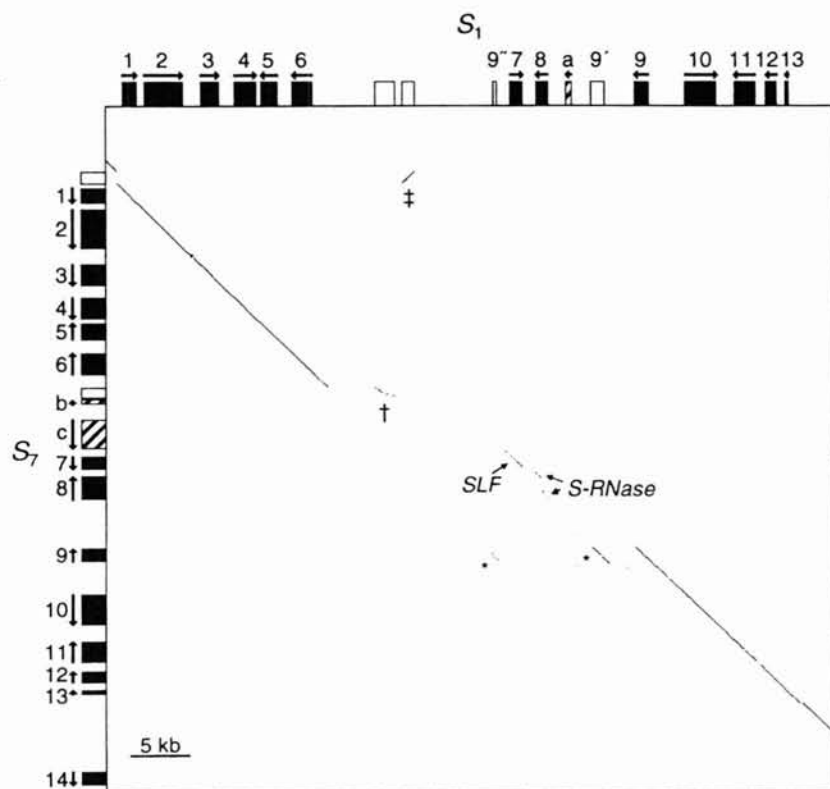


Figure 3 Pattern matching analysis of homologies (Harr plot analysis) between two *S*-locus regions of *P. mume* S_1 - and S_7 -haplotypes. The positions of *Gene1*–*Gene14* are shown as filled boxes. The arrows indicate the orientation of transcription. Transposable elements are shown as hatched boxes: (a) TNP2-like sequence of *En/Spm*-type transposon (deleted); (b) *Ty1/copia*-type retroelement (deleted); (c) non-LTR type retroelement (deleted). The positions of duplicated and/or disrupted genes (fragments) are shown as open boxes. *Matching dots by duplicated and disrupted fragments (9' and 9'') of *SLFL1* gene (*Gene9*). †Matching dots by cyclic phosphodiesterase-like sequences disrupted by multiple in-frame stop codons (presumable pseudogene). ‡Matching dots by rearranged non-coding fragments. A Harr plot was carried out by GENETYX-MAC software (Software Development co., Tokyo, Japan). Unit size to compare: 20 bases; dot plot matching number: 19 bases.

By analogy to the genomic structure of the *Brassica* *S*-locus region, we proposed that the highly divergent region (*Gene6*–*Gene9*) represents the *S*-locus region of *P. mume*, which contains the entire set of *S*-haplotype-specific genes, and that the outside region represents the *S*-locus flanking region which maintains genomic co-linearity as a result of recombination. These genomic structural features strongly suggested that *SLF* encoded the pollen *S*-determinant of SI.

The *SLF* gene is specifically expressed in pollen

To investigate *SLF* gene expression, we performed reverse transcription (RT)-PCR analysis (Fig. 4). In addition to *S₁-SLF* and *S₇-SLF*, we also checked the

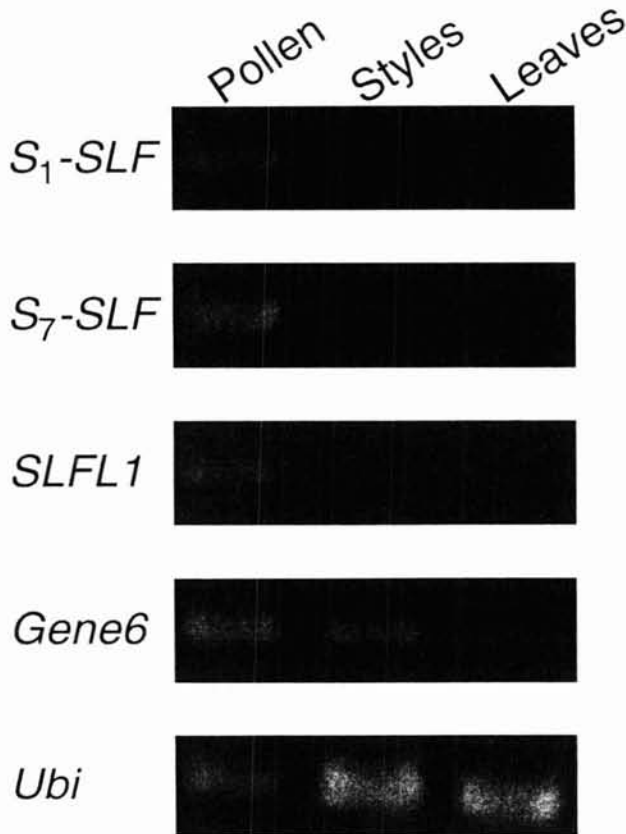


Figure 4 Expression analysis of *SLF* gene in pollen, styles and leaves of *P. mume* cv. Nanko (*S₁S₇*). RT-PCR was done using primers designed for the specific amplification of *S₁-SLF*, *S₇-SLF*, *SLFL1*, *Gene6* and ubiquitin (*Ubi*: positive control) transcripts. Specific amplifications were confirmed by subsequent DNA sequencing analyses. No amplification was obtained in the absence of reverse transcriptase, suggesting the transcript specific amplification of each band.

expression of *SLFL1* and *Gene6* that locate beside the *S*-locus region. Both *S₁-SLF* and *S₇-SLF* were specifically expressed in pollen, but not expressed in the styles or leaves. *SLFL1* also exhibited a pollen-specific expression pattern (see Discussion). *Gene6* was expressed in all tissues used in this analysis. The pollen-specific expression of *SLF* further supported the idea that this gene encodes the pollen *S*-determinant of SI.

Discussion

Genomic structure of the *S*-locus region of *P. mume*

In this study, we analysed the genomic structure of the *S*-locus region of *P. mume*, and suggested that the region consisted of a highly divergent *S*-locus region and its surrounding highly co-linear flanking regions. Similar genomic organization was also reported in the *Chlamydomonas reinhardtii* mating-type locus (Ferris & Goodenough 1994). This locus exists as two apparent alleles (*mt⁺* and *mt⁻*) that control mating in haploid gametes and sporulation and meiosis in diploid *mt⁺/mt⁻* zygotes. Both alleles contain tightly linked mating-type specific genes that are transmitted as a unit and fail to recombine. A comparative analysis of the restriction maps of the *mt⁺* and *mt⁻* alleles revealed that the mating-type locus consists of three domains: the central rearranged domain (*R* domain) and two flanking domains. The *R* domain exhibits a rearranged and divergent genomic structure with many deletions and insertions, and allele-specific sequences that do not cross-hybridize between *mt⁺* and *mt⁻*. In contrast, the two flanking domains clearly exhibit a co-linear structure. Although more examples need to be examined, these structural features might be a common trait of genomic regions containing indissociable genes, e.g. incompatibility loci, mating-type loci and sex chromosomes.

Multiple BLAST search identified as many as 694 F-box genes in the *Arabidopsis thaliana* genome, making this gene superfamily one of the largest currently known in plants (Gange *et al.* 2002). The sheer size of the F-box gene superfamily suggested that it evolved through a large number of duplication events. In fact, 35.9% of the 694 F-box genes are arranged in tandem repeats of two to seven genes, making many F-box gene clusters in *A. thaliana* genome (Gange *et al.* 2002). The small *S*-locus region of *P. mume* analysed in this study contained four F-box genes. Duplicated fragments of the *SLFL1* gene were also found in the *S₁*-haplotype. This observation suggests that duplication events have occurred many times in the *S*-locus region, which have contributed to create these varieties of F-box genes.

SLF is the prime candidate for the pollen S-determinant of SI

In this study we found four independent F-box genes in the S-locus region of *P. mume*. They were expected to encode polypeptides of a similar molecular size (376–428 amino acids) with a conserved F-box domain in their N-terminal region. Among them, one F-box gene fulfilled the conditions required for the pollen S-determinant gene: (i) it is located within the highly divergent S-locus region, (ii) it exhibits S-haplotype specific amino acid sequence diversity, and (iii) it is specifically expressed in pollen but not in the styles or leaves. Although we have not directly demonstrated that SLF functions as the pollen S-determinant of SI through, for example, a transformation experiment, circumstantial evidence suggests that SLF is the prime candidate for the pollen S-determinant.

Another F-box gene, *SLFL1*, showed a low but negligible sequence diversity between the *S*₁- and *S*₇-haplotypes (92.5% amino acid identity). Because the *SLFL1* gene is located at one border of the divergent S-locus region, it is probable that the recombination has been suppressed to a certain degree, and that consequently, *SLFL1* has accumulated minor genetic variations. In the *Chlamydomonas* mating-type locus, recombination suppression was shown to extend out to either side of the divergent R domain (Ferris & Goodenough 1994). Interestingly, the *SLG* (S-locus glycoprotein) gene, which is located at one border of the S-locus region of *Brassica*, also exhibits a sequence diversity. Now that *SLG* is not the S-determinant, the significance of its sequence diversity is unknown. Transformation experiments, however, have suggested that *SLG* indirectly enhances the SI recognition process in some, but not all, S-haplotypes (Takasaki *et al.* 2000; Silva *et al.* 2001). The expression analysis suggested that *SLFL1* is also expressed in pollen (Fig. 4). The possible involvement of *SLFL1* in the SI recognition process should be examined experimentally.

Possible involvement of the protein degradation pathway in gametophytic SI

F-box proteins were originally identified in yeast and human as components of a particular E3 ubiquitin ligase complex, designated the Skp1p-Cdc53p-F-box protein complex (SCF complex) (Bai *et al.* 1996; Skowyra *et al.* 1997). E3 ubiquitin protein ligases act in conjunction with E2 enzymes to ubiquitinate target proteins, which are then degraded by the 26S proteasome (Hershko & Ciechanover 1998). Recent studies in *A. thaliana* have indicated that F-box proteins and SCF complexes play

critical roles in various aspects of plant growth and development such as male gametogenesis, floral organ identity, auxin and jasmonate signalling, floral homeosis, flowering time and circadian clocks, leaf senescence, lateral shoot branching and photomorphogenesis (Gange *et al.* 2002).

If SLF acts as a pollen S-determinant by forming an SCF complex, its most probable target would be the non-self-S-RNases, as proposed by Lai *et al.* (2002). The SLF expressed in pollen (tube) would target the non-self-S-RNases for ubiquitination and subsequent degradation, but would leave the self-S-RNase intact. The intact S-RNase would then function as a cytotoxin that degrades self-pollen tube RNA.

One problem raised by this scenario is how the selective lack of interactions between SLF and S-RNase proteins from the same S-haplotypes is maintained. Although the precise molecular mechanism is still unknown, an allele-specific lack of interaction was observed in the self-incompatibility locus of fungi (Kämper *et al.* 1995; Kahmann & Bölker 1996). In the mating process of the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, fused cells maintain a stable dikaryon only if they carry different alleles of the multiallelic *b* mating-type locus. At least 18 different alleles are present at the *b* locus, which contains two divergent genes (*bE* and *bH*) that encode homeodomain proteins. *bE* and *bW* proteins, only from different alleles, have been suggested to form an active heterodimer, which triggers sexual development. It will be interesting to investigate the protein-protein interactions between SLFs and S-RNases and to compare the mechanism of discrimination with other self-incompatibility systems.

All F-box proteins identified in the *A. thaliana* genome contain an ≈ 60 amino acid N-terminal F-box motif, which is expected to interact with the rest of the SCF complex by binding to the Skp subunit (Gange *et al.* 2002). The C-terminal portions of F-box proteins contain a variable protein interaction domain that is expected to bind the target protein. The C-terminal portion of SLF does not have a typical protein interaction motif such as LRR (leucine-rich repeats) and WD-40 repeats, but exhibits a weak homology to *A. thaliana* F-box proteins with the A type-II motif, the function of which is unknown (Gange *et al.* 2002). Supposing that SLF functions as the pollen S-determinant through the SCF-ubiquitination pathway, the C-terminal region would be expected to contain the recognition site of the target protein, presumably the S-RNase. A comparison of amino acid sequences suggested that the C-terminal region of SLF contains several highly variable short regions surrounded by conserved sequences rich in

charged amino acids and cysteines. Recently, the crystal structures of two S-RNases, the S_3 -RNase from the Rosaceae plant *Pyrus pyrifolia* and the S_{11} -RNase from Solanaceae plant *N. alata*, have been reported (Matsuura *et al.* 2001; Ida *et al.* 2001). These are the first crystal structures to be solved for proteins that participate in self/non-self recognition. Structural analyses of SLF would provide a deeper understanding of self/non-self recognition mechanisms at the molecular level.

Experimental procedures

Plant materials

Prunus mume cv. Nanko was obtained from an Aotani plum-grove in the Kyoto prefecture. The S -genotype of Nanko (S_1S_2) was confirmed as described by Yaegaki *et al.* (2001). *P. mume*, Shikanohata-1, was an expected chance seedling line collected from the Nara prefecture. The S -genotype (S_1S_2) of this line was determined by analysing the S -RNase genes according to Tao *et al.* (2000). In brief, the genomic PCR of Shikanohata-1 using S -RNase specific primers, Pru-C2 and Pru-C4R (Ushijima *et al.* 1998), gave two kinds of S -RNase fragments. One had an identical sequence with the S_2 -RNase of Nanko. The other had an unregistered sequence, which we deposited as the S_7 -RNase of a novel S -haplotype, S_7 (DDBJ/EMBL/GENBANK accession no. AB092646).

cDNA cloning

Total RNA was isolated using Isogen (Nippon Gene, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions.

The cDNAs encoding S-RNases and SLFs were cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE). For the 3'-RACE, Reverse transcription (RT) was done with SuperScript II (Invitrogen, CA) using an adapter linked oligo-dT primer (5'-ACTCGAATTCACGCGGCCGATTTTTTTTTTTTTTTT-3'; Phillips & Huttly 1994). PCR was performed with *Ex Taq* polymerase (Takara, Shiga, Japan) using the adapter linked oligo-dT primer and a gene specific primer. The gene specific primers, Pru-C2, SLF1UTR (5'-TGACGCACACGAACAGGAACAGTTA-3'), and SLF7UTR (5'-CCAACCTCAAAAGTGAGTCAATGGA-3') were used to amplify the 3' regions of the S -RNase, S_1 -SLF and S_7 -SLF genes, respectively.

For 5'-RACE, RT was done using a gene specific primer. The gene specific primers SLF1RF5 (5'-TCATTAGGGTTCGATCG-CACA-3') and SLF7RF5 (5'-TCATCAGGGTCTACCTGACG-3') were used for RT of S_1 -SLF and S_7 -SLF genes, respectively. After RT, cDNA was purified by ethanol precipitation and polyadenylated with terminal transferase (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). PCR was performed using the adapter linked oligo-dT primer and gene specific primer.

Genomic DNA purification

Leaves (1 g) were finely ground in liquid nitrogen, immediately

suspended with nuclei isolation buffer (10 mM Tris-HCl (pH 9.5), 10 mM EDTA, 0.5 M sucrose, 10 mM spermidine, 4 mM spermine, 0.15% (v/v) β -mercaptoethanol, 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone, 0.5% (v/v) Triton X-100) and centrifuged. After centrifugation, the supernatant was removed and the pellet was resuspended in 1 mL of nuclei isolation buffer. Genomic DNA was purified from the suspension as described by Murray & Thompson (1980).

Construction of genomic library

SuperCosI (Stratagene, CA) was digested with *Eco*RI, and the obtained small fragment containing *Bam*HI cloning site was ligated to the large fragment of *Eco*RI digested pENTR1A (Invitrogen) with T4 DNA ligase. The remaining large fragment of *Eco*RI digested SuperCosI was filled in with T4 DNA polymerase and circularized with T4 DNA ligase. The pENTR1A introduced *Bam*HI cloning site from SuperCosI was digested with *Afl*III and *Pvu*II, and then filled in. The resulting 1 kb fragment containing the recombinase recognition site and the *Bam*HI cloning site was ligated to the large fragment of *Eco*47III digested SuperCosI, without a *Bam*HI cloning site, and the obtained construct was termed pSJcosI.

pSJcosI was digested with *Xba*I and dephosphorylated with calf intestine alkaline phosphatase. After denaturing the alkaline phosphatase, pSJcosI was digested with *Bam*HI. 5 μ g of genomic DNA from *P. mume* cv. Nanko were partially digested with *Sau*3AI and dephosphorylated. The digested and dephosphorylated genomic DNA was ligated in 2 μ g of prepared pSJcosI and packaged with phage packaging extract (GigapackIII gold, Stratagene).

Screening of library

Escherichia coli was infected with the packaged phage particle and spread on LB plates containing 50 μ g/mL of ampicillin. After incubation at 37 °C for 15 h, colonies were replicated on to nylon membranes (Hybond-N⁺, Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK) and the membrane was treated according to the manufacturer's instructions. Hybridization and detection were performed with Alkphos Direct (Amersham Bioscience) using S -RNase cDNAs as probes. Prehybridization, hybridization and primary washing were done at 60 °C. Colonies in the vicinity of positive signals were picked up, spread on LB plates containing 50 μ g/mL of ampicillin, and used for hybridization screening. After repeating three rounds of hybridization and screening, a positive clone was isolated and confirmed to contain the S -RNase gene by PCR using the S -RNase specific primers, Pru-C2 and Pru-C4R.

Shotgun sequencing

The plasmid was purified from the positive clone by Large Construct Kit (Qiagen, CA). Shotgun sequencing was carried out as previously described with some modifications (Shiba *et al.* 2002). Briefly, the plasmid was randomly digested using HydroShear

(GeneMachines, CA) and blunted with T4 DNA polymerase. The digested DNA fragments were separated by agarose gel electrophoresis, and DNA fragments ranging from 2 kb to 4 kb were purified from the gel using Gene Clean II (Bio101, CA). The Purified DNA fragments were ligated into *EcoRV* digested and dephosphorylated pBC SK(+) (Stratagene). The nucleotide sequences were determined using PRISM377 and 3700 (Perkin-Elmer ABI, CA). Sequencing assembly was done with the computer software, Auto Assembler (Perkin-Elmer ABI) or MacPhrap (CodonCode, MA). Homology searches were performed using the BLASTX program (Altschul *et al.* 1990).

Direct cloning of *SLF-S-RNase* regions

The DNA fragments containing *S-RNase* and *SLF* genes were amplified by PCR using the primers Pru-C2 and SLF-Pro (5'-ATTCAATAACGTTTCAGCCAGGATCT-3'), from genomic DNA from a line of *P. mume* (Shikanohata-1). The obtained fragments were subcloned into the vector pGEM-T Easy (Promega, WI), and then sequenced.

Transcriptional analysis

Transcriptional analysis was done by RT-PCR. Total RNA was extracted from young leaves, and from styles and pollen grains collected on the day of anthesis. 0.5 µg of RNA was reverse transcribed in 20 µL of reaction solution using 10 µmol of primers, SLF1SPR (5'-GTACGATGACAATGATCCAAAGGAA-3'), SLF7SPR (5'-GGAGCAGATCTGTACTTGTGTAATT-3'), SLFL1-R (5'-AGCTTCTCAGTTGCAAGGTTGT-3'), Gene6-R (5'-AATAGAGCACCAGCGTTATCGAA-3') and UBI-R (5'-CATAGGTCAACCCACACTTG-3') for *S₁-SLF*, *S₇-SLF*, *SLFL1*, *Gene6* and ubiquitin gene, respectively. After RT, 0.4 µL of RT reaction solution was used for PCR with the specific primer pairs: SLF1SPF (5'-AACCCATCGGCTAGAAAACCTTAAGA-3') and SLF1SPR for *S₁-SLF*, SLF7SPF (5'-GGGCTTAATGAC-TACAAGGTTGTAA-3') and SLF7SPR for *S₇-SLF*, SLFL1-F (5'-ATTCTTGCGGGAGATCAAG-3') and SLFL1-R for *SLFL1*, Gene6-F (5'-GGAGGTTAATGTTAGGCTTTGGAA-3') and Gene6-R for *Gene6* and UBI-F (5'-CTCCTCTGACACCATCGACAA-3') and UBI-R for the ubiquitin gene. The primers for the ubiquitin gene were designed from *Prunus avium* Ubi gene (AF298826). Amplified fragments were electrophoresed on an agarose gel and detected by ethidium bromide staining.

Acknowledgements

We thank Kanako Iwasaki, Hiroko Sato and Naoko Yoneyama for their technical assistance. This work was supported in part by Grants-in-Aid for Special Research on Priority Areas B (nos 11238025 and 11238101) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, and by a grant from the Research for the Future Program (JSPS-RFTF 00L01605) from the Japan Society for the Promotion of Science.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., *et al.* (1996) SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* **86**, 263–274.
- Bennett, M.D. & Leitch, I.J. (1995) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann. Bot.* **76**, 113–176.
- Bernacchi, D. & Tanksley, S.D. (1997) An interspecific backcross of *Lycopersicon esculentum* × *L. hirsutum* linkage analysis and a QTL study of sexual compatibility factors and floral traits. *Genetics* **147**, 861–877.
- Borodovsky, M. & Lukashin, A. (2000) Eukaryotic GeneMark.hmm, <<http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/eukhmm.cgi>>.
- Burge, C. & Karlin, S. (1997) Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J. Mol. Biol.* **268**, 78–94.
- Coleman, C.E. & Kao, T.-H. (1992) The flanking regions of two *Petunia inflata* S-alleles are heterogeneous and contain repetitive sequences. *Plant Mol. Biol.* **18**, 725–737.
- Craig, K.L. & Tyers, M. (1999) The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **72**, 299–328.
- Cui, Y., Brugière, N., Jackman, L., Bi, Y.-M. & Rothstein, S.J. (1999) Structural and transcriptional comparative analysis of the S locus regions in two self-incompatible *Brassica napus* line. *Plant Cell* **11**, 2217–2231.
- Dowd, P.E., McCubbin, A.G., Wang, X., *et al.* (2000) Use of *Petunia inflata* as a model for the study of solanaceous type self-incompatibility. *Ann. Bot.* **85**(Suppl. A), 87–93.
- Entani, T., Iwano, M., Shiba, H., Takayama, S., Fukui, K. & Isogai, A. (1999) Centromeric localization of an *S-RNase* gene in *Petunia hybrida* Vilm. *Theor. Appl. Genet.* **99**, 391–397.
- Ferris, P.J. & Goodenough, U.W. (1994) The mating-type locus of *Chlamydomonas reinhardtii* contains highly rearranged DNA sequences. *Cell* **76**, 1135–1145.
- Gange, J.M., Downes, B.P., Shiu, S.-H., Durski, A. & Vierstra, R.D. (2002) The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse-superfamily of genes in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11519–11524.
- Golz, J.F., Clarke, A.E. & Newbigin, E. (2000) Mutational approaches to the study of self-incompatibility: revisiting the pollen-part mutants. *Ann. Bot.* **85**(Suppl. A), 95–103.
- Harbord, R.M., Napoli, C.A. & Robbins, T.P. (2000) Segregation distortion of T-DNA markers linked to the self-incompatibility (S) locus in *Petunia hybrida*. *Genetics* **154**, 1323–1333.
- Harr, R., Hagblom, P. & Gustafsson, P. (1982) Two-dimensional graphic analysis of DNA sequence homologies. *Nucl. Acids Res.* **10**, 365–374.
- Huang, S., Lee, H.-S., Karunanandaa, B. & Kao, T.-H. (1994) Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell* **6**, 1021–1028.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425–479.

- ten Hoopen, R., Harbord, R.M., Maes, T., Nanninga, N. & Robbins, T.P. (1998) The self-incompatibility (S) locus in *Petunia hybrida* is located on chromosome III in a region, syntenic for the Solanaceae. *Plant J.* **16**, 729–734.
- Ida, K., Norioka, S., Yamamoto, M., et al. (2001) The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana glauca* S₁₁₁-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *J. Mol. Biol.* **314**, 103–112.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1998) Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 403–405.
- Kahmann, R. & Bölker, M. (1996) Self/nonself recognition in fungi: old mysteries and simple solutions. *Cell* **85**, 145–148.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M. & Kahmann, R. (1995) Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73–85.
- Lai, Z., Ma, W., Han, B., et al. (2002) An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol. Biol.* **50**, 29–42.
- Lee, H.-S., Huang, S. & Kao, T.-H. (1994) S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* **367**, 560–563.
- Li, J.-H., Nass, N., Kusaba, M., et al. (2000) A genetic map of the *Nicotiana glauca* S locus that includes three pollen-expressed genes. *Theor. Appl. Genet.* **100**, 956–964.
- Matsuura, T., Sakai, H., Unno, M., et al. (2001) Crystal structure at 1.5-Å resolution of *Pyrus pyrifolia* pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility. *J. Biol. Chem.* **276**, 45261–45269.
- Matton, D.P., Mau, S.-L., Okamoto, S., Clarke, A.E. & Newbigin, E. (1995) The S-locus of *Nicotiana glauca*: genomic organization and sequence analysis of two S-RNase alleles. *Plant Mol. Biol.* **28**, 847–858.
- McClure, B.A., Haring, V., Ebert, P.R., et al. (1989) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* **342**, 955–957.
- McCubbin, A.G. & Kao, T.-H. (2000) Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 333–364.
- McCubbin, A.G., Wang, X. & Kao, T.-H. (2000a) Identification of self-incompatibility (S-) locus linked pollen cDNA markers in *Petunia inflata*. *Genome* **43**, 619–627.
- McCubbin, A.G., Zuniga, C. & Kao, T.-H. (2000b) Construction of a binary bacterial artificial chromosome library of *Petunia inflata* and the isolation of large genomic fragments linked to the self-incompatibility (S-) locus. *Genome* **43**, 820–826.
- Murfett, J., Atherton, T.L., Mou, B., Gasser, C.S. & McClure, B.A. (1994) S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature* **367**, 563–566.
- Murray, M.G. & Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* **8**, 4321–4325.
- de Nettancourt, D. (1977) *Incompatibility in Angiosperms*. Berlin/Heidelberg/New York: Springer-Verlag.
- Phillips, A.L. & Huttly, A.K. (1994) Cloning of two gibberellin-regulated cDNAs from *Arabidopsis thaliana* by subtractive hybridization: expression of the tonoplast water channel, γ -TIP, is increased by GA3. *Cell* **12**, 1133–1142.
- Shiba, H., Iwano, M., Entani, T., et al. (2002) The dominance of alleles controlling self-incompatibility in *Brassica* pollen is regulated at the RNA level. *Plant Cell* **14**, 491–504.
- Shiba, H., Kenmochi, M., Sugihara, M., et al. (2003) Genomic organization of the S-locus region of *Brassica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press.
- Silva, N.F., Stone, S.L., Christie, L.N., et al. (2001) Expression of the S receptor kinase in self-compatible *Brassica napus* cv. Westar leads to the allele-specific rejection of self-incompatible *Brassica napus* pollen. *Mol. Gen. Genet.* **265**, 552–559.
- Skowrya, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J. & Harper, J.W. (1997) F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**, 209–219.
- Suzuki, G., Kai, N., Hirose, T., et al. (1999) Genomic organization of the S locus: identification and characterization of genes in SLG/SRK region of S₀ haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics* **153**, 391–400.
- Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A. & Hinata, K. (2000) The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature* **403**, 913–916.
- Takayama, S., Shimosato, H., Shiba, H., et al. (2001) Direct ligand-receptor interaction controls *Brassica* self-incompatibility. *Nature* **413**, 534–538.
- Tao, R., Habu, T., Yamane, H., Sugiura, A. & Iwamoto, K. (2000) Molecular markers for self-compatibility in Japanese apricot (*Prunus mume*). *HortSci.* **35**, 1121–1123.
- Ushijima, K., Sassa, H., Tamura, M., et al. (2001) Characterization of the S-locus region of almond (*Prunus dulcis*): analysis of a somaclonal mutant and a cosmid contig for an S haplotype. *Genetics* **158**, 379–386.
- Ushijima, K., Sassa, H., Tao, R., et al. (1998) Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the S-RNases in Rosaceae. *Mol. Gen. Genet.* **260**, 261–268.
- Yaegaki, H., Shimada, T., Moriguchi, T., Hayama, H., Haji, T. & Yamaguchi, M. (2001) Molecular characterization of S-RNase genes and S-genotypes in the Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). *Sex. Plant Reprod.* **13**, 251–257.

Received: 3 October 2002

Accepted: 30 November 2002

Molecular Polymorphism Distribution in Phenotypically Distinct Populations of Wine Yeast Strains

DOLORS NADAL,^{1,2} BRUNO COLOMER,² AND BENJAMIN PIÑA^{1*}

Centre d'Investigació i Desenvolupament, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Unitat de Biologia Molecular del Centre de Referència en Biotecnologia de la Generalitat de Catalunya, 08034 Barcelona,¹ and Ramon Nadal Giró, 08733 El Pla del Penedès, Barcelona,² Spain

Received 29 January 1996/Accepted 21 March 1996

Electrophoretic karyotyping and mitochondrial DNA restriction analysis were used to analyze natural yeast populations from fermenting musts in El Penedès, Spain. Both analyses revealed a considerable degree of polymorphism, indicating heterogeneous natural populations. By specifically designed genetic selection protocols, strains showing potentially interesting phenotypes, such as a high tolerance to ethanol and temperature or the ability to grow and to ferment in wine-water-sugar mixtures, were isolated from these natural populations. Genetic analysis showed a strong correlation between the selected phenotypes and mitochondrial DNA polymorphisms. Karyotype analysis revealed several genetically similar yeast lineages in the natural yeast microflora, which we interpret as genetically isolated subpopulations of yeast strains with distinct genetic traits, which may correspond to specific microenvironments. Thus, molecular polymorphism analysis may be useful not only to study the geographical distribution of natural yeast strains but also to identify strains with specific phenotypic properties.

El Penedès is the major sparkling-wine-producing region of Spain. For more than a century, wine and sparkling wine have been produced in this area from musts from three traditional grape varieties, Macabeu, Xarel·lo, and Parellada. Although the traditional practice is the use of natural mycoflora to start must fermentation, commercial yeast strains have been used in the last decade as starters to increase the velocity and reproducibility of fermentations. In addition, production of sparkling wine by the traditional method requires the addition of sugar and preconditioned yeast cells (the so-called pied de cup) to young wine and requires the so-called second fermentation to proceed for several months in the characteristic sparkling-wine bottles. During the second fermentation, yeasts must ferment all the sugar available, increasing the alcohol concentration and building a considerable CO₂ pressure in the bottle. Very few yeast strains from the natural mycoflora are able to ferment under such demanding conditions; therefore, we started the analysis and characterization of the mycoflora associated with the three traditional grape varieties from El Penedès so that we could isolate naturally occurring yeast strains with the appropriate genetic makeup to be used through the processes from must to sparkling wine.

Although wine yeast strains have been used for centuries, their unequivocal characterization has been possible only recently, when genomic, karyotypic, and mitochondrial DNA (mtDNA) analyses have permitted us to identify them and to monitor their evolution in spontaneous fermentations (21, 27, 28). The yeast microfloras in different wine-producing regions have been analyzed (26, 28). The data show changes in the composition of the microflora between different vineyards and from one year to another in the same vineyard (26, 28). In addition, a sequential substitution of *Saccharomyces cerevisiae* strains occurs in must fermentations as they progress to higher levels of alcohol (19, 22).

In this paper, we present a study of the natural yeast microfloras of fermenting musts from the three traditional grape varieties from El Penedès, characterized by both mtDNA and karyotype patterns. We then define a set of selectable and/or screenable phenotypic characteristics indicative of their usefulness in sparkling-wine production. Third, we correlate the genetic patterns of the isolated yeast strains with these selectable characteristics. We conclude that the natural mycofloras are made up of relatively small, genetically isolated yeast subpopulations that can be distinguished by both their genetic markers and their phenotypic characteristics. Several studies have shown a geographic distribution of molecular polymorphisms in different wine-producing areas (4, 11, 19, 26, 28); in this work, we show that these polymorphisms detect not only differences between the different "terroirs" but also the phenotypic variation among strains sharing the same distribution area.

MATERIALS AND METHODS

Sampling of yeast strains. Grapes of the three traditional varieties of Macabeu, Xarel·lo, and Parellada from the vineyards of the firm Nadal, located in El Pla del Penedès, 50 km southwest of Barcelona, Spain, were separately pressed, clarified, and allowed to ferment in 20,000-liter tanks in accordance with the standard procedures of the firm. Samples from the surface, the center, and the bottom of the three tanks were taken at different stages of fermentation, as monitored by the change of the fermenting must density. From a starting density of 1.070 g/liter, samples were taken at 1.025, 1.010, and 995 g/liter, corresponding to alcohol concentrations of 6.5, 8.5, and 10.5% (vol/vol). Yeast cells present in the samples were centrifuged, resuspended in YPD (10 g of peptone per liter, 5 g of yeast extract per liter, 2% glucose) and frozen at -80°C after the addition of glycerol to 50%. Streaks from the starting frozen samples on YPD plates were incubated at 30°C, and several isolated colonies from each plate were picked, restreaked, grown in YPD, and frozen as described above.

Metabolic tests. Utilization of different carbon sources was tested on YEP or SD plates (SD is yeast nitrogen base [GIBCO] plus ammonium sulfate, without amino acids) with 2% of the appropriate carbon source (glucose, maltose, sucrose, lactose, or galactose). Sporulation plates were prepared as described previously (23). Utilization of nitrate and lysine as nitrogen sources was tested with agar plates containing 0.6% glucose, 1.7 g of yeast nitrogen base (without either ammonium sulfate or amino acids) per liter, 5 g of sodium sulfate per liter, and 0.5% either lysine or sodium nitrate. Strains that were sucrose positive, maltose positive, lactose negative, nitrate negative, and lysine negative were considered to be candidates for belonging to the genus *Saccharomyces* (3, 5, 13).

mtDNA analysis. Total DNA extraction and restriction pattern analysis of

* Corresponding author. Mailing address: CID-CSIC, Jordi Girona, 18, 08034 Barcelona, Spain. Phone: 34-3-400 61 57. Fax: 34-3-204 59 04. Electronic mail address: bpcbm@cid.csic.es.

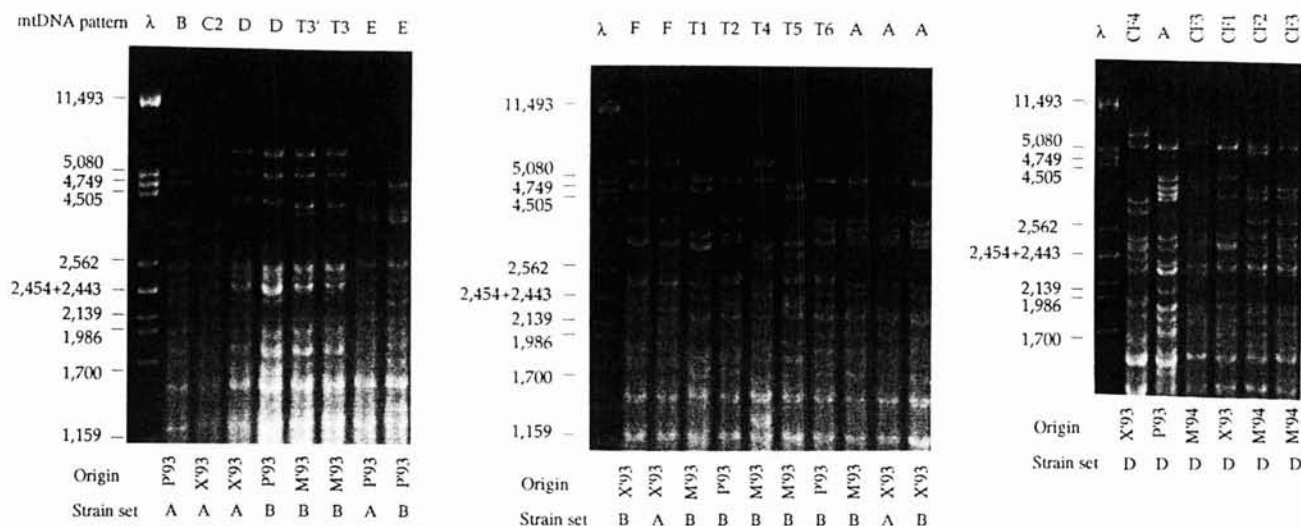


FIG. 1. *HinfI* restriction patterns of different strains from El Penedès. Lambda DNA digested with *PstI* was used as the size marker; numbers indicate the sizes in base pairs of the different restriction fragments. The three gels show most mtDNA patterns found at least three times in our different strain sets. Capital letters at the top indicate the code assigned to each mtDNA pattern. At the bottom, M'93, X'93, P'93, and M'94 indicate the original fermentations from which the strains were isolated; the strain sets to which they belong are also indicated (see the text and Table 1). Note the appearance of strains with identical mtDNA restriction profiles in different original fermentations and in different strain sets.

mtDNA were performed by the method of Querol et al. (21), except that lyticase from *Oerskovia xanthoneolytica*, prepared as described previously (25), was used to digest the cell wall. Yeast DNA was digested with either *HinfI*, *RsaI*, or *TaqI*, and digestions were analyzed in TBE (100 mM Tris-borate, 5 mM EDTA [pH 8.4]) containing 1% agarose gels.

Karyotype analysis. Late-logarithmic-phase yeast cultures were embedded in low-melting-point agarose and sequentially digested with lyticase and proteinase K as described previously (10). Yeast chromosomes were separated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in a Hula-Gel (Hoeffer) at 180 V, with a pulse ramp from 60 to 120 s, for a total of 40 h in 0.5× TBE buffer at 12°C.

Experimental fermentations. Selection schemes and small-scale fermentations (5 to 500 ml) were carried out with either YEPS (10 g of peptone per liter, 5 g of yeast extract per liter, 2% sucrose) or sterile wine. Wine obtained from the firm Nadal was sterilized by filtration through a 0.42-μm-pore-size filter (Schleicher & Schuell or Corning). Pasteurized or heat-treated wine gave nonreproducible results.

Pied de cup. Small-scale pied de cup were best performed in 2.5-liter flasks. A 1,200-ml volume of a mixture made from 840 ml of wine, 320 ml of water, 67 g of sucrose, 1.3 g of citric acid, and 360 mg of ENOVIT (AEB Spa, Brescia, Italy) was inoculated with washed cells from 150 ml of a YEPS-grown overnight culture of the appropriate strain. Flasks were kept at 17 to 20°C without agitation. The initial alcohol concentration was 7.5% (vol/vol). Fermentation progress was monitored by measurement of density loss. At an ethanol concentration of 9.5% (vol/vol), carefully measured wine-water-sugar mixtures were added to allow the alcohol concentration to rise to a final level of 11% (vol/vol) as a result of the metabolic activity of the cells. The final cell count was from 4×10^7 to 8×10^7 ml.

Enologic analysis. Fermentations were monitored by measuring the decrease in the medium density (with a standard enologic densimeter), the amount of reducing sugars remaining (with a standard kit from GAB, Moja, Spain [16]), or the alcohol content (with kit 176 290 from Boehringer Mannheim), using the conversion tables and/or instructions provided by the manufacturers in all cases.

RESULTS

Natural population of yeast cells in fermenting musts from El Penedès. Spontaneous fermentations of musts corresponding to the 1993 harvests of Macabeu (M'93), Xarel·lo (X'93), and Parellada (P'93) grapes and the 1994 harvest of Macabeu grapes (M'94) were monitored, and samples were taken at three different stages of the fermentation, as described in Materials and Methods. Yeast cells from these 12 samples were centrifuged, washed, and frozen as described in Materials and Methods. Then 10 to 12 independent clones from each of these 12 original yeast stocks (124 clones in total) were isolated on

YPD plates and separately frozen at -80°C . These 124 independent clones, referred to as set A, were tested for utilization of glucose, maltose, sucrose, lactose, and galactose as carbon sources and for utilization of lysine and nitrate as nitrogen sources. From the morphology of vegetative cells and of asci, as well as from metabolic data, we assigned most of the clones (116 of 124) to the genus *Saccharomyces*. Considering their mtDNA restriction patterns (Fig. 1) and chromosomal profiles (Fig. 2), as well as their metabolic behavior, we conclude that most, if not all, of our *Saccharomyces* clones correspond to *S. cerevisiae* (see below) (11). Of the remaining eight clones, many correspond to apiculated yeasts, presumably belonging to the genus *Kloeckera*, except for one or two clones that possibly belong to the genus *Kluyveromyces*.

mtDNA from several *Saccharomyces* clones was analyzed by the 4-base-cutting enzymes *HinfI*, *RsaI*, and *TaqI*, giving distinct restriction patterns. *RsaI* gave somewhat less diversity than either *TaqI* or *HinfI* (results not shown); therefore, we routinely used *HinfI* to group the isolated strains into classes according to their mtDNA restriction patterns and occasionally confirmed the homogeneity of these classes by using the other two enzymes. Figure 1 shows several different restriction patterns found in our samples.

The analysis of the 116 *Saccharomyces* clones isolated from spontaneously fermenting musts revealed a large degree of mtDNA polymorphism. At least 24 different mtDNA restriction patterns were observed (Table 1; Fig. 1). Three mtDNA restriction patterns (termed A, B, and C2) account for more than 70% of the whole set, although their relative proportions vary among the different fermentations. The remaining 30% of strains showed mtDNA restriction patterns that were unique or rare (one to five cases).

Selection of yeast strains for sparkling-wine production. Sparkling wine is produced in El Penedès by the traditional method first developed in La Champagne, France, in the 18th century. This procedure places great demands on yeasts, even for wine-producing yeast strains. It requires yeast cells to start fermentation in a medium that contains 10 to 11% (vol/vol)

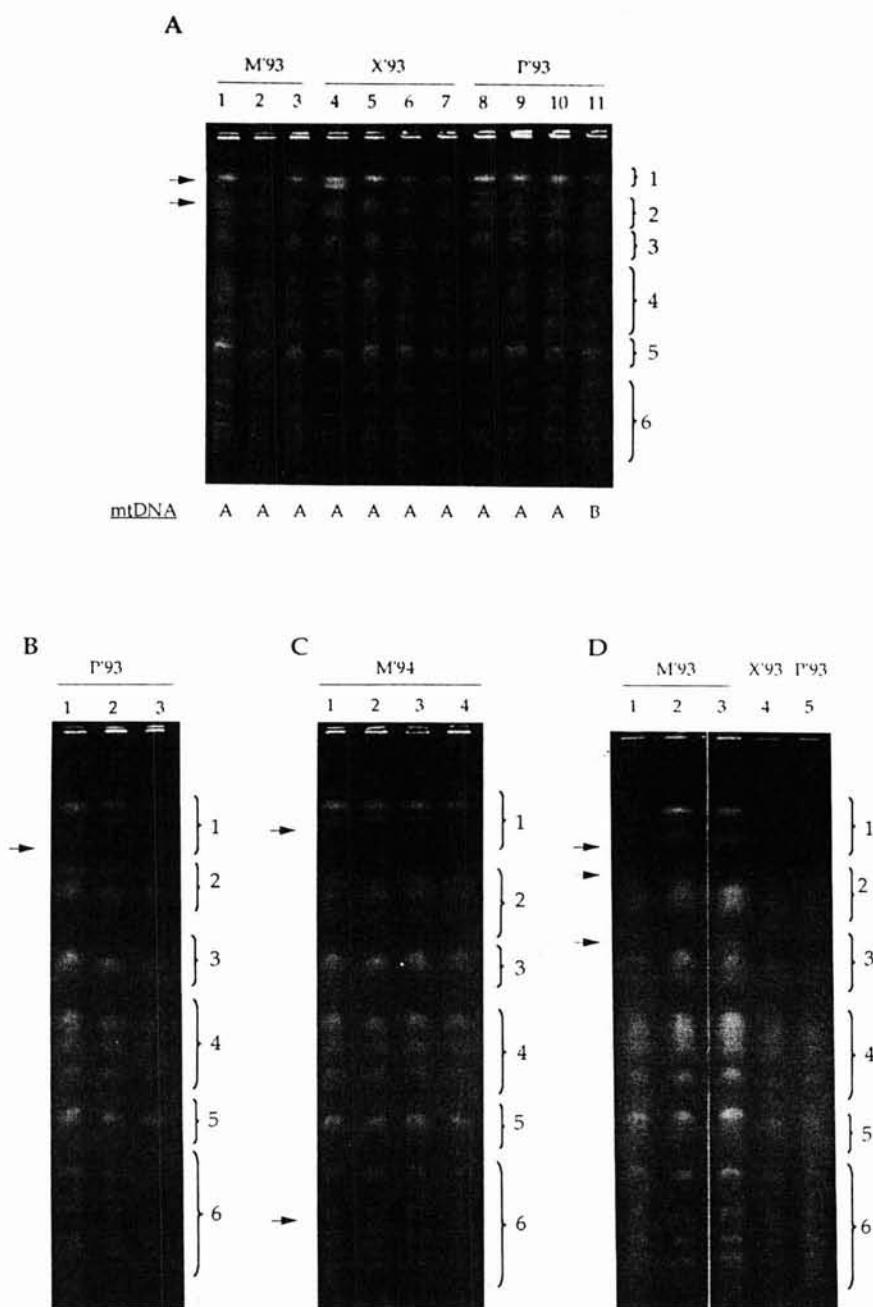


FIG. 2. PFGE of different *Saccharomyces* clones. M'93, X'93, P'93, and M'94 indicate the original fermentations from which the different clones were derived (Table 1). Brackets and numbers on the right show the chromosome groups as defined in the text and in Fig. 3. Arrows point to bands that show some heterogeneity among clones with the same mtDNA pattern. (A) Strains from set A; capital letters at the bottom indicate the mtDNA restriction pattern corresponding to each clone. Note that all lanes but lane 11 have mtDNA pattern A. (B) mtDNA restriction pattern D (floculent) strains. (C) mtDNA restriction pattern CF3 (highly fermentative) strains. (D) mtDNA restriction pattern T4 (heat-resistant) strains.

alcohol, which is inhibitory for most wine yeast strains. As a consequence of the high alcohol and low oxygen concentrations, yeast growth, which in musts occurs naturally during the first stages of the fermentation up to high cell counts, is much more difficult in the second fermentation. From our results, it seems very important for the success of the fermentation that yeast cells divide three to four times in the sparkling-wine bottle (not shown).

During the second fermentation of sparkling wine, toxicity

due to the rise in alcohol concentration is exacerbated by the parallel consumption of nutrients, mainly sugar and ammonium sources (see reference 7 and references therein). To isolate strains resistant to ethanol under these conditions, we inoculated wine plus 20 g of glucose per liter with the frozen yeast stocks and incubated these cultures at 30°C, taking advantage of the cumulative toxic effect of temperature and alcohol (7). A supplement of mineral salts (2.5 g of ammonium sulfate per liter, 1 g of potassium phosphate per liter, 0.5 g of

TABLE 1. Distribution of mtDNA patterns in the different spontaneous must fermentations

mtDNA	No. (%) of clones with mtDNA pattern				
	M'93	X'93	P'93	M'94	Total
A	11 (44.0)	5 (20.8)	11 (39.3)	17 (43.6)	44 (37.9)
B	5 (20.0)	1 (4.2)	11 (39.3)	3 (7.7)	20 (17.2)
C	3 (12.0)	0	0	1 (2.6)	4 (3.4)
C2	0	12 (50.0)	1 (3.6)	5 (12.8)	18 (15.5)
D	0	5 (20.8)	0	0	5 (4.3)
E	0	0	3 (10.7)	1 (2.6)	4 (3.4)
H	0	0	0	3 (7.7)	3 (2.6)
Other ^a	6 (24.0)	1 (4.2)	2 (7.1)	9 (23.1)	18 (15.5)
Total	25 (100.0)	24 (100.0)	28 (100.0)	39 (100.0)	116 (100.0)

^a mtDNA restriction patterns found only once or twice in all four samples.

magnesium sulfate per liter, 0.5 mg of zinc chloride per liter) was added to facilitate yeast growth. It must be pointed out that both the pied de cup and the sparkling-wine second fermentation are carried out in temperature-controlled environments, between 14 and 20°C; therefore, our test represents a considerable temperature stress. A total of 48 independent clones were isolated and characterized from this selection. This group of clones will be referred to below as set B.

A second absolute requirement for industrial sparkling-wine production is the ability to support the standard pied de cup protocol. This traditional practice ensures that yeast cells become gradually adapted to high levels of alcohol, so that they can serve as starters for the second fermentation. Small-scale pieds de cup were performed in 50-ml flasks containing a wine-water-sugar mixture with 740 ml of wine per liter and 65 g of sucrose per liter, designed to start from 8% ethanol and to reach 12% ethanol when all the sugar was consumed. Combinations of the three original frozen yeast stocks from each of the M'93, X'93, P'93, and M'94 fermentations were used to inoculate four flasks (one flask for each original fermentation), which were incubated at 20°C until most of the sugar was consumed. Then these cultures were used to inoculate a second set of flasks with a similar water-wine-sugar mixture but designed in this case to start at 9% ethanol and to finish at 12% ethanol. These flasks were again incubated at 20°C until all the available sugar had been consumed. Samples from this second round were kept frozen for further selection protocols (see below). A third round was performed, this time with wine plus 24 g of sugar as the medium per liter—the same conditions as in the second fermentation. A total of 17 clones were isolated and characterized from these last cultures (set C).

Finally, we developed a screening protocol to isolate yeast strains with high fermentation capacities. Test tubes containing wine-water-sugar mixtures (740 ml of wine per liter, 65 g of sucrose per liter) to raise the alcohol content from 8 to 12% (vol/vol) upon fermentation were separately inoculated with 90 independent clones from the second step of the pied de cup selection and incubated at 17°C. The fermentation capacity was monitored by using inverted Durham tubes and checking for the appearance of gas bubbles. The nine faster-fermenting clones (set D) were reisolated, rescreened, and stored as described above.

Genetic and mtDNA analysis of phenotypically selected yeast strains. Our next step was to analyze the different sets of yeast strains from the three different selection schemes (sets B, C, and D) and to compare their compositions with the random sample taken from the original yeast stocks (set A). On the

TABLE 2. Distribution of the different mtDNA patterns in all four sets of independent clones

mtDNA	No. (%) of clones with mtDNA pattern			
	Set A	Set B	Set C	Set D
A	44 (37.9)	15 (31.9)	1 (5.9)	1 (11.1)
B	20 (17.2)	0	0	0
C	4 (3.4)	0	0	0
C2	18 (15.5)	0	0	0
D	5 (4.3)	9 (19.1)	0	0
E	4 (3.4)	1 (2.1)	0	0
F	1 (0.9)	2 (4.3)	0	0
H	3 (2.6)	0	0	0
T1	0	10 (21.3)	0	0
T2	0	3 (6.4)	0	0
T3	0	3 (6.4)	0	0
T4	0	2 (4.3)	16 (94.1)	0
CF3	0	0	0	5 (55.6)
Other ^a	17 (14.7)	2 (4.3)	0	3 (33.3)
Total	116 (100.0)	47 (100.0)	17 (100.0)	9 (100.0)
Other genus ^b	8	0	0	0

^a mtDNA restriction patterns found less than three times in all four sets.

^b Non-*Saccharomyces* clones.

basis of their morphological and metabolic characteristics, as well as their mtDNA and karyotype patterns, we assigned all of them to *S. cerevisiae*. We presume that the selection schemes we imposed excluded clones from other species present in set A (Table 2). The mtDNA restriction analysis of these strains revealed 10 new restriction patterns that were not found in set A (Tables 1 and 2; Fig. 1). Apart from that, the composition of mtDNA patterns varied widely among the different sets. For example, mtDNA patterns B and C2 were absent from yeast strain sets B, C, and D, whereas they accounted for more than one-quarter of the clones in set A when combined. Conversely, mtDNA patterns T1 (21% of set B), T4 (94% of set C), and CF3 (56% of set D) were absent in set A, indicating that their combined proportion in the initial stocks was equal to or lower than 1%. The difference in composition between sets B, C, and D is also remarkable. These three sets had very few mtDNA patterns in common, and when a given mtDNA pattern was found in more than one set (like pattern T4 in sets B and C), its proportion was very different in the two sets (Table 2). mtDNA pattern A was present in all four sets, probably representing a major lineage in El Penedès natural populations. However, whereas it was found in a similar, high proportion in sets A and B, it was almost residual in sets C and D (Table 2).

We conclude from our data that our selection schemes have selected not only strains with determined phenotypic traits but also strains with different mtDNA patterns. To assess whether this correlation between the phenotype and mtDNA pattern is observed for different phenotypes, we screened our four sets of yeast strains for two completely independent phenotypes that we had not selected for: galactose utilization and flocculation.

The ability to grow on galactose was once used as a systematic key to distinguish between the species *S. cerevisiae* and *S. bayanus* (13). According to the latest systematic tendencies, the species *S. bayanus* (*S. uvarum*) should be reserved for a much better defined set of yeasts, regardless of whether they use galactose or melibiose (3, 15). Nevertheless, galactose utilization is a very easy test that can be used to trace specific genetic makeups. All tested strains of mtDNA restriction patterns A, B, and T4 were able to grow in galactose, whereas only one of

TABLE 3. Appearance of galactose utilization and flocculation phenotypes in clones with different mtDNA patterns

mtDNA	No. of clones tested	No. of clones showing:	
		Growth in galactose	Flocculation
A	16	16	0
B	6	6	0
D	8	1	8
T4	8	8	0
CF3	5	0	0

eight mtDNA restriction pattern D strains and none of the mtDNA restriction pattern CF3 strains showed this phenotype (Table 3). Thus, our data show a clear correlation between mtDNA pattern and galactose utilization.

Flocculation is a very desirable property for many applications, because it facilitates the removal of cells from the medium (24). In sparkling-wine production, it could facilitate the process of removal of yeast cells and cell debris immediately before commercial corking of the bottles, a very time-consuming step called riddling or *rémuage*. In our strains, we observed a very strong correlation between flocculation capacity and mtDNA pattern D; all clones showing this mtDNA pattern were flocculent, and all flocculent clones found up to now showed this particular mtDNA pattern (Table 3).

Karyotypic analysis of wine strains from El Penedès. Karyotypic analysis has been widely used to characterize wine yeast strains (2, 4, 8). We used different strains from all four yeast strain sets (Fig. 2) to analyze the karyotypic diversity of the natural populations and to compare it with the diversity found by the mtDNA restriction pattern analysis. To this end, we analyzed by PFGE several independent clones of each of the patterns A, D, CF3, and T4 (Fig. 2), choosing clones isolated from different original musts when possible. It must be pointed out that these four subgroups of clones show not only different mtDNA patterns but also different phenotypic traits. mtDNA pattern A is the major mtDNA pattern in most fermenting musts. Strains showing mtDNA pattern D are the only ones that are flocculent, whereas CF3 strains are strongly fermentative and T4 strains are resistant to heat stress.

Interpretation of PFGE gels is not easy, partially because of the large variability in size of yeast chromosomes (14). Therefore, we consider it not practical to assign specific chromosome numbers to each band from the wild-type strains, as we can do for laboratory strains (Fig. 3) (10). Instead, and for simplicity of discussion, we arbitrarily define six groups of chromosomes that are easy to identify under our PFGE conditions (Fig. 2 and 3). These groups can also be identified in haploid laboratory strains, in which specific chromosomes can be assigned to each band or group of bands, as shown in Fig. 3. It is tempting to assign corresponding bands in wild strains to each chromosome in the same way, but we consider that it would be too risky without appropriate gene-mapping experiments, which we have not yet performed.

From the gels in Fig. 2 and the scheme in Fig. 3, several conclusions can be drawn. First, all karyotypes are relatively similar, with similar numbers of chromosomal bands running in similar positions in the gel. Second, strains with different mtDNA restriction patterns also show different karyotype profiles, as can be observed by comparing chromosome group 3 from lanes 10 (mtDNA pattern A) and 11 (mtDNA pattern B) in Fig. 2A or chromosome groups 2, 3, and 6 from strains showing mtDNA patterns D, CF3, and T4 in Fig. 2B to D. These differences are schematically summarized in Fig. 3.

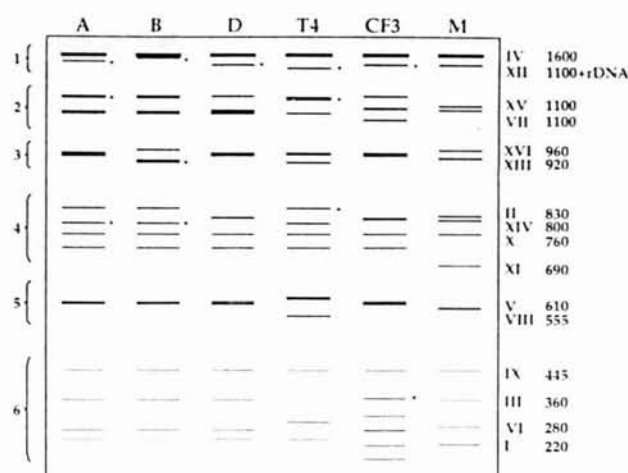


FIG. 3. Schematic representation of different karyotypes from different clones showing mtDNA patterns A, B, D, T4, and CF3 (indicated at the top). Asterisks indicate bands that show some variability among clones with the same mtDNA restriction pattern (data from many different gels). M corresponds to a laboratory haploid strain, W303a (from the Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, Calif.). Roman numerals on the right mark the positions of the different yeast chromosomes of the laboratory strain; arabic numbers next to them indicate the chromosome sizes in kilobases (from reference 10). For simplicity, we have subdivided the karyotypes into six different chromosome groups, indicated on the left.

A third aspect, shown in Fig. 2, is a certain karyotype heterogeneity among strains with the same mtDNA pattern. This heterogeneity is increased in the fastest band on chromosome group 1. For example, in Fig. 2A, all lanes but lane 11 correspond to strains showing mtDNA restriction pattern A; nevertheless, comparison of this band from different lanes reveals a clear heterogeneity in both the position and intensity of this band. The same can be said for strains showing mtDNA patterns D, CF3, and, perhaps less clearly, T4 (Fig. 2B to D). Apart from that, differences are observed in other groups of bands. For example, in Fig. 2A, lanes 4 to 7 (X'93 strains) show a different pattern of the relative intensities of the two bands on chromosome group 2 compared with the rest of mtDNA pattern A strains (either M'93 or P'93 strains). Densitometric analysis of this region of the gel gives an upper-to-lower band ratio of 0.34 ± 0.04 for X'93 strains and 1.16 ± 0.09 for M'93 and P'93 strains, suggesting heterozygosity in the X'93 strains. Karyotypes from mtDNA pattern D strains (Fig. 2B) show differences only in the hypervariable band. Strains with pattern CF3 are somewhat less homogeneous, because some minor differences can be seen not only in the hypervariable band but also in the second-slowest band of chromosome group 6 (Fig. 2C, lower arrow). Similarly, mtDNA pattern T4 strains (Fig. 2C) show differences in chromosome groups 1, 2, and 3; strains showing larger differences (like, for example, lanes 3 and 4 in Fig. 2D) come from different original fermenting musts.

Taken together, the results of our karyotype analysis show differences between strains with different mtDNA patterns, a certain heterogeneity among strains showing the same mtDNA pattern, and a hypervariable, low-mobility PFGE band. As a general trait, strains from the same grape variety tend to be more similar to each other than to strains with the same mtDNA restriction pattern from other grape varieties, suggesting that the karyotype pattern is a good indicator of the degree of genetic proximity between strains.

DISCUSSION

Our study of the yeast microflora in a particular vineyard in El Penedès has some interesting peculiarities. Our samples come from a relatively small vineyard of about 120 ha where the three traditional grape varieties are grown and harvested. It is also an ancient vineyard, as it appears in reports from the 16th century. Finally, the standard procedures followed routinely by the firm Nadal allowed us first to take samples of the three separated fermentations corresponding to the three grape varieties and, second, to test isolated clones for sparkling-wine production under conditions very similar to the regular commercial procedures.

The analysis of the natural mycoflora of fermenting musts from El Penedès shows a large variability in the molecular polymorphisms, revealed by both mtDNA pattern and karyotype data. Some degree of diversity has also been reported in similar studies from different French (4, 26, 28) and Spanish (11, 19) vineyards, but in our case it is probably increased by the circumstance that three different grape varieties are separately cultivated and processed. The differences in mtDNA pattern composition seen among grape varieties harvested in the same year can arise from either differences in the initial mycoflora present on the grapes, differences in the composition of nutrients of the resulting musts, or differences in climatic conditions during the harvests. Macabeu is harvested between the last week of August and the first 2 weeks of September, Xarel·lo is harvested in 2 or 3 weeks in the middle of September, and Parellada is harvested at the end of September and the beginning of October.

mtDNA restriction patterns have been widely used to identify wine yeast strains (11, 18–20, 28). However, the meaning of the heterogeneity in mtDNA restriction pattern is not clear. It has been reported recently that mtDNA structure can be used as a systematic test to distinguish between very similar *Saccharomyces* species (6, 11), so that the overall structure of the mitochondrial genome is probably rather homogeneous among *S. cerevisiae* strains. The observed polymorphisms most probably arise from either point mutations or small deletions rather than from larger rearrangements of the mitochondrial genome. The mitochondrial genome of *S. cerevisiae* has been reported to recombine with high frequency, since markers separated by only 1.5 kb behave as though they are genetically unlinked (9, 17). Thus, mtDNA lineages are independently maintained and accumulate genetic variations during vegetative growth; in sporulation/conjugation cycles, recombination between the two parental mtDNA genomes results in a further increase in mtDNA heterogeneity. From this point of view, mtDNA patterns reflect the genetic pedigree of the clone, because zygotes inherit significant proportions of the mtDNA genome from both parental strains.

Karyotype analysis shows a clear heterogeneity between the different sets of strains. Although most of this heterogeneity occurs between clones with different mtDNA patterns (Fig. 3), some variation is observed among clones with the same mtDNA pattern, especially for clones isolated from different fermentations (Fig. 2 and 3). In this regard, the observed hypervariability of a low-mobility band, which can be used as an indication of clonality, is particularly interesting. In laboratory strains, this band corresponds to chromosome XII, which includes the repetitive rDNA genes (10). We consider it likely that the hypervariability of this band in wine strains corresponds to differential amplifications of rDNA genes, but we have not tested this hypothesis.

Karyotype is obviously dependent on the pedigree of each particular clone, because each parent haploid cell supplies half

of its genome to the zygote. In addition, karyotype patterns are reported to be relatively unstable even in nonselective, normal vegetative growth (14). We are concerned about the possibility that some of this variation arose during our own experimental fermentations or selection tests; that is, clones that we consider independent because they have different karyotypes may be vegetative progeny of a single cell in the original sample. There is probably no good answer to this concern, for we do not know the frequency of these changes in our populations. Presumably, large changes in the number of rDNA gene repeats occur with relatively high frequency, so that populations with the same mtDNA pattern and identical karyotypes except for the hypervariable band are probably very closely related. On the other hand, differences in the mobility of several bands, as observed between mtDNA pattern A strains from the original samples from Macabeu and Xarel·lo (Fig. 2), probably correspond to totally independent clones with a common mtDNA lineage.

The sparkling-wine second fermentation represents a formidable challenge to the yeast metabolism. The search for yeast clones that are able to carry it out led us to develop different selection schemes that gave us three different sets of yeast strains (sets B, C, and D). These yeast strain sets not only have different phenotypic traits but also have different distributions of mtDNA patterns than set A, a random sample from the original yeast stocks (Table 1). Two independent phenotypic traits, the ability to flocculate and galactose utilization, also show a clear correlation with the mtDNA pattern (Table 3). Although the study is not complete yet, we have observed that the ability to produce sparkling wine and to sustain an industrial pied de cup also correlates with specific mtDNA patterns (data not shown).

To our knowledge, our study is the first one that shows a correlation between molecular polymorphisms and specific phenotypic traits in wild *S. cerevisiae* strains from the same vineyard. Mitochondrial metabolism has been related to ethanol tolerance (1), allowing the possibility of a direct relationship between mtDNA genetic polymorphism and this particular phenotype. This relationship is much harder to imagine for flocculation and galactose utilization. For both cases, a great deal of genetic information is available, invariably referring to specific sets of nuclear genes (12, 24). Therefore, we favor the idea that the different mtDNA patterns are indicative only of distinct subpopulations of the natural yeast microflora, each with its own karyotype and mtDNA lineages. These populations are probably genetically isolated from each other; otherwise, phenotypes like galactose utilization and flocculation would have been more widespread among strains with different mtDNA patterns.

We interpret the appearance of strains with the same mtDNA pattern and similar phenotypic characteristics but with somewhat different karyotype profiles as an indication that our sets originated not from a single original cell but from a pre-existent population of different, related yeast clones. The presence of such a mosaic of phenotypically distinct natural yeast populations, perhaps reflecting an adaptation to specific microenvironments, has very important implications for the ecology and for the biotechnological use of wild yeast strains. The correlation between different relevant phenotypes and specific mtDNA polymorphisms can facilitate the isolation and characterization of wild yeast populations with the desired metabolic and genetic traits.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Enric Bartra and Antonio Cantos, INCAVI, Vilafranca del Penedès, Spain, Rafael Oliva, University of Barcelona, Amparo Querol and Daniel Ramón, IATA-CSIC, Valencia, Spain, and Lluís

Cornudella, CID-CSIC, Barcelona, Spain, for their advice and useful comments.

This work has been supported by a grant from the Spanish Ministry of Education and Science (PB92-0051) and additional support from the Spanish Ministry of Education and Science (APC93-0010), the Generalitat de Catalunya (GRO93-8024), and the Alexander von Humboldt Stiftung (Germany) to B.P. D.N. has been partially supported by fellowships (RE93-05 and RI94-20) from the Generalitat de Catalunya. The firm Ramon Nadal Giró also acknowledges a grant from the Generalitat de Catalunya (IT94/214).

REFERENCES

1. Aguilera, A., and T. Benítez. 1985. Role of mitochondria in ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **142**:389-392.
2. Bakalinsky, A. T., and R. Snow. 1990. The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**:367-382.
3. Barnett, J. A. 1992. The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Reess: a short review for non-taxonomists. *Yeast* **8**:1-23.
4. Biddenne, C., B. Blondin, S. Dequin, and E. Vezinhet. 1992. Analysis of the chromosomal polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **22**:1-17.
5. Campbell, I. 1988. Culture, storage, isolation and identification of yeasts, p. 1-8. In I. Campbell and J. H. Duffus (ed.), *Yeast, a practical approach*. IRL Press, Oxford.
6. Cardazzo, B., T. Rinaldi, G. Sartori, L. Frontali, G. Carignani, and C. Palleschi. 1995. Comparative analysis of the mitochondrial genome structure in the two related yeast species *S. cerevisiae* and *S. douglasii*. *Yeast* **11**(Spec. Issue):S624.
7. D'Amore, T., C. J. Panchal, I. Russell, and G. G. Steward. 1990. A study of ethanol tolerance in yeast. *Crit. Rev. Biotechnol.* **9**:287-304.
8. De Jonge, P., F. C. M. De Jongh, R. Meijers, H. Y. Steensma, and W. A. Scheffers. 1986. Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis banding patterns of DNA from yeasts. *Yeast* **2**:193-204.
9. Dujon, B. 1981. Mitochondrial genetics and functions, p. 505-635. In N. Strathern, E. W. Jones, and J. R. Broach (ed.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces*, vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
10. Gerring, S. L., C. Connelly, and P. Hieter. 1991. Positional mapping of genes by chromosome blotting and chromosome fragmentation. *Methods Enzymol.* **194**:57-77.
11. Guzmán, J. M., E. Barrio, T. Huerta, and A. Querol. 1994. Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces* sensu stricto complex according to mitochondrial DNA patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:708-714.
12. Johnston, M., and M. Carlson. 1992. Regulation of carbon and phosphate utilization, p. 193-281. In E. W. Jones, J. R. Pringle, and J. R. Broach (ed.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
13. Lodder, J. 1970. *The yeasts. A taxonomic study*. Elsevier/North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
14. Longo, E., and F. Vezinhet. 1993. Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:322-326.
15. Masneuf, L., M. Aigle, and D. Dubourdieu. 1995. Development of PCR-RFLP tool for *Saccharomyces cerevisiae*/*Saccharomyces bayanus* identification in oenology. *Yeast* **11**:S571.
16. O.I.V. 1990. *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins*, p. 91-96. O.I.V., Paris.
17. Piskur, J. 1994. Inheritance of the yeast mitochondrial genome. *Plasmid* **31**:229-241.
18. Querol, A., and E. Barrio. 1990. A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* **18**:1657.
19. Querol, A., E. Barrio, T. Huerta, and D. Ramón. 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2948-2953.
20. Querol, A., E. Barrio, T. Huerta, and D. Ramón. 1993. Utilización de técnicas moleculares para la caracterización de levaduras vinicas y el estudio del proceso de vinificación. *Microbiología Soc. Esp. Microbiol.* **9**:76-82.
21. Querol, A., E. Barrio, and D. Ramón. 1992. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:439-446.
22. Querol, A., E. Barrio, and D. Ramón. 1994. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **21**:315-323.
23. Sherman, F. 1991. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **194**:3-21.
24. Stratford, M. 1992. Yeast flocculation: a new perspective. *Adv. Microb. Physiol.* **33**:1-71.
25. Verdier, J.-M., R. Stalder, M. Roberge, B. Amati, A. Sentenac, and S. M. Gasser. 1990. Preparation and characterization of yeast nuclear extracts for efficient RNA polymerase B (II)-dependent transcription in vitro. *Nucleic Acids Res.* **18**:7033-7039.
26. Versavaud, A., P. Courcoux, C. Roulland, L. Dulau, and J. N. Hallet. 1995. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3521-3529.
27. Vezinhet, F., B. Blondin, and J.-N. Hallet. 1990. Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enologic strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**:568-571.
28. Vezinhet, F., J.-N. Hallet, M. Valade, and A. Poulard. 1992. Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**:83-86.

Karyotype Rearrangements in a Wine Yeast Strain by *rad52*-Dependent and *rad52*-Independent Mechanisms

David Carro,¹ Enric Bartra,² and Benjamin Piña^{1*}

¹Institut de Biologia Molecular de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 08034 Barcelona, and ²Institut Català de la Vinya i el Vi, 08720 Vilafranca del Penedès, Barcelona, Spain

Received 2 August 2002/Accepted 18 January 2003

Yeast strains isolated from the wild may undergo karyotype changes during vegetative growth, a characteristic that compromises their utility in genetic improvement projects for industrial purposes. Karyotype instability is a dominant trait, segregating among meiotic derivatives as if it depended upon only a few genetic elements. We show that disrupting the *RAD52* gene in a hypervariable strain partially stabilizes its karyotype. Specifically, *RAD52* disruption eliminated recombination at telomeric and subtelomeric sequences, had no influence on ribosomal DNA rearrangement rates, and reduced to 30% the rate of changes in chromosomal size. Thus, there are at least three mechanisms related to karyotype instability in wild yeast strains, two of them not requiring *RAD52*-mediated homologous recombination. When utilized for a standard sparkling-wine second fermentation, $\Delta rad52$ strains retained the enological properties of the parental strain, specifically its vigorous fermentation capability. These data increase our understanding of the mechanisms of karyotype instability in yeast strains isolated from the wild and illustrate the feasibility and limitations of genetic remediation to increase the suitability of natural strains for industrial processes.

Karyotype instability during vegetative growth is common in many naturally occurring yeast strains (4, 5, 10, 13, 18, 21). This phenotype can be monitored only by examining karyotypes of large numbers of clones isolated after several generations of vegetative growth. There is no good model for this phenotype in standard laboratory strains, for which many genetic tools are applicable.

We previously analyzed karyotype instability in strain DC5 (4). This karyotypically unstable strain produced karyotypically stable meiotic products with high frequency. From these results we inferred that karyotype instability might be governed by relatively few genetic elements and that it might be possible to stabilize the karyotype of unstable strains by disrupting one, or more, of the genes involved.

Mitotic and meiotic karyotype variations in natural and industrial yeast strains have been related to chromosomal translocations due to ectopic recombination between homologous sequences interspersed in the yeast genome, such as Ty elements, delta elements, or Y' elements (5, 18, 21). A direct prediction of this model is that chromosomal rearrangements require a functional *RAD52* gene for homologous recombination (16). Our objectives in the present study were (i) to obtain and characterize a $\Delta rad52$ derivative of an unstable yeast strain to determine the role of homologous recombination in karyotype variability during vegetative growth and (ii) to determine whether the fermentation abilities of the disrupted strain have been altered.

MATERIALS AND METHODS

Culture medium and conditions. All strains were grown in YEPS medium (5 g of yeast extract/liter, 20 g of sucrose/liter, 10 g of peptone/liter; Pronadisa, Madrid, Spain) and were incubated at 30°C with continuous shaking (250 rpm). YPD plates contained 5 g of yeast extract/liter, 20 g of glucose/liter, 10 g of peptone/liter, and 20 g of Bacto agar (Pronadisa)/liter.

Serial cultures. Strain DC5 was isolated and characterized among a collection of wine yeast strains from El Penedès, located 50 km southwest of Barcelona, Spain (4, 14, 13). Serial cultures were grown in 2 ml of YEPS at 30°C in 15-ml culture tubes. After 24 h of culture in a roller, cultures reached near saturation (optical density at 600 nm [OD_{600}] of >10) and were used to inoculate fresh tubes to an OD_{600} of 0.05. The growth and subculturing process was repeated until these serial cultures completed 100 doublings (ca. 10 to 15 transfers). A sample from the last culture was spread on a YPD plate and incubated at 30°C for 2 days. At least nine clones were picked from each plate, grown in YPD, and stored at -80°C after the addition of 50% glycerol. The frozen stocks were used for all further analyses.

Karyotype analysis. Yeast cells from late-exponential-phase cultures were embedded in low-melting-point agarose (Pronadisa). The resulting plugs were incubated first with Lyticase (Sigma, St. Louis, Mo.) and then with proteinase K (Sigma) to digest both yeast wall and yeast proteins, as previously described (7). Yeast chromosomes were separated by pulsed-field gel electrophoresis in a Hula-Gel apparatus (Hofer Instruments, San Francisco, Calif.) at 200 V by using a pulse ramp from 60 to 150 s for 50 h in $\times 0.5$ TBE buffer (100 mM Tris-hydroxymethylaminomethane borate, 5 mM EDTA; pH 8.4) at 12°C.

Calculation of rearrangement rates. The rate of chromosomal rearrangements per generation R was calculated from the fraction of clones showing a karyotype pattern identical to the input strain after 100 doublings (P_i) according to the following formula (4): $R = 1 - P_i^{0.01}$.

Statistical analyses. Significance tests between assays were performed as 2×2 contingency tables. Significance values were calculated by the χ^2 function with 1 degree of freedom.

PCR protocols. DNA sequences for the *kan^r* gene and *nat1* (nourseothricin N-acetyltransferase) genes, conferring resistance to Geneticin and nourseothricin, respectively, were amplified by PCR from plasmids pFA6-kanMX4 (23) and pAG25 (natMX4) (9), respectively, by using the following primers (*RAD52* sequences are capitalized): *RAD52* Δ -up (5'-GAAGTTGCAGCCTTAGCTGT AACAAAGGTgcattagccactagtgatctg-3') and *RAD52* Δ -lo (5'-TAGGACCTG AGTATATCTCCAAGAGAGTTGGGTTTGGAcagctgaagcttgcagc-3').

A *nat1*-disrupted endogenous *rad52* locus from a transformed yeast strain was amplified with the following primers: *rad52b*-up (5'-TTACGCGACCGGTAT CGA-3') and *rad52b*-lo (5'-TATTGTTCGGCCAGGAAG-3').

* Corresponding author. Mailing address: Institut de Biologia Molecular de Barcelona, CSIC, Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain. Phone: 34-93-4006157. Fax: 34-93-2045904. E-mail: bpcbm@cid.csic.es.

PCR conditions. PCR was performed with 1 U of DyNzyme Ext DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland), either 0.1 ng of DNA (plasmids) or 10 ng of genomic DNA, and 10 pmol of each primer. After an initial denaturation step at 5 min for 94°C, primers were annealed for 1 min at 48°C and extension was allowed to proceed for either 1.5 min (disruption cassette) or 3 min (disrupted genomic fragment from the heterozygote) at 72°C. After redensaturation for 1 min at 94°C, the cycle was repeated 30 times.

Yeast transformation. Strain DC5 was transformed with the different PCR products by the lithium acetate method (8, 19), with minor modifications. Yeast transformants were selected in YPD plates containing 200 mg of Geneticin (Sigma) or 100 mg of clonNat (Hans-Knöll Institute für Naturstoff Forschung, Jena, Germany) liter. Double transformants were isolated on plates containing both antibiotics.

DNA isolation. DNA was extracted as previously described (20) with some modifications. A dense culture was washed in 50 mM EDTA (pH 7.5) and treated with Lyticase (1 mg/ml; Sigma) and RNase A (20 mg/ml; Sigma) for 1 h at 37°C. After centrifugation (15,000 × g, 1 min), the cell pellet was resuspended in 800 µl of lysis buffer (50 mM Tris HCl, 10 mM EDTA, 2% sodium dodecyl sulfate; pH 8.0). Upon addition of 150 µl of 5 M potassium acetate at pH 4.8, the cells were placed on ice for 1 h and pelleted by centrifugation at 15,000 × g for 15 min. The supernatant was extracted with phenol three times, once with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1), precipitated with two volumes of ethanol at -20°C for 30 min, and air dried.

Southern blot. Purified DNA was resuspended in TE and digested with appropriate enzymes. DNA fragments were separated in 0.8% agarose-TBE-gel electrophoresis, denatured, and blotted onto Hybond-N+ filters (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions. The *RAD52* probe was obtained by amplification of DNA of the laboratory strain W303a (from the Yeast Stock Center, American Type Culture Collection, Manassas, Va.) with the primers *rad52b-up* and *rad52b-lo*. The Y' probe was obtained from plasmid pEL42H10-7 4.8 (11). Both probes were labeled with fluorescein-12-UTP (Roche, Mannheim, Germany) by the random primer protocol (Ready-to-Go; Amersham Pharmacia). Prehybridization was performed in 50% formamide-0.25 M sodium phosphate buffer (pH 7.2)-7% sodium dodecyl sulfate-1 mM EDTA-50 µg of salmon sperm DNA (Sigma)/ml at 42°C for 4 h. Hybridization was performed at 42°C overnight in the prehybridization solution plus the labeled DNA probe. The fluorescein-labeled probe was detected by an alkaline phosphatase-linked antibody (Fluor-X-AP; Tropix, Bedford, Mass.), according to the manufacturer's instructions, by using CDP-Star (Boehringer, Mannheim, Germany) in 0.1 M diethanolamine (pH 10)-1 mM MgCl₂ as a chemiluminescent substrate. Chemiluminescence was recorded by exposing Kodak X-Omat AR (Kodak, Ltd., London, United Kingdom) films for 2 to 15 min, at room temperature.

Experimental fermentations. Yeast strains were propagated in heat-treated grape juice (15 min at 110°C) and then adapted and grown in the base wine, according to standard procedures (pied de cup [1]). Yeast growth was followed by turbidimetry (Hach ratio and *sr* Turbidimeter; Hach Company, Loveland, Colo.). All trials were performed in heat-treated, 2000 vintage base wine. This base wine was a blend of young wines from Chardonnay, Macabeu, and Perellada grape cultivars; its composition was determined by standard enological determinations (6). Sparkling wine second fermentations were performed with this base wine in autoclaved standard 750-ml bottles modified to withstand up to 10 bar. Bottles were filled with a mixture of base wine, sucrose, and pied de cup containing 10% ethanol, 6 g of titrable acidity, 24 g of sucrose liter, and 10⁶ viable yeast cells per ml. Fermentation progress was monitored with pressure gauges.

RESULTS

Generation of a $\Delta rad52$ DC5 derivative. We attempted to disrupt both copies of *RAD52* of DC5 by using two noncomplementary, non-mutually interfering antibiotic resistance markers, *kan^r* and *natI* (9) (Fig. 1A). We amplified cassettes encompassing the resistance markers with chimeric primers encompassing the relevant sequences of the corresponding plasmids, as well as base positions 185 to 213 (upper primers) and 1044 to 1070 (lower primers) from the *RAD52* open reading frame (positions relative to the first ATG), whereas we obtained single disruptions at relatively high frequency with both selection strategies. Simultaneous or sequential disruption of the two *RAD52* alleles by transforming with these PCR

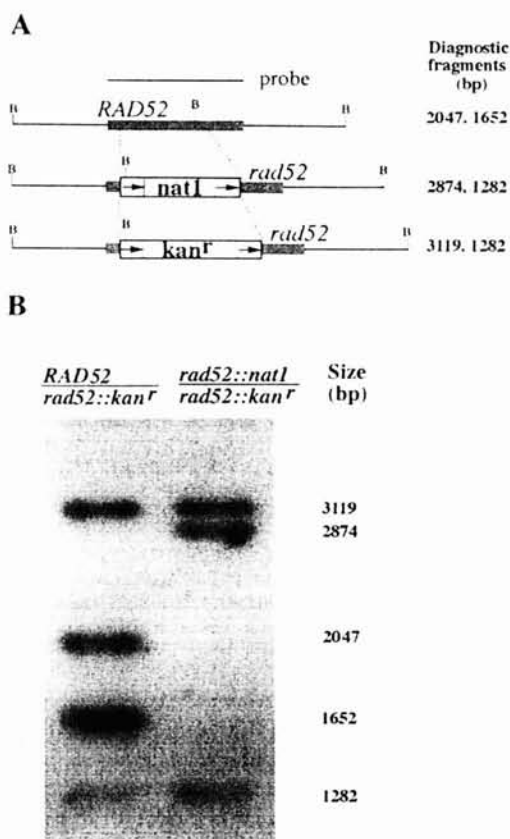


FIG. 1. Disruption of both *RAD52* alleles of DC5. (A) Diagram of the disruption. The resident *RAD52* gene is indicated as a black box at the top. *Bam*HI sites as deduced from the sequence at the *Saccharomyces* Genome Database (<http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD>) are indicated by the letter B. Disruption cassettes conferring resistance to clonNat (middle) or to Geneticin (bottom) are represented as white boxes; arrows indicate the sequences corresponding to promoter (left) and terminator (right) sequences. Predicted sizes of a *Bam*HI digestion of the strain harboring the disrupted *rad52* allele are indicated. (B) Southern blot of genomic DNA from a geneticine-resistant heterozygote (left) and a double disruptant (right), digested with *Bam*HI and probed with a *RAD52* probe (Fig. 2A, top). The original DC5 strain gave only two bands of 2,047 and 1,562 bp (not shown).

fragments failed. The second copy of the *RAD52* gene in a *RAD52*/ $\Delta rad52::kan^r strain was disrupted by replacement by a DNA fragment encompassing the *natMX4* cassette (9) flanked by 195 bp upstream and 504 bp downstream sequences from the *RAD52* gene (Fig. 1B). All double disruptants were sensitive to 0.015% methyl methanesulfonate, a typical phenotype for $\Delta rad52$ mutants (25). The data demonstrated the existence of two, and only two, copies of *RAD52* in the parental strain, a finding which is consistent with the DNA content of DC5 being close to 2C (4).$

Karyotype stability of $\Delta rad52$ strains. We compared karyotypes of clones from DC5 and from two (A1 and A4) $\Delta rad52$ clones isolated after 100 doublings in rich medium (Fig. 2). As previously described (4), a subset of highly variable chromosomal bands appeared in the upper part of the gel. These bands were identified as variants of chromosome XII by hy-

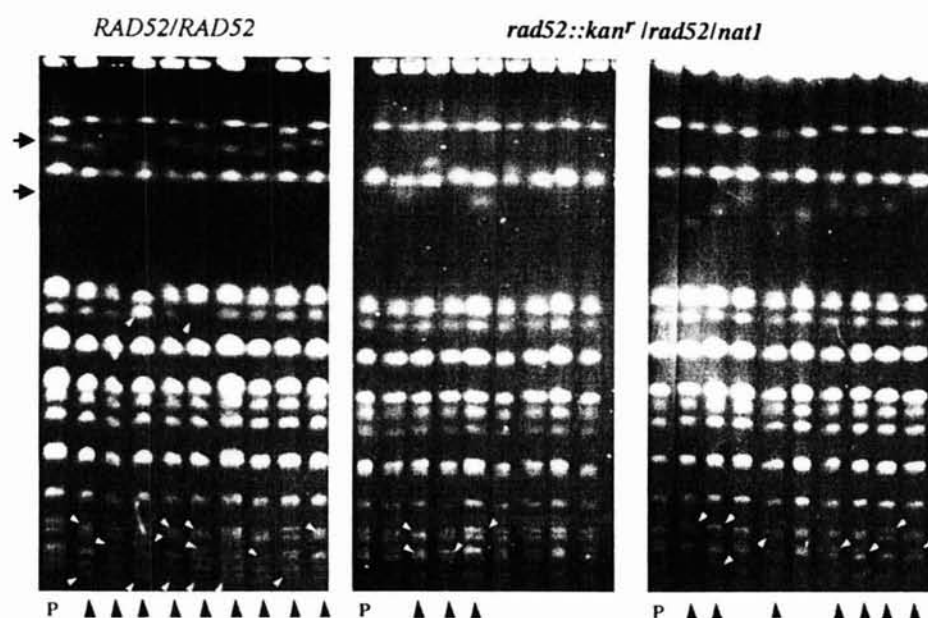


FIG. 2. Analysis of karyotype instability of DC5 and of its $\Delta rad52$ derivatives. Cultures of DC5 strain (left panel) and of two independent $\Delta rad52$ derivatives (middle and right panels) were maintained during 100 doublings in reach medium. The resulting culture was spread on a plate, and nine clones were randomly picked for karyotype analysis by pulsed-field gel electrophoresis. The figure also includes the karyotypes of the parental input strains for each culture (indicated by the letter P on the bottom). Arrows at the side of the gels indicate the region where chromosome XII hypervariable bands run. White arrowheads indicate other karyotype variations relative to the parental input strains. Black triangles at the bottom indicate clones whose karyotypes differed from that of the corresponding input strain. The lower part of the gels was digitally enhanced to better reproduce small chromosomal bands.

bridization with ribosomal DNA (rDNA) probes (4, 13). Size variants of this chromosome reflect changes in the number of rDNA repeats present in this chromosome, a phenomenon genetically unlinked to size variations in the rest of chromosomes (4, 17, 22). This particular kind of karyotype variability will not be considered for the rest of considerations that follow.

Table 1 shows rearrangement rates for several independently analyzed $\Delta rad52$ derivatives (4) (chromosome XII excluded). Their combined rearrangement rates, 6.4×10^{-3} changes per clone per generation, is significantly lower than that of the parental DC5 strain (2.1×10^{-2} , $P = 2.2 \times 10^{-3}$)

or of the combined variable monosporidic derivatives of DC5 (1.3×10^{-2} , $P = 6.4 \times 10^{-5}$) but higher than that for constant meiotic derivatives from DC5 (8.4×10^{-4} , $P = 9.1 \times 10^{-17}$ [Table 1] [4]). Independent $\Delta rad52$ derivatives showed similar rearrangement rates, ranging from 3.9×10^{-3} to 8.3×10^{-3} changes per clone per generation. The $\Delta rad52$ deletion did not suppress the chromosome XII hypervariability, a result consistent with the previous observation that chromosome XII rearrangements are genetically unrelated to size variations in the rest of the chromosomes (4).

Analysis of subtelomeric recombination in $\Delta rad52$ strains. Chromosome rearrangements that occur during vegetative growth are especially evident in the subtelomeric regions, where most changes accumulate (3, 12). We evaluated variations in the subtelomeric ends in $\Delta rad52$ strains through restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) of Y' sequences (2). DC5 clones isolated after 100 doublings have considerable polymorphism in their Y' sequences (Fig. 3, top), comparable to that of the chromosomal bands for the same clones (not shown, see Fig. 2 for comparison). In contrast, a similar experiment with $\Delta rad52$ strains showed an uniform Y' RFLP pattern (Fig. 3, bottom), even in clones that were rearranged on the basis of their karyotype (not shown). Analysis of a total of 20 independent $\Delta rad52$ clones isolated after 100 doublings showed no polymorphism in their Y' RFLP pattern, which sets an upper limit value for variability of the Y' pattern of 5×10^{-4} changes per clone per generation. We conclude that variation in the subtelomeric regions depends on *RAD52* (presumably, through ectopic recombination) but that at least

TABLE 1. Statistics of rearranged clones in $\Delta rad52$ strains

Group	No. of clones		Rearrangement rate (changes · clone ⁻¹ · generation ⁻¹)
	Total	Rearranged	
DC5	17	15	2.1×10^{-2}
$\Delta rad52$ clones			
A1	25	8	3.9×10^{-3}
A4	39	22	8.3×10^{-3}
B1	9	4	5.9×10^{-3}
B2	9	5	8.1×10^{-3}
Total	82	39	6.4×10^{-3}
Monosporidic derivatives ^a			
Constant derivatives	273	22	8.4×10^{-4}
Variable derivatives	181	132	1.3×10^{-2}

^a Carro and Piña (4).

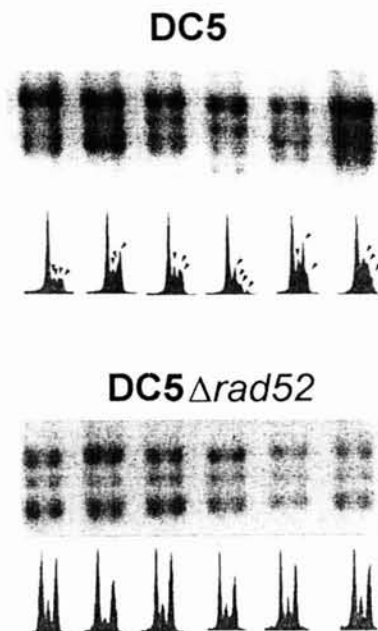


FIG. 3. Analysis of Y' sequence polymorphism in DC5 and DC5 $\Delta rad52$. Genomic DNA from six clones (originated as in Fig. 2) from DC5 (top) and from a DC5 $\Delta rad52$ strain (bottom) were digested with *Xho*I, run in a TBE agarose gel, blotted, and hybridized with a Y' probe. At the bottom of each tract there is the corresponding densitometric profile, running from left to right; small arrowheads indicate bands whose mobility changes among the different clones (only observed in the DC5 strain).

some of the chromosomal rearrangements observed originate from an alternative mechanism.

Fermentation capacity of the $\Delta rad52$ strains. Strain DC5 was isolated following selection for yeast strains for sparkling wine production, which requires an extremely high fermentation capability (13, 14). Both the original DC5 and the $\Delta rad52$ double disruptant performed the typical sparkling wine second fermentation with very similar, if not identical, kinetics (Fig. 4). Preliminary organoleptic analyses revealed no major differences between the two fermentation products (data not shown). Viable cells were recovered after the completion of the fermentation, i.e., when the pressure in the bottles reached at least 7 bar. Phenotypic analysis of 25 surviving clones from the bottles inoculated with the $\Delta rad52$ strain indicated that all 25 of them maintained both resistance markers (*nat1* and *kan'*), indicating that $\Delta rad52$ cells were responsible for the observed fermentation in the bottles.

DISCUSSION

Genetic remediation of natural and industrial yeast strains is complicated by their lack of selectable genetic markers and by their aneuploid nature. The use of dominant markers, e.g., antibiotic resistance, can overcome the first of these problems. We found that the nourseothricin resistance gene *nat1* is compatible with the commonly used *kan'* gene, making this pair of markers suitable for complete disruption of both alleles at a gene in diploid strains. Targeting the second resistance marker

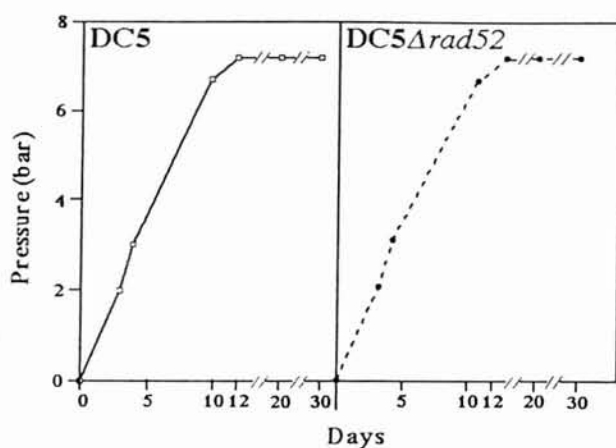


FIG. 4. Small-scale fermentation trials for DC5 and DC5 $\Delta rad52$. The graphic shows the increase in pressure in the bottle in a typical sparkling wine second fermentation. Note the completion of the fermentation (at ~7.5 bar) after only 10 days of fermentation for both strains. Data are averages of two independent clones for DC5 (left) and six independent DC5 $\Delta rad52$ clones. Standard deviations were under 5% of the mean values in both cases.

to a nondisrupted allele required extended sequence homology to both flanks of the nondisrupted allele. An easy way to obtain this extended homology is to amplify a previously disrupted allele from a heterozygotic strain by PCR. This strategy should be applicable for many protocols in which disruption of both alleles in a diploid strain is needed.

The current hypothesis to explain chromosomal rearrangements in natural and industrial strains of *Saccharomyces* relies on recombination between nonallelic homologous sequences dispersed across the yeast genome, including Y' , delta, and Ty sequences, to generate the observed results (5, 13, 18, 21). This model predicts that chromosomal rearrangements require a functional *RAD52* gene (15, 16). We found that karyotype instability during vegetative growth is only partially dependent on *RAD52*, since chromosomal rearrangement rates in $\Delta rad52$ strains were significantly lower than that of its parental strain DC5 but still at least five times higher than the rates associated with stable strains. In contrast, recombination at subtelomeric regions was dependent on *RAD52*, indicating that they probably occur through homologous recombination between nonhomologous loci. Recombination at subtelomeric sequences may play a role in the generation of chromosomal polymorphisms, both in mitosis and in meiosis (2, 5, 12), but our results suggest that this mechanism is not responsible for much of the karyotype variation observed. We hypothesize that at least two additional chromosomal rearrangement mechanisms can result in nonhomologous, *RAD52*-independent recombination processes. One of these mechanisms would account for at least a third of the observed changes in chromosome sizes during vegetative growth. The second one is involved in rDNA rearrangements, which occur genetically independent from rearrangements of the rest of the genome (4, 24).

The long-term objective of our research is to demonstrate the feasibility of genetic remediation for reducing chromosomal instability of natural strains without compromising their

industrial performance. For historical reasons, we were particularly interested in yeast strains that can perform the so-called second fermentation of sparkling wine, which involves a re-fermentation of a base wine in the typical sparkling wine bottles (13, 14). This process requires a very efficient fermentation by the yeast due to the stringent conditions under which it proceeds, including a low pH (2.9 to 3.1), an ethanol concentration of >10%, low levels of nutrients, the presence of SO₂, a moderate temperature (15 to 20°C), and an increase in CO₂ pressure up to 7.5 bar (1). That the $\Delta rad52$ strains perform similarly to the parental strain in fermentation trials suggests that this approach is feasible for this type of yeast strain and that similar strategies of genetic remediation in other industrial yeast-based fermentations need to be considered.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Education and Science (PB98-0469, BMC2001-0246, GEN2001-4707-C8-08, and AGL2000-0133-P4-03) with additional support from the Generalitat de Catalunya (SGQ97-062 and SGR99-189) and from the Alexander von Humboldt Stiftung (Germany) to B.P. D.C. is a recipient of a predoctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya. This work was carried out within the framework of the "Centre de Referència en Biotecnologia" of the Generalitat de Catalunya.

REFERENCES

- Bartra, E. 1995. Microbiological aspects of sparkling wine processing. *Microbiol. SEM* 11:43-50.
- Bidenne, C., B. Blondin, S. Dequin, and F. Vezinhet. 1992. Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 22:1-7.
- Carro, D., J. García-Martínez, J. Pérez-Ortín, and B. Piña. 2003. Structural characterization of chromosome I size variants from a natural yeast strains. *Yeast* 20:171-183.
- Carro, D., and B. Piña. 2001. Genetic analysis of the karyotype instability in natural wine yeast strains. *Yeast* 18:1457-1470.
- Codon, A. C., T. Benítez, and M. Korhola. 1997. Chromosomal reorganization during meiosis of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Curr. Genet.* 32:247-259.
- European Community Commission. 1990. Official European Community wine analysis procedure. Reg. CEE no. 2676/90. European Community Commission, Brussels, Belgium.
- Gerring, S., C. Connelly, and P. Hieter. 1991. Positional mapping of genes by chromosome blotting and chromosome fragmentation. *Methods Enzymol.* 194:55-57.
- Gietz, D., A. St. Jean, R. Woods, and R. Schiestl. 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 25:1425.
- Goldstein, A., and J. McCusker. 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15:1541-1553.
- Longo, E., and F. Vezinhet. 1993. Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:322-326.
- Louis, E., and R. Borts. 1995. A complete set of marked telomeres in *Saccharomyces cerevisiae* for physical mapping and cloning. *Genetics* 139:125-136.
- Louis, E., E. Naumova, A. Lee, G. Naumov, and J. Haber. 1994. The chromosome end in yeast: its mosaic nature and influence on recombinational dynamics. *Genetics* 136:789-802.
- Nadal, D., D. Carro, J. B. Fernández-Larrea, and B. Piña. 1999. Analysis and dynamics of the chromosomal complements of wild sparkling-wine yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1688-1695.
- Nadal, D., B. Colomer, and B. Piña. 1996. Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1944-1950.
- Paques, F., and J. E. Haber. 1999. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:349-404.
- Petes, T., R. Malone, and L. Symington. 1991. Recombination in yeast. p. 407-521. In J. Broach, J. Pringle, and E. Jones (ed.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Petes, T. D. 1980. Unequal meiotic recombination within tandem arrays of yeast ribosomal DNA genes. *Cell* 19:765-774.
- Puig, S., A. Querol, E. Barrio, and J. E. Pérez-Ortín. 2000. Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2057-2061.
- Puig, S., D. Ramón, and J. Pérez-Ortín. 1998. Optimized method to obtain stable food-safe recombinant yeast strains. *J. Agric. Food Chem.* 46:1689-1693.
- Querol, A., E. Barrio, T. Huerta, and D. Ramón. 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2948-2953.
- Rachidi, N., P. Barre, and B. Blondin. 1999. Multiple Ty-mediated chromosomal translocation lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 261:841-850.
- Rustchenko-Bulgac, E. P., and F. Sherman. 1994. Physical constitution of ribosomal genes in common strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10:1157-1171.
- Wach, A., A. Brachar, R. Pohlmann, and P. Philippson. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10:1793-1808.
- Warner, J. R. 1989. Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 53:256-271.
- Xiao, W., B. Chow, and L. Rathgeber. 1996. The repair of DNA methylation damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 30:461-468.

The mobility of the tobacco Tnt1 retrotransposon correlates with its transcriptional activation by fungal factors

Delphine Melayah¹, Eric Bonnard², Boulos Chalhoub³, Colette Audeon and Marie-Angèle Grandbastien*

Laboratoire de Biologie Cellulaire, INRA, 78026 Versailles, France

Received 6 April 2001; revised 9 July 2001; accepted 17 July 2001.

*Correspondence (fax +33 (1) 30 83 30 99; e-mail gbastien@versailles.inra.fr).

¹Present address: Université Claude Bernard LYON 1, UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Symbiose Mycorhizienne, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

²Laboratoire de Dynamique du Génome et Evolution, Institut Jacques Monod, 2 place Jussieu – 75252 Paris cedex 05, and

³Unité de Recherches en Génétique Végétale, INRA, 2 rue Gaston Crémieux, CP 5708, 91057 Evry cedex, France

Summary

We have analyzed the stress-induced amplification of the tobacco Tnt1 element, one of the rare active plant retrotransposons. Tnt1 mobility was monitored using the retrotransposon-anchored SSAP strategy that allows the screening of multiple insertion sites of high copy number elements. We have screened for Tnt1 insertion polymorphisms in plants regenerated from mesophyll leaf cells, either via explant culture or via protoplast isolation. The second procedure includes an overnight exposure to fungal extracts known to induce high levels of Tnt1 transcription. Newly transposed Tnt1 copies were detected in nearly 25% of the plants regenerated via protoplast isolation, and in less than 3% of the plants derived from explant culture. These results show that Tnt1 transcription is followed by transposition, and that fungal extracts efficiently activate Tnt1 mobility. Transcription appears to be the key step to controlling Tnt1 amplification, as newly transposed Tnt1 copies show high sequence similarities to the subpopulations of transcribed Tnt1 elements. Our results provide direct evidence that factors of microbial origin are able to induce retrotransposon amplification in plants, and strengthen the hypothesis that stress modulation of transposable elements might play a role in generating host genetic plasticity in response to environmental stresses.

Keywords: fungal factor, protoplast, retrotransposon, stress, Tnt1, tobacco.

Introduction

Stress and environmental challenges are known to trigger surprisingly similar defensive mechanisms in different eukaryotic organisms (Taylor, 1998). In particular, recent evidence suggests the possible generation of genetic plasticity in response to stress through the mobilization of retrotransposons, the most widespread eukaryotic mobile elements. Stress and external challenges, including microbial attacks, are known to be major factors activating retrotransposon expression in a wide range of organisms such as yeast (Bradshaw and McEntee, 1989; Rofte *et al.*, 1986), drosophila (Strand and McDonald, 1985), mammals (Liu *et al.*, 1995) and plants (Grandbastien, 1998; Wessler, 1996). So far, the biological significance of the stress modulation of retrotransposons remains unclear. However, it is in agreement with McClintock's original model that postulates that transposable elements are

involved in genome restructuring in response to environmental challenges (McClintock, 1984). A recent study indeed suggests that retrotransposon amplification has been involved in barley adaptive evolution to drought conditions (Kalendar *et al.*, 2000). An alternative, but not exclusive, hypothesis is that activation by microbial challenges might also favor horizontal transmission and allow elements to colonize new hosts. A parallel can be noted between this hypothesis and the recent proposition that stress activation of retroviral replication corresponds to an escape mechanism for the virus from damaged or stressed host cells (Andrews *et al.*, 1998).

Any debate on the putative biological impact of retrotransposon activation implies that stress induces not only expression but also subsequent transposition. However, except for yeast, direct evidence of retrotransposition in

response to stress is scarce and often controversial. This situation partly results from the difficulty in establishing experimental systems to demonstrate mobility in multicellular organisms (Arnault and Dufournel, 1994). Additionally, post-transcriptional inhibition mechanisms are often used by hosts to control potentially deleterious retrotranspositions (Curcio and Garfinkel, 1999; Menees and Sandmeyer, 1996). In particular, there is little evidence for retrotransposon mobilization by stress in plants, where experimental tests for retrotransposition are particularly difficult due to the high copy number of most plant retrotransposons. Examples of transposon insertions were reported in progenies of virus-infected maize plants (Dellaporta *et al.*, 1984; Johns *et al.*, 1985). However, a causal relationship between virus infection and transposition still remains to be established in these cases. So far, a link between transcription and retrotransposition has been demonstrated for a few low copy number elements, in response to *in vitro* tissue culture (Hirochika *et al.*, 1996; Hirochika, 1993).

The Tnt1 element of tobacco (*Nicotiana tabacum*) is one of the best characterized plant retrotransposons (Grandbastien *et al.*, 1989b). Tnt1 is not expressed in healthy tobacco tissues, except in roots (Pouteau *et al.*, 1991). Tnt1 expression is strongly induced by stresses such as pathogen attacks and factors of microbial origin, and a tight correlation has been shown between Tnt1 transcription and plant defense responses (Grandbastien *et al.*, 1997; Mhiri *et al.*, 1997; Mhiri *et al.*, 1999; Moreau-Mhiri *et al.*, 1996; Pouteau *et al.*, 1994). In contrast to many other elements, Tnt1 transcription is poorly activated by tissue culture, at least in tobacco (Grandbastien *et al.*, 1997; Hirochika, 1993; Pauls *et al.*, 1994). However, Tnt1 is highly expressed in freshly isolated tobacco protoplasts (Pouteau *et al.*, 1991). A detailed study of the different factors involved in protoplast isolation has shown that wounding, plasmolysis or hormone addition have little effect on Tnt1 transcription, and that Tnt1 expression in protoplasts is a direct response to the Onozuka solution, one of the three components of the cocktail of fungal extracts used to digest cell walls (Pouteau *et al.*, 1991). Onozuka is a crude extract prepared from the fungus *Trichoderma viride* and contains proteinaceous elicitors that activate defense responses in tobacco, leading to necrotic hypersensitive cell death (Bailey *et al.*, 1990; Lotan and Fluhr, 1990; Yano *et al.*, 1998). Tnt1 expression is detected soon after application (Grandbastien *et al.*, 1997), and Onozuka also activates Tnt1 expression when applied to intact tobacco tissues (Pouteau *et al.*, 1994), indicating that Tnt1 is activated in direct response to elicitors contained in the Onozuka solution. The effect of the fungal extracts is transient, as Tnt1 transcript levels rapidly decrease after their removal, in the early stages of subsequent cell culture (Grandbastien *et al.*, 1997).

Tnt1 is mobile and was originally isolated after transposition into a target gene. However, in spite of a good knowledge of the conditions and mechanisms activating Tnt1 expression, no evidence was yet reported that Tnt1 transcriptional activation is correlated to subsequent Tnt1 mobility. The low level of Tnt1 expression in response to tissue culture stimuli or plasmolysis has allowed us to develop an experimental strategy aimed at testing for the effect of fungal extracts on Tnt1 mobility. We have monitored Tnt1 transposition in tobacco plants regenerated from mesophyll leaf cells, either via protoplast isolation, or as controls, via leaf explant culture. In both procedures, regenerated plants originate from cells that have been submitted to stress stimuli linked to successive steps of wounding, cell dedifferentiation, callus formation and shoot regeneration. The major difference between the two procedures consists of an early step of plasmolysis that does not induce detectable Tnt1 expression, associated with overnight exposure to fungal extracts, including the Onozuka solution known to induce very high levels of Tnt1 expression. The comparison of Tnt1 transposition between each of these two procedures is thus expected to provide an accurate estimate of the effect of the fungal extracts on Tnt1 mobility.

Since Tnt1 copy number has been estimated at several hundred copies (Grandbastien *et al.*, 1989b), we used a high resolution retrotransposon-anchored PCR strategy allowing the simultaneous detection of multiple insertion sites of high copy number elements, described as the Sequence-Specific Amplification Polymorphisms (SSAP) technique (Ellis *et al.*, 1998; Gribbon *et al.*, 1999; Waugh *et al.*, 1997) or as Transposon Display (Casa *et al.*, 2000; Van den Broek *et al.*, 1998). Newly transposed copies have been screened through the appearance of new polymorphic bands in SSAP profiles of regenerated plants. We have also characterized these new SSAP polymorphic bands, in order to analyze the sequences of the population of newly transposed Tnt1 elements and to compare them with the sequences of the population of elements known to be transcribed in the same stress conditions (Casacuberta *et al.*, 1995).

Results

Tnt1 insertion polymorphisms in regenerated plants

The SSAP procedure outlined in Figure 1 was developed to analyze Tnt1 insertion polymorphism in regenerated tobacco plants. Since most Tnt1 elements do not contain EcoRI restriction sites (Grandbastien *et al.*, 1991), EcoRI digestions were performed to avoid internal amplifications from the 3'LTR. A primer pair consisting of an EcoRI primer (E00) and a Tnt1-specific primer (LTR13) was used for SSAP amplifications. The Tnt1-specific primer, LTR13, was

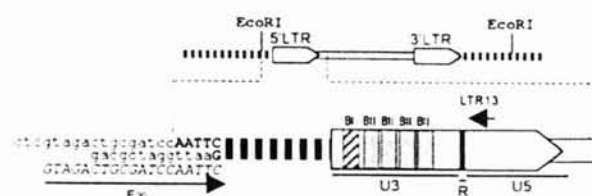


Figure 1. Schematic representation of the SSAP strategy used to analyze Tnt1 insertion polymorphism.

Top: Tnt1 general structure; bottom: enlargement of the region containing the SSAP-amplified sequence. Boxes represent Tnt1 sequence and thick dotted lines represent flanking genomic DNA. The three functional domains (U3-R-U5) of the LTR are indicated. The BI and BII regulatory motifs present in the U3 domain of Tnt1A elements are indicated by striped and shaded boxes, respectively. The sequences of the EcoRI adaptors (lower case letters) and of the E00 primer (capital italics) are indicated, together with the remaining nucleotides resulting from the EcoRI digestion (capital bolds). The positions and orientations of the SSAP primers E00 and LTR13 are indicated by arrows.

designed in the highly conserved U5 region, 250 pb downstream of the 5' end of the element, and oriented towards the 5' end. The E00/LTR13 primer combination thus allows amplification of variable amounts of 5' flanking genomic DNA, together with a 5'LTR portion that includes the U3 region, previously shown to be highly variable in Tnt1 populations (Casacuberta *et al.*, 1995; Vernhettes *et al.*, 1998). Control SSAP experiments were performed on six tobacco genotypes (Figure 2a). In our experimental conditions, about 80 bands per SSAP profile were observed. These profiles are similar for all genotypes, except for the PBD6 line, which shows a low number of polymorphic bands. These results indicate that the tobacco lines used in this study are closely related. In addition, no SSAP polymorphism was found in different plants of the D8, tl and PBD6 lines and in different leaves of D8 plants, thus indicating no detectable interplant or intraplant variability (data not shown).

Following protoplast isolation or direct explant culture, 20–30 plants were regenerated per genotype, leading to totals of 156 plants and 147 plants, respectively. Tnt1 insertion polymorphism was examined in all the regenerated plants using the SSAP procedure. After protoplast isolation, new SSAP bands were detected in 11.8% to 42.9% of the regenerated plants, depending on the genotype (Table 1). SSAP profiles obtained for a few representative plants are illustrated in Figure 2b. χ^2 tests of homogeneity show that intergenotype differences are not statistically significant ($\chi^2_{df=5} = 6.37$, $P = 0.27$). The presence of the *tl* somatic instability, known to increase the level of spontaneous mutations (Grandbastien *et al.*, 1989a), does not lead to a significant increase in new SSAP bands. Altogether, an average of 24.4% of all plants regenerated via protoplast isolation contain new SSAP bands. In contrast, after direct explant culture, new SSAP

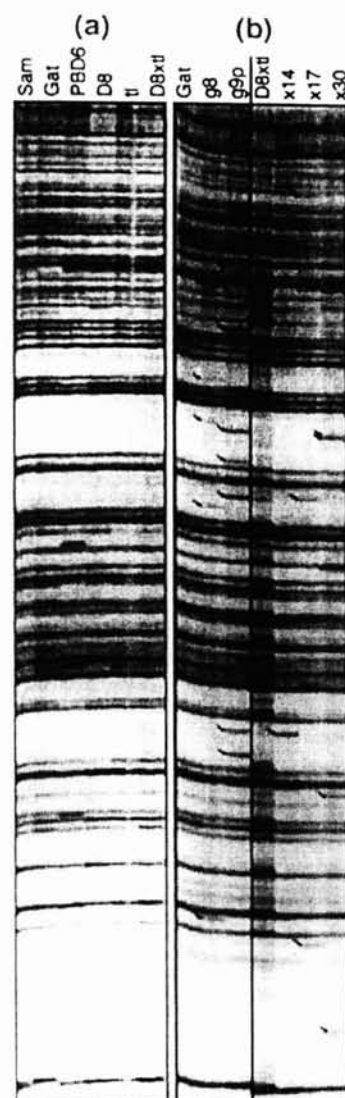


Figure 2. SSAP profiles obtained with the E00/LTR13 primer combination for the six tobacco genotypes analyzed in this study (a), and for independent regenerants obtained after protoplast isolation (b). g8 and g9p are regenerants obtained from the Gat genotype and x14, x17 and x30 are regenerants obtained from the D8xtl hybrid genotype. Arrows indicate new SSAP bands.

bands were detected in a much lower percentage of the regenerated plants, ranging from 0% to 6.6% (Table 1). The Fisher's exact test demonstrates that intergenotype differences are not statistically significant either ($P = 0.41$). An average of 2.7% of all plants regenerated via explant culture contain new SSAP bands. Altogether, a significant difference ($\chi^2_{df=1} = 29.68$, $P < 0.001$) is found between plants regenerated via protoplast isolation or via explant culture, indicating a 9-fold increase in the appearance of new SSAP bands in response to the protoplast isolation

Table 1. Tnt1 insertion polymorphisms in regenerated tobacco plants

Genotype	Plants regenerated from leaf protoplasts						Plants regenerated from leaf explants					
	Number of tested plants	Plants with new bands		New bands per profile		Transposed copies ¹	Number of tested plants	Plants with new bands		New bands per profile		Transposed copies ¹
		number	%	number	mean			number	%	number	mean	
Gat	21	9	42.9%	1-7	2.55	11/12	20	0	0%	0	0	0/0
D8	33	7	21.2%	1-4	2.43	3/5	30	0	0%	0	0	0/0
tl	29	6	20.7%	1-5	3.5	3/3	27	1	3.7%	3	3	1/1
D8 × tl	29	6	20.7%	1-5	2.67	9/9	16	1	6.2%	1	1	nt
Sam	27	8	29.6%	1-3	1.75	8/8	24	0	0%	0	0	0/0
PBD6	17	2	11.8%	1	1	1/1	30	2	6.6%	1	1	2/2
Total	156	38	24.4%		2.45	35/38	147	4	2.7%		1.5	3/3

¹confirmed transpositions/number of tested bands; nt = non-tested

procedure. The number of new SSAP bands revealed on E00/LTR13 profiles varied from one to seven per plant (Table 1), with a mean number of bands of 2.45 and 1.5 for plants regenerated via protoplast isolation or explant culture, respectively. Due to the low number of explant-derived plants containing new SSAP bands, it is not possible to determine if the numbers of new SSAP bands per plant statistically differ between the two populations of regenerated plants.

Thirty-eight new SSAP bands isolated from 22 plants regenerated via protoplast culture, and three new SSAP bands isolated from three plants regenerated via explant culture, were sequenced after re-amplification from the gel. The transpositional nature of each new SSAP band was tested by direct PCR performed using the LTR13 primer and primers designed in each flanking genomic sequence. Thirty-eight out of 41 new SSAP bands were confirmed to correspond to transposition events (Table 1). The remaining three bands, obtained from three different protoplast-derived regenerants, could not be identified as transposed copies. In these three cases, however, no consensus sequence was obtained from the few clones recovered from the cloning step (see Experimental procedures), suggesting that the failure to identify the transposed copy represents the background of technical problems inherent in our cloning strategy. Taken together, our results demonstrate that the vast majority (93%), and possibly all, of the new SSAP bands detected in regenerated plants correspond to newly inserted Tnt1 copies.

Sequence variability of the populations of transposed Tnt1 elements

The tobacco Tnt1 family is composed of an heterogeneous population of elements that can be grouped in subfamilies characterized by different U3 regions (Vernhettes *et al.*, 1998). We have previously shown that only the Tnt1A

subfamily, characterized by the BI and BII regulatory sequences involved in Tnt1 stress-activation (Casacuberta and Grandbastien, 1993; Vernhettes *et al.*, 1997), is expressed in protoplasts (Casacuberta *et al.*, 1995). Furthermore, protoplast-specific transcripts are not a unique sequence, but a population of different, albeit very closely related, RNAs (Casacuberta *et al.*, 1995). Since the first half part of the 5'LTR is amplified by the E00/LTR13 primer pair (Figure 1), it is possible to compare the U3 regions of the Tnt1 copies that have transposed in protoplast-derived plants with the U3 regions of previously characterized Tnt1 protoplast-specific transcripts. The unexpected characterization of preexisting insertions (see Experimental procedures) also allowed the comparison of newly transposed Tnt1 copies with ancient copies that inserted earlier during tobacco evolution.

All the newly transposed copies analyzed belong to the Tnt1A1 group (Figure 3a). Furthermore, a striking correlation was found between the U3 sequences of transcribed and transposed copies. We have previously shown that two major U3 subpopulations could be defined in the protoplast-specific transcript population, the P23 and the P1 RNAs, each representing 24% of the population, and both containing four BII regulatory repeats (Casacuberta *et al.*, 1995). The P1 and P23 RNAs differ in the U3 region by four signature nucleotide changes only (G, A, A, T) (Figure 3a) and the U3 regions of the remaining RNAs differ from P1 and P23 by one or two single nucleotide changes only, as well as by the sporadic deletion of a complete BII repeat, that may be considered as a single mutational event generated during the reverse transcription process (Casacuberta *et al.*, 1995). Our results show that most of the newly transposed copies can also be grouped in P1-type (four copies) and P23-type (24 copies) sequences. Furthermore, 10 (30%) of the newly transposed Tnt1 copies are identical to the P23 sequence. A third subpopulation of newly transposed copies is closely

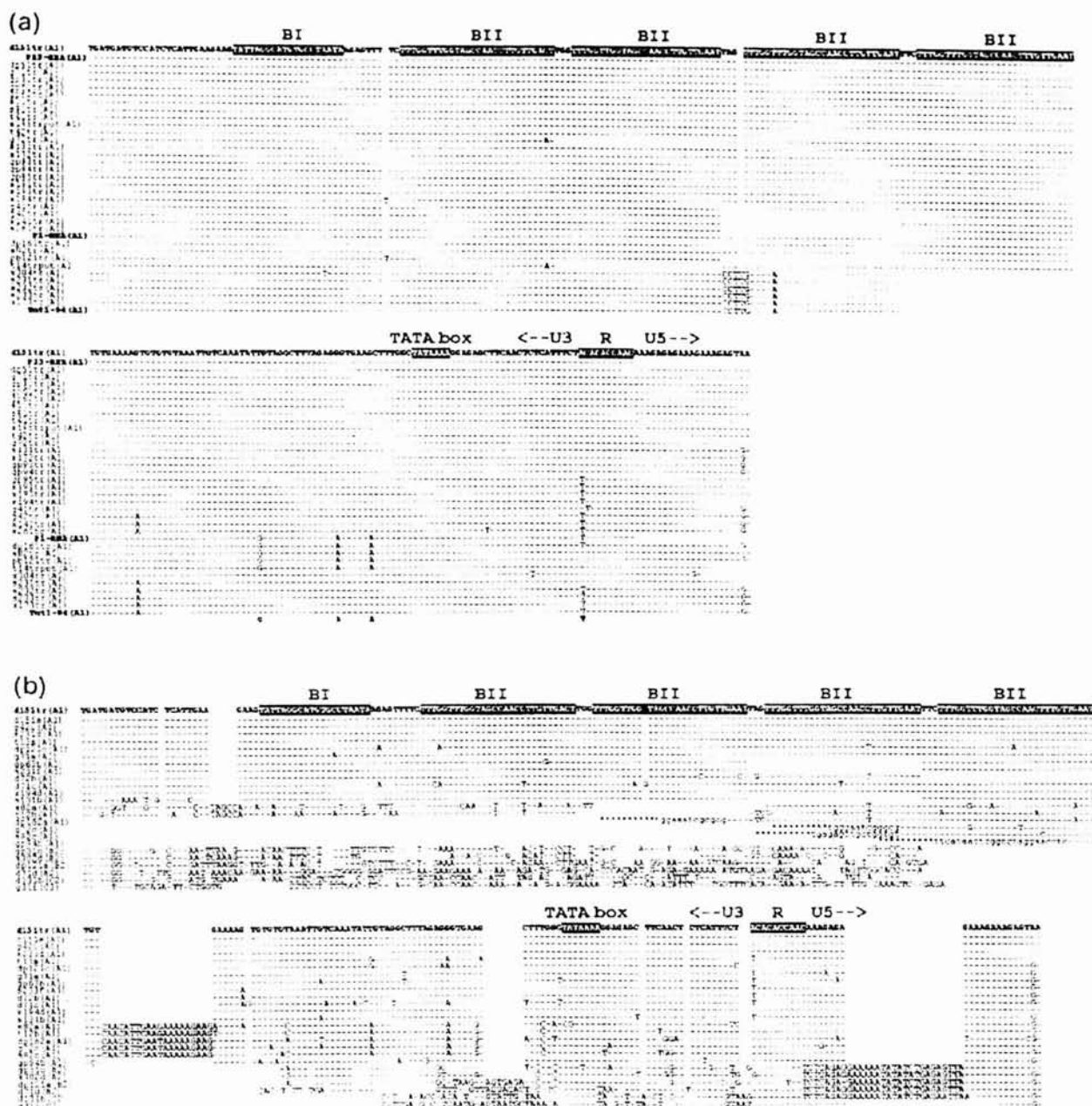


Figure 3. Sequence variability of the partial LTR sequences of newly transposed Tnt1 copies characterized in protoplast-derived plants (a) and of preexisting Tnt1 insertions (b).

Sequences have been aligned on the d161tr transposed copy, chosen as a reference because of its identity to the major P23 Tnt1 RNA species. Sequences of the P23 and P1 Tnt1 RNA species as well as of the Tnt1-94 mobile copy are included (the P23 and P1 RNA sequences terminate at the end of the R region). Dashes and blanks indicate sequence identity and deletions, respectively. Nucleotides that differ from the reference sequence are shown in capital letters. Lower case letters and stars indicate that the 5' end of the LTR could not be determined, since no homology to previously characterized Tnt1 LTRs could be detected upstream from the sequences shown by dashes. Blanks have been introduced in the reference sequence to allow for nucleotide insertions. Black boxes indicate important features of the Tnt1A LTR (BI and BII boxes, TATA box, R region). The subfamily and group of each sequence, as defined in Vernhettes *et al.* (1998) are indicated in brackets.

related to the Tnt1-94 element originally isolated after insertion into the nitrate reductase encoding gene and characterized by an atypical third BII repeat (Grandbastien

et al., 1989b) (Figure 3a, six lower lines). Interestingly, transcripts of this type were never characterized in protoplasts. Finally, it is noticeable that Tnt1 copies

newly transposed in the same regenerant belong usually, but not exclusively (e.g. s81tr and s82tr), to the same subpopulation type.

These data indicate that there is a good correlation, at the level of the regulatory U3 region, between the Tnt1 transcripts generated by protoplast isolation and the Tnt1 copies that have successfully completed the retrotransposition cycle. However, a significant difference between transcribed and transposed copies is found with respect to the number of BII repeats. We have previously shown that 90 percent of transcribed elements contain 4 BII repeats, indicating that BII sequences were essential for Tnt1 activation in protoplasts (Casacuberta *et al.*, 1995). Surprisingly, a significantly lower proportion of newly transposed copies containing four BII repeats (64%) has been observed in this work ($\chi^2_{df1} = 8.48$, $P < 0.001$). In addition, one of the newly transposed copies, t42tr, contains only two BII repeats, although transcripts containing fewer than three BII repeats have never been characterized (Casacuberta *et al.*, 1995).

In contrast to newly transposed Tnt1 copies, the regulatory regions of pre-existing Tnt1 insertions are much more heterogeneous (Figure 3b). While most of them (75%) belong to the Tnt1A1 group, only four of them belong to the P23-type and one of them to the P1-type. All the remaining pre-existing Tnt1A1 copies contain more than four bp changes. Only six (33%) of them contain four BII repeats, and several others display larger-scale modifications such as insertions or apparent 5' truncations (dp162a, g72c, s82c and gp94b). The remaining ancient Tnt1 insertions belong either to the Tnt1B (17%) or to the Tnt1C (8%) subfamilies.

Discussion

Microbial factors activate retrotransposon amplification

Using the SSAP strategy, we have monitored the amplification of one of the few plant retrotransposons known to be active, the tobacco Tnt1 element. Here we report that the protoplast isolation procedure activates Tnt1 transposition efficiently in tobacco, since a nine-fold increase in Tnt1 mobility is observed in plants regenerated via protoplast isolation, compared with the Tnt1 mobility observed in control plants regenerated via explant culture. Since transcription is a prerequisite for the transposition of retroelements, this sharp increase in Tnt1 mobility results necessarily from one or several protoplast-specific factors able to strongly activate Tnt1 expression. Previous studies have shown that the major factor activating Tnt1 expression during the protoplast isolation procedure is the initial overnight application of Onozuka fungal extracts (Pouteau *et al.*, 1991). The subsequent early steps of protoplast-derived cell culture are expected to have very little impact

on Tnt1 transposition, since Tnt1 transcript levels decrease strongly in the few hours following removal of the fungal extracts (Grandbastien *et al.*, 1997), and no Tnt1 transcript could be detected by Northern analysis in tobacco cell cultures (Hirochika, 1993). Furthermore, Tnt1 is not expressed in tobacco calli (Pauls *et al.*, 1994). As other factors involved in the production of the regenerated plants were also involved in the generation of the control plants from leaf explants, it can therefore be assumed that the nine-fold increase in Tnt1 mobility observed in plants regenerated from leaf protoplasts is specifically attributable to the effect of the cell wall hydrolyzing fungal extracts, most essentially the Onozuka solution. Our results therefore show that Tnt1 mobility correlates to its transcriptional activation by factors of microbial origin.

New insertions were detected in nearly 3% of the control plants regenerated from leaf explants. This demonstrates that stimuli other than microbial factors are also able to activate Tnt1 mobility. This background mobility could result from the original wounding step, since previous studies showed that, although no transcript could be detected by Northern analysis in shredded tobacco leaf tissues (Pouteau *et al.*, 1991), a low level of expression was detected in mechanically wounded tobacco leaves through the use of a reporter gene placed under control of the Tnt1 LTR (Mhiri *et al.*, 1997). Alternatively, background transpositions could result from a low level of activation during tissue culture. Although no Tnt1 transcript could be detected by Northern analysis, a small increase in Tnt1 copy number was indeed observed in established cell cultures (Hirochika, 1993). It is noticeable that new SSAP bands were usually detected in a reproducible manner in an SSAP experiment performed with DNA isolated from duplicate cuttings of the regenerated plantlets (data not shown). This suggests that the regenerated plants are probably not chimaeric for the new insertions, and that the transpositions that we detected have occurred very early in the regeneration process. They might therefore originate from the original wounding step rather than from the successive rounds of transposition expected from a response to tissue-culture stimuli. Finally, we cannot exclude the possibility that background transpositions could have a somatic origin in the leaves used for explant and protoplast isolation, due to a possible low background of Tnt1 expression in mature leaves. No interplant or intraplant polymorphisms were detected in our control analyzes, but somatic transpositions occurring in a few leaf cells would not be detectable by the SSAP procedure.

Interestingly, microbial-induced transposition levels measured in this work are strikingly high, since transpositions specifically induced in protoplasts have occurred in over one protoplast out of five. Due to competitive PCR amplification, the E00 primer, which contains no additional selective nucleotide in 3', reveals only a fraction (80) of all

tobacco Tnt1 insertions. The total number of Tnt1 insertions in tobacco was indeed estimated to be more than 500 through SSAP analyzes using EcoRI primers containing two additional selective nucleotides (unpublished data). It is therefore likely that the total number of newly transposed Tnt1 copies that we observed in each plant on E00/LTR13 profiles is also underestimated. The high level of Tnt1 transposition observed in our *in vitro* experimental strategy opens the perspective to assess efficiently the genetic impact of stresses such as microbial attacks or generalized abiotic stresses applied on whole plants, since the plant germline is not sequestered early and somatic transpositions can be transmitted to the progeny in plants. Although the functional consequences of the new Tnt1 insertions remain to be established, insertions of transposable elements are thought to be a major source of genetic diversity, by generating direct gene mutation or genome structural rearrangements (Kidwell and Lisch, 2000). Our work represents the first direct demonstration that factors of microbial origin, known to activate plant defense responses, are also able to generate plant genomic diversity through retrotransposition amplification. Our results therefore strengthen the hypothesis that stress modulation of transposable elements might play a role in generating host genetic plasticity in response to environmental stresses (McClintock, 1984). Interestingly, *T. viride* does not invade tobacco tissues, but merely activates tobacco defense responses and hypersensitive cell death. A successful pathogen infection is thus not a prerequisite for Tnt1 amplification, and mobilization might also result from incompatible or non-host plant-microbe interactions, provided that tobacco defense responses are activated. Since such 'unsuccessful' microbial challenges are quite frequent in natural conditions, and since resistant or non-host plants are much more likely to produce progenies than heavily infected plants, the evolutionary impact of retrotransposon activation by microbial challenges might be quite significant.

Transcription is a key step controlling Tnt1 amplification in response to pathogen factors

Previous studies have shown that the population of tobacco Tnt1 transcripts displays a structure similar to the populations of closely related but different viral genomes referred to as 'quasi-species', and that the LTR U3 region is important for expression in protoplasts (Casacuberta *et al.*, 1995). We show here a striking similarity between the U3 sequences of Tnt1 elements transcribed in protoplasts and the U3 sequences of Tnt1 copies that have subsequently completed their retrotransposition cycle and inserted into the tobacco genome. Interestingly, the sharp contrast between the populations of newly transposed copies and the more variable pre-existing

insertions allows us to determine with little error, by visual analysis of U3 regions, whether a given Tnt1 element has been recently active or is an ancient insertion. The effect of fungal extracts on Tnt1 expression is transient, since their removal after the overnight treatment is rapidly followed by a sharp decrease in Tnt1 transcript levels (Grandbastien *et al.*, 1997). This indicates that induced transpositions have mostly occurred during, or shortly after, the application of the fungal extracts, at the single cell level. It can thus be assumed that transpositions in each cell have occurred in a single transposition burst. Interestingly, new Tnt1 copies detected in the same regenerant can belong to different subpopulations, indicating that different master copies can be simultaneously active within the same cell.

Since the population of transposed copies is expected to reflect template RNAs that succeed in completing the downstream steps of the retrotransposition process, the tight correlation between transcribed and transposed pools suggests that there is very little or no template selection for Tnt1 reverse transcription. Transcription appears therefore to be a key step controlling Tnt1 retrotransposition, and no specific post-transcriptional control, for instance at the reverse transcription or the integration steps, seems to further select for particular Tnt1 types, at least in pathogen-related activating conditions. It is, however, interesting to note that newly transposed copies contain a significantly lower number of BII repeats, compared with RNA templates. Deletion of repeated sequences frequently occur during retroviral replication and retrotransposition (Pathak and Temin, 1990; Xu and Boeke, 1987). We have previously suggested that BII deletions during reverse-transcription could be involved in the control of active Tnt1 populations (Casacuberta *et al.*, 1995). The significant decrease in the proportion of 4-BII elements that we observe after completion of the reverse transcription cycle strengthens this hypothesis. Interestingly, an unexpected 2-BII transposed copy appears as a possible single direct deletion derivative of two adjacent BII. However, since we also observed in this work the frequent transposition of Tnt1-94-type copies, poorly represented at the transcriptional level (Casacuberta *et al.*, 1995), we cannot exclude the possibility that 3-BII elements are in fact more efficiently reverse transcribed than 4-BII elements.

SSAP is a very efficient tool for monitoring retrotransposon behavior and genomic impact

Most plant retrotransposons are present in high copy number in the genome, and information on their activity is mostly available through transcript analyzes (Grandbastien, 1998). To date, direct retrotransposition has only been monitored by characterization of insertional

mutants (Grandbastien *et al.*, 1989b; Varagona *et al.*, 1992; White *et al.*, 1994), or for low copy number elements (Hirochika *et al.*, 1996; Hirochika, 1993). We show here that the SSAP strategy is an efficient tool to detect and quantify the mobility of high copy number elements. SSAP provides an interesting alternative to reverse transcription tests based on intron splicing from indicator genes (Heidmann and Heidmann, 1991), since complete retrotransposition events, up to the insertion step, are directly detected. Consequently, results can be directly interpreted in terms of genomic impact. In addition, SSAP provides a tool for isolation of new mobile retrotransposon copies when only partial LTR data are available, since it allows the detection of transposed copies without any need for insertional mutants for a known target gene. Finally, SSAP performed with carefully designed primers allows a direct and easy access to LTR sequences, the most variable region of retroviruses and retrotransposons. In addition to polymorphism studies and retrotransposition assays, SSAP can therefore be used to correlate the activity and the population evolution of retrotransposons and endogenous retroviruses, and to study more efficiently their behavior and impact on host genomes.

Experimental procedures

Plant material

Six tobacco genotypes were used: (1) *N. tabacum* cv Xanthi: the XHFD8 line ('D8'), a homozygous diploid line obtained from an anther culture-derived haploid line (Bourgin and Missonier, 1973); the *tl*-1086 line ('tl'), carrying the somatically unstable *tl* mutation (Deshayes, 1979). The *tl* mutation, originally obtained on *N. tabacum* cv Samsun (Dulieu, unpublished), was transferred to *N. tabacum* cv Xanthi by successive backcrosses (Deshayes, 1976). The F1 hybrid between the XHFD8 and *tl*-1086 lines was also used ('D8xtl'). (2) *N. tabacum* cv Gatersleben ('Gat'). (3) *N. tabacum* cv Samsun ('Sam') and (4) *N. tabacum* cv PBD6 ('PDB6'), both provided by the Institut du Tabac, ALTADIS, Bergerac, France.

Plants were cultured in a shaded greenhouse and fully expanded young leaves of the six genotypes were sampled to obtain leaf explants and mesophyll protoplasts. Leaf tissues were simultaneously sampled from similar plants for both procedures.

Protoplast-derived regenerants

Leaves were sterilized, wounded and placed in medium T0 (Bourgin *et al.*, 1979) containing cell wall hydrolases (Onozuka R10, Yakult Biochemicals Co. Ltd, Tokyo, Japan, 0.1%; Macerozyme R10, same origin, 0.02%; Driselase, Sigma, St Quentin Fallavier, France, 0.05%) for a standard overnight (16 h) enzymatic digestion. Protoplasts were rinsed from the digestion medium, cultured in medium T0 as described (Bourgin *et al.*, 1979) and subcultured in medium C as previously described (Muller *et al.*, 1983). Derived colonies were plated onto solidified medium R4M0 medium (Bourgin *et al.*, 1979), allowing callus formation and callus-derived shoot regeneration. Regenerated shoots were rooted on B medium (Bourgin *et al.*, 1979). Each

regenerated plant was produced from a different callus, that is from a different protoplast.

Explant-derived regenerants

Leaves were sterilized, and wounded leaf pieces were placed onto solidified medium R4M0 medium (Bourgin *et al.*, 1979), allowing callus formation and callus-derived shoot regeneration at wound sites. Regenerated shoots were rooted on B medium (Bourgin *et al.*, 1979). Calli produced at different positions of the same leaf explant were separated at early stages. Each regenerated plant was obtained from a different callus.

SSAP procedure

Plant DNA was extracted from leaf material of 5–6 leaves *in vitro* plants, according to the Doyle and Doyle CTAB method (Doyle and Doyle, 1990). After an RNase treatment, RNA-free genomic DNA was extracted with phenol:chloroform, salt-precipitated and re-suspended in TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA). Genomic DNA (0.5 µg) was digested with 5 U *Eco*RI (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France) in a 25-µl volume of RL buffer (10 mM Tris-acetate pH 7.5, 10 mM magnesium acetate, 50 mM potassium acetate, 5 mM DTT) at 37°C overnight. The restricted DNA was diluted with one volume of ligation mix comprising 50 pmoles of *Eco*RI adaptors (Figure 1), 0.4 mM ATP, 1 U of *Eco*RI and 1 U of T4 DNA ligase (Pharmacia, Orsay, France) in RL buffer. Ligation was performed at 37°C for 3 h. Ligated DNA was finally diluted with 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA pH 7.5 to the final concentration of 2.5 ng µl⁻¹. A 5-µl aliquot of the diluted ligation mix was amplified in a 25-µl reaction containing 35 ng of ³²P-labeled LTR13 primer (5'-CTTATACCTTGTCTGTGAAACC-3', +286 to +265 of Tnt1-94 (Grandbastien *et al.*, 1989b), 50 ng of *Eco*RI primers (Figure 1), 0.24 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl₂ and 1.5 U of Taq DNA polymerase (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) in its reaction buffer. PCR was carried out using the following conditions: 5 min at 94°C, 13 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 65°C (–0.7°C per cycle), 2 min at 72°C, 25 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 56°C and 2 min at 72°C, followed by a final extension step at 72°C for 10 min.

After PCR, samples were diluted with one volume of loading dye (95% formamide, 0.05% xylene cyanol FF and 0.05% bromophenol blue), heat denatured at 94°C for 5 min and directly cooled on ice. For each sample, a 6–8 µl aliquot was loaded on a 6% denaturing polyacrylamide gel (20 × 40 × 0.04 cm) and pre-run at 35 W for 45 min. Samples were then run at 35 W for 4 h in 1xTBE. Gels were transferred to Whatman 3 MM paper and vacuum dried at 65°C for 1 h. Dried gels were exposed to X-ray films overnight or for 48 h, depending on the signal intensity.

Isolation and characterization of new SSAP bands

New SSAP bands that were clearly separated from non-poly-morphic bands were selected, excised from the dried gels using a razor blade and re-suspended in 100 µl of water. DNA was eluted from the bands by boiling for 15 min, salt-precipitated and re-suspended in 10 µl of sterile water. A 5-µl-sample was then used as DNA template in PCR amplification using the SSAP conditions and primers described above. Amplification products were separated on 2% agarose gels. Bands with the expected molecular weight were excised from the agarose gels and cloned in pGEMT vector according to the manufacturer's recommendations.

(Promega, Charbonnières, France). Sequencing was performed using the Abi prism automated sequencer. The nucleotide sequence data of these clones have been submitted to the DDBJ/EMBL/Genbank databases under the accession numbers: AF401683 to AF401739.

Five to six clones per SSAP band were usually analyzed. In some cases, minor contaminating clones were obtained in addition to a major consensus clone. Primers (sequence available upon request) were designed from the flanking genomic regions of consensus clones. Direct PCRs were performed using these primers and the LTR13 primer. In each case DNA from the regenerant, from which the new SSAP band was characterized, was tested against control DNA samples from other regenerants and/or from original genotypes. A new insertion was indicated when a PCR product of the expected molecular weight was obtained with DNA from the corresponding regenerant, but not with other control DNA samples. One regenerant was lost and the transpositional origin of two new SSAP bands could only be indirectly tested by negative PCR results on control DNA samples. For two bands isolated from protoplast-derived plants, only 2 bp of adjacent flanking sequences were found. However, these bands were assumed to be new insertions, since they each generated 5–6 identical clones. Most minor contaminating clones were also tested, and shown to correspond, as expected, to pre-existing Tnt1 insertions.

All sequenced copies were named as follows: the first letter(s) indicate(s) the genotype (g and gp = Gat; d and dp = D8; t = tl; x = D8xtl; s = sam; pb = PBD6); the following numbers (ranging from 1 to 23) identify the regenerant and the final number identifies the SSAP band. In the case of transposed copies, 'tr' was added to the name. In the case of pre-existing insertions (minor clones), a lower-case letter corresponding to each clone (ranging from 'a' to 'i') was added. For instance, the s231tr, s232tr and s233tr sequences correspond to three newly transposed copies, characterized from the same regenerant (numbered 23) obtained from leaf protoplasts of the cv. Samsun line, while the s231a sequence correspond to a pre-existing insertion isolated together with the s231tr new band.

Acknowledgements

We are very grateful to Josep M. Casacuberta and to Peter Hunt for critical reading of the manuscript, and to Dominique Higuier for helpful advice on statistical analyses. This work was supported by the EEC BIOTECH program BIO4-CT96-0508 (TEBIODIV) as well as by the CNRS Génome ('Plasticité et Intégrité des Génomes') program.

References

- Andrews, J.M., Oglesbee, M. and Lairmore, M.D. (1998). The effect of the cellular stress response on human T-lymphotropic virus type I envelope protein expression. *J. Gen. Virol.* **79**, 2905–2908.
- Arnault, C. and Dufournel, I. (1994). Genome and stresses: reactions against aggressions, behavior of transposable elements. *Genetica*, **93**, 149–160.
- Bailey, B.A., Dean, J.F.D. and Anderson, J.D. (1990). An ethylene biosynthesis-inducing endoxylanase elicits electrolyte leakage and necrosis in *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi leaves. *Plant Physiol.* **94**, 1849–1854.
- Bourgin, J.-P., Chupeau, Y. and Missonier, C. (1979). Plant regeneration from mesophyll protoplasts of several *Nicotiana* species. *Physiol. Plant.* **45**, 288–292.
- Bourgin, J.-P. and Missonier, C. (1973). Vegetative propagation and cold preservation of haploid plants of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana paniculata*. *Haploid Inf. Serv.* **8**, 7.
- Bradshaw, V.A. and McEntee, K. (1989). DNA damage activates transcription and transposition of yeast Ty retrotransposons. *Mol. Gen. Genet.* **218**, 465–474.
- Casa, A.M., Brouwer, C., Nagel, A., Wang, L., Zhang, Q., Kresovich, S. and Wessler, S.R. (2000). The MITE family *Heartbreaker* (Hbr): molecular markers in maize. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 10083–10089.
- Casacuberta, J.M. and Grandbastien, M.-A. (1993). Characterisation of LTR sequences involved in the protoplast specific expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon. *Nucl Acids Res.* **21**, 2087–2093.
- Casacuberta, J.M., Vernhettes, S. and Grandbastien, M.-A. (1995). Sequence variability within the tobacco retrotransposon Tnt1 population. *EMBO J.* **14**, 2670–2678.
- Curcio, M.J. and Garfinkel, D.J. (1999). New lines of host defense: inhibition of Ty1 retrotransposition by Fus3p and NER/TFIIH. *Trends Genet.* **15**, 43–45.
- Dellaporta, S.L., Chomet, P.S., Mottinger, J.P., Wood, J.A., Yu, S.M. and Hicks, J.B. (1984). Endogenous transposable element associated with virus infection in maize. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **49**, 321–328.
- Deshayes, A. (1979). Cell frequencies of green somatic variations in the tl chlorophyll mutant of *Nicotiana tabacum* var. Samsun. *Theor. Appl. Genet.* **55**, 145–152.
- Deshayes, A. (1976). Effets de cycles successifs de neoformation de bourgeons *in vitro* sur l'aptitude à la variation somatique chez un mutant chlorophyllien de *Nicotiana tabacum* var. Samsun. *Mutation Res.* **35**, 221–246.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissues. *Focus*, **12**, 13–15.
- Ellis, T.H.N., Poyser, S.J., Knox, M.R., Vershinin, A.V. and Ambrose, M.J. (1998). Polymorphism of insertion sites of Ty1-copia class retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea. *Mol. Gen. Genet.* **260**, 9–19.
- Grandbastien, M.-A. (1998). Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends Plant Sci.* **3**, 181–187.
- Grandbastien, M.-A., Lucas, H., Mhiri, C., Morel, J.-B., Vernhettes, S. and Casacuberta, J.M. (1997). The expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon is linked to the plant defense responses. *Genetica*, **100**, 241–252.
- Grandbastien, M.-A., Missonier, C., Goujaud, J., Bourgin, J.-P., Deshayes, A. and Caboche, M. (1989a). Cellular genetic study of a somatic instability in a tobacco mutant: *in vitro* isolation of valine-resistant spontaneous mutations. *Theor. Appl. Genet.* **77**.
- Grandbastien, M.-A., Spielmann, A. and Caboche, M. (1989b). Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. *Nature*, **337**, 376–380.
- Grandbastien, M.-A., Spielmann, A., Pouteau, S., Huttner, E., Longuet, M., Kunert, K., Meyer, C., Rouzé, P. and Caboche, M. (1991). Characterization of mobile endogenous copia-like transposable elements in the genome of Solanaceae. In *Plant Molecular Biology 2*, (Herrmann, R.G. and Larkins, B., eds.) New York, USA: Plenum Press, pp. 333–343.
- Gribbin, B.M., Pearce, S.R., Kalendar, R., Schulman, A.H., Paulin, L., Jack, P., Kumar, A. and Flavell, A.J. (1999). Phylogeny and transpositional activity of Ty1-copia group retrotransposons in cereal genomes. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 883–891.
- Heidmann, O. and Heidmann, T. (1991). Retrotransposition of a mouse IAP tagged with an indicator gene. *Cell*, **64**, 159–170.

- Hirochika, H. (1993). Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. *EMBO J.* **12**, 2521–2528.
- Hirochika, H., Sugimoto, K., Otsuki, Y., Tsugawa, H. and Kanda, M. (1996). Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 7783–7788.
- Johns, M.A., Mottinger, J. and Freeling, M. (1985). A low copy number, *copia*-like transposon in maize. *EMBO J.* **4**, 1093–1102.
- Kalendar, R., Tanskanen, J., Immonen, S., Nevo, E. and Schulman, A.H. (2000). Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by *BARE-1* retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 6603–6607.
- Kidwell, M.G. and Lisch, D.R. (2000). Transposable elements and host genome evolution. *Trends Ecol. Evolution*, **15**, 95–99.
- Liu, W.-M., Chu, W.-M., Choudary, P.V. and Schmid, C.W. (1995). Cell stress and translational inhibitors transiently increase the abundance of mammalian SINE transcripts. *Nucl Acids Res.* **23**, 1758–1765.
- Lotan, T. and Fluhr, R. (1990). Xylanase, a novel elicitor of pathogenesis-related proteins in tobacco, uses a non-ethylene pathway for induction. *Plant Physiol.* **93**, 811–817.
- McClintock, B. (1984). The significance of responses of the genome to challenge. *Science*, **226**, 792–801.
- Menees, T.M. and Sandmeyer, S.B. (1996). Cellular stress inhibits transposition of the yeast retrovirus-like element Ty3 by a ubiquitin-dependant block of virus-like particle formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 5629–5634.
- Mhiri, C., De Wit, P.J.G.M. and Grandbastien, M.-A. (1999). Activation of the promoter of the Tnt1 retrotransposon in tomato after inoculation with the fungal pathogen *Cladoporium fulvum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**, 592–603.
- Mhiri, C., Morel, J.-B., Vernhettes, S., Casacuberta, J.M., Lucas, H. and Grandbastien, M.-A. (1997). The promoter of the tobacco Tnt1 retrotransposon is induced by wounding and by abiotic stress. *Plant Mol. Biol.* **33**, 257–266.
- Moreau-Mhiri, C., Morel, J.-B., Audéon, C., Ferault, M., Grandbastien, M.-A. and Lucas, H. (1996). Regulation of expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon in heterologous species following pathogen-related stresses. *Plant J.* **9**, 409–419.
- Muller, J.-F., Missonier, C. and Caboche, M. (1983). Low density growth of cells derived from *Nicotiana* and *Petunia* protoplast: influence of the source of protoplasts and comparison of the growth promoting activity of various auxins. *Physiol. Plant.* **57**, 35–40.
- Pathak, V.K. and Temin, H.M. (1990). Broad spectrum of *in vivo* forward mutations and mutational hotspots in a retroviral shuttle vector after a single replication cycle: deletions and deletions with insertions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **87**, 6024–6028.
- Pauls, P.K., Kunert, K., Huttner, E. and Grandbastien, M.-A. (1994). Expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon promoter in heterologous species. *Plant Mol. Biol.* **26**, 393–402.
- Pouteau, S., Grandbastien, M.-A. and Boccara, M. (1994). Microbial elicitors of plant defense responses activate transcription of a retrotransposon. *Plant J.* **5**, 535–542.
- Pouteau, S., Huttner, E., Grandbastien, M.-A. and Caboche, M. (1991). Specific expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon in protoplasts. *EMBO J.* **10**, 1911–1918.
- Rofte, M., Spanos, A. and Banks, G. (1986). Induction of yeast Ty element transcription by ultraviolet light. *Nature*, **319**, 339–340.
- Strand, D.J. and McDonald, J.F. (1985). *Copia* is transcriptionally responsive to environmental stress. *Nucl Acids Res.* **13**, 4401–4410.
- Taylor, C.P. (1998). Defense responses in plants and animals – More of the same. *Plant Cell*, **10**, 873–876.
- Van den Broek, D., Maes, T., Sauer, M., Zethof, J., De Keukeleire, P., D'Hauw, M., Van Montagu, M. and Gerats, T. (1998). *Transposon Display* identifies individual transposable elements in high copy number lines. *Plant J.* **13**, 121–129.
- Varagona, M.J., Purugganan, M. and Wessler, S.R. (1992). Alternative splicing induced by insertion of retrotransposons into the maize *waxy* gene. *Plant Cell*, **4**, 811–820.
- Vernhettes, S., Grandbastien, M.-A. and Casacuberta, J.M. (1998). The evolutionary analysis of the Tnt1 retrotransposon in *Nicotiana* species reveals the high plasticity of its regulatory sequences. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 827–836.
- Vernhettes, S., Grandbastien, M.-A. and Casacuberta, J.M. (1997). *In vivo* characterization of transcriptional regulatory sequences involved in the defence associated expression of the tobacco retrotransposon Tnt1. *Plant Mol. Biol.* **35**, 673–679.
- Waugh, R., McLean, K., Flavell, A.J., Pearce, S.R., Kumar, A., Thomas, B.B.T. and Powell, W. (1997). Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (SSAP). *Mol. Gen. Genet.* **253**, 687–694.
- Wessler, S. (1996). Plant retrotransposons: turned on by stress. *Curr. Biol.* **6**, 959–961.
- White, S.E., Habera, L.F. and Wessler, S.R. (1994). Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes: a role for *copia*-like elements in the evolution of gene structure and expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 11792–11796.
- Xu, H. and Boeke, J.D. (1987). High-frequency deletion between homologous sequences during retrotransposition of Ty elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **84**, 8553–8557.
- Yano, A., Suzuki, K. and Shinshi, H. (1998). Induction of hypersensitive cell death by a fungal protein in cultures of tobacco cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 115–123.

DDBJ/EMBL/GeneBank accession numbers AF401683 to AF401739.



Expression profiling of genes involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance in *Thlaspi caerulescens*

Judith E. van de Mortel¹, Lisa A. Gilhuijs-Pederson², Maarten Koornneef¹ and Mark G.M. Aarts¹

Introduction

Thlaspi caerulescens (Fig. 1) is a natural Zn, Cd and Ni hyperaccumulator species belonging to the Brassicaceae family. It is self-fertilizing, and closely related to *Arabidopsis*, with about 87-88% DNA identity. There are several accessions known with different metal uptake, accumulation and tolerance characteristics. Thus it appears an excellent model species to study Zn, Cd, and Ni hyperaccumulation and tolerance in plants.



Fig. 1 *Thlaspi caerulescens*

Little is known about the molecular genetic mechanism behind heavy metal hyperaccumulation and tolerance. We are trying to unravel this mechanism by studying *T. caerulescens*' global and individual gene expression. The initial attempt is to identify genes that play a role in Zn hyperaccumulation or tolerance.

Materials and methods

Global gene expression analysis was performed by heterologous cDNA micro-array hybridisation using Agilent *Arabidopsis* 1 oligonucleotide arrays representing around 13,500 putative genes. The array was labelled with cDNA from *Arabidopsis thaliana* roots grown hydroponically at 2 μ M ZnSO₄ and *T. caerulescens* roots grown at 2 and 100 μ M ZnSO₄ (Fig. 2). Individual gene expressions were confirmed for *T. caerulescens* by Northern blot analysis.

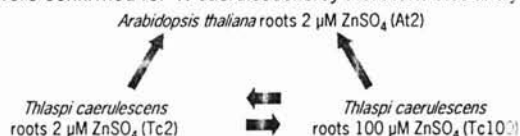


Fig. 2 Experimental set-up of the micro-arrays. Arrows indicate different hybridisations. The arrow colour indicates whether a sample was labelled with Cy3 (green) or with Cy5 (red).

Results and discussion

More than 300 genes are higher expressed in roots of *T. caerulescens* compared to *Arabidopsis* and 73 genes are differentially expressed between *T. caerulescens* roots exposed to two ZnSO₄ concentrations (Fig. 3).

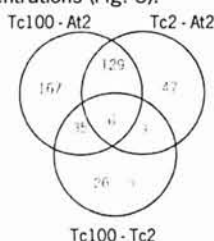


Fig. 3 Venn-diagram of the number of genes up- or down-regulated in the different comparisons. red = up-regulated, green = down-regulated

From these data we selected some genes which may be involved in zinc hyperaccumulation and/or tolerance. *ZIP4*, the most differentially expressed gene between *Thlaspi* and *Arabidopsis* (at 2 μ M Zn), is the *Arabidopsis* orthologue of *ZNT1*, a zinc transporter previously suggested to be involved in Zn hyperaccumulation.

Table 1. A selection of differentially regulated genes with a putative role in heavy metal hyperaccumulation or tolerance. red = up-regulated, green = down-regulated, blue = no significant difference in expression.

	Tc2 - At2	Tc100 - At2	Tc100 - Tc2
<i>ZIP4</i> , a putative Zn transporter	23	12	0.53
Sadenosyl-L-homocysteine, putative	8.0	17	2.2
Cold acclimation protein homolog	4.0	18	4.6
Hypothetical protein	6.0	14	2.3
Hypothetical protein	3.6	40	12
Putative glutathione S-transferase	3.4	9.2	2.7
Cytosolic malate dehydrogenase	3.8	8.5	2.3
Scarecrow-like 1	2.5	7.2	2.9
Ferrulic-5-hydroxylase (FAH1)	7.7	7.1	0.93
bZIP transcription factor-like protein	7.1	12	1.7
Cadmium transporting ATPase like protein	3.5	4.0	1.2
Putative cadmium transporting ATPase	15	20	1.3
Metallothionein 2b	3.5	8.0	2.3
Putative zinc transporter	5.7	3.0	0.52
Ferrodoxin precursor isolog	4.5	2.3	0.51
NAM (no apical meristem)-like protein	3.4	4.4	1.3
Receptor-like protein kinase	3.3	4.1	1.3
Putative ascorbate peroxidase	16	27	1.7
Nicotianamine synthase	3.2	6.8	2.1
Copper amine oxidase-like protein	5.3	3.6	0.68
Putative protein	6.0	0.96	0.16
AP2 domain containing protein RAP 2.3	2.0	2.5	0.15
Putative xyloglucan endotransglycosylase	0.19	0.068	0.026

Northern blots of *T. caerulescens* roots and leaves grown at different zinc concentrations were performed for a selected number of genes to confirm their expression (Fig. 4).

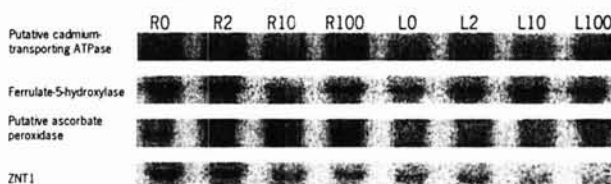


Fig. 4 Northern blot analysis of four genes which may be involved in zinc hyperaccumulation and/or tolerance. Ten micrograms of total RNA of *T. caerulescens* roots (R) and leaves (L) was used.

Conclusions

- *Arabidopsis* oligo-arrays can be conveniently used for heterologous hybridisation with labelled *T. caerulescens* cDNAs.
- Over 300 genes are higher expressed in *T. caerulescens* roots grown at normal and elevated Zn concentrations compared to *Arabidopsis* roots at normal Zn concentrations.
- Relatively few genes are differentially expressed between *T. caerulescens* roots exposed to 2 and 100 μ M ZnSO₄.

¹ Laboratory of Genetics, Wageningen University, Arboretumlaan 4, 6703 BD Wageningen, The Netherlands

² Academic Medical Center, University of Amsterdam (UvA), Meibergdreef 9, 1105 DE Amsterdam, The Netherlands

POLYKETIDE DERIVATIVES ACTIVE AGAINST *BOTRYTIS CINEREA* IN *GERBERA HYBRIDA* (ASTERACEAE)

Teemu H. Teeri¹, Satu Koskela², Päivi Söderholm³, Tero Wennberg³, Karel D. Klika⁴, Vladimir V. Ovcharenko⁴, Irene Kylänlahti³, Tiina Auerma², Jari Yli-Kauhaluoma³, Kalevi Pihlaja⁴, and Pia M. Vuorela³

¹Gerbera Laboratory, Department of Applied Biology, University of Helsinki, P.O. Box 27, FIN-00014 Helsinki, Finland; ²Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland; ³Viikki Drug Discovery Technology Centre, Department of Pharmacy, University of Helsinki, Finland; ⁴Structural Chemistry Group, Department of Chemistry, University of Turku, Finland;

INTRODUCTION

Plants produce a remarkable diversity of secondary metabolites, low-molecular weight natural products that have roles, e.g., in interactions with the environment. Chalcone synthase (CHS), the key enzyme of the flavonoid branch of phenylpropanoids, is a member of a super family of plant polyketide synthases that includes closely related enzymes catalyzing one, two or three sequential condensing reactions between malonyl-CoA and a variety of CoA-thioester starters. Previously we isolated from *Gerbera hybrida* a cDNA molecule encoding a new CHS-like enzyme, 2-pyrone synthase (2PS) [3]. 2PS has novel substrate specificity, but retains nearly 70% amino acid identity with CHS. The end product of its reaction sequence is triacetolactone (1), a putative precursor of both gerberin (2) and parasorboside (3) (Fig. 2) [1].

Gerbera plants transgenic for an antisense construct of the 2PS encoding cDNA lack 2PS enzymatic activity [2] and consequently produce neither gerberin (2) nor parasorboside (3). These two glucosides themselves are not antifungal but are thought to be precursors or storage forms of bioactive molecules in gerbera plants. Here we report on three pathogen-induced antifungal compounds, gerberin aglycone (4), trans-parasorboside aglycone (5) and 4-hydroxy-5-methylcoumarin (6) in response to *Botrytis cinerea* attack in gerbera ascertained by comparing uninfected plants to transgenic lines lacking 2PS.

RESULTS

Susceptibility of the 2PS transformants to the mold *Botrytis cinerea*

To test whether transgenic gerbera plants lacking 2PS activity are more susceptible towards *B. cinerea* than control plants, an infection study was performed under controlled greenhouse conditions. The progress of the infection was followed for nine days after inoculation. A clear difference between the 2PS antisense plants and the control plants in their ability to resist mold infection was observed (Fig. 1).

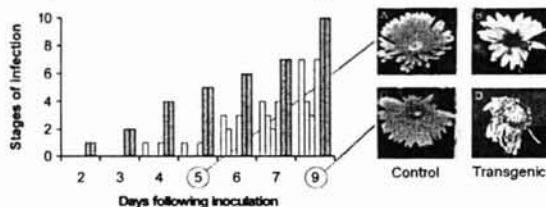


Figure 1. Progression of infection by *Botrytis cinerea* in *Gerbera hybrida*. Control plants (white bars) showed no signs of infection five days after infection (A) and had only minor damage after nine days (C). By contrast, the transformants lacking 2PS (gray bars) were always severely infected by the fifth day (B) and were totally collapsed after nine days (D).

Compounds induced during *B. cinerea* infection

A survey using various solvents showed that the methanol extract of the control plants contained bioactive compounds that were lacking in the transformants. In addition to the constantly expressed substances gerberin (2) and parasorboside (3), at least three new substances were detected by TLC analysis in the inflorescences of infected control plants but not in the transgenic plants (Fig. 2).

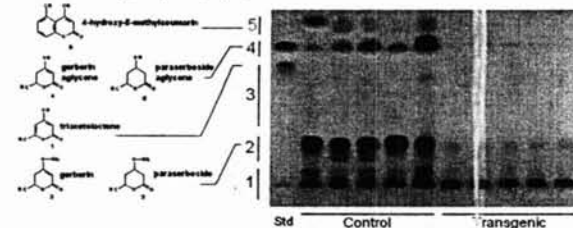


Figure 2. TLC analysis of the extracts from infected gerbera plants. In addition to the constantly expressed glucosides gerberin (2) and parasorboside (3) (fraction 2), several additional compounds appeared in the coronas of infected control plants during *B. cinerea* infection (fractions 4 and 5). The glucosides or any of the induced substances were not observed in the extracts from the transformants.

Isolation and identification of the antifungal compounds

To identify the bioactive compounds in the methanol extracts from the control plant samples, preparative TLC fractionation was performed. A total of five fractions were collected from TLC plates (Fig. 2). Inhibition was observed only for fractions 4 and 5, other fractions did not show any signs of inhibition, including fraction 2 containing gerberin (2) and parasorboside (3). The bioactive fractions were further purified by HPLC and the structures of the compounds identified by NMR and MS. Minimal inhibitory concentrations for the antifungal compounds (4) and (6) against *B. cinerea*, *H. anisomum* and *R. solani* were determined (Table I).

Compound	<i>B. cinerea</i>	<i>H. anisomum</i>	<i>R. solani</i>
4-hydroxy-5-methylcoumarin (6)	8	10	1
gerberin aglycone (4)	500	250	500
triacetolactone (1)	250	500	500
sorbic acid	125	125	250

DISCUSSION

Induced antifungal compounds in *Gerbera hybrida*

In this study, three antifungal agents were isolated from gerbera plants and were found to be induced following infection by the mild *Botrytis cinerea*. The phytoalexins have their glucosides present in the uninfected plant [1,6]. The glucosides are found in all aerial parts of the gerbera plant, but the toxic aglycones were released only in the floral organs during *B. cinerea* infection.

Biosynthesis of the antifungal compounds

We had earlier identified in gerbera a novel type of chalcone synthase-like polyketide synthase that is responsible for the initial steps of gerberin (2) and parasorboside (3) biosynthesis [1,3,4]. This enzyme, 2PS, catalyzes formation of triacetolactone (1) from acetyl-CoA through an enzyme-bound triketide intermediate (Fig. 3) [1]. Transgenic gerbera lines where 2PS activity was down-regulated using antisense transformation [2] were devoid of both 2PS activity and the occurrence of gerberin (2) and parasorboside (3). Furthermore, these gerbera lines were sensitive to fungal infections in the greenhouse and, unlike extracts from untransformed plants, their methanol extracts did not inhibit fungal growth *in vitro*.

Here we have demonstrated that untransformed gerbera plants are able to respond to a fungal pathogen by synthesizing at least three different phytoalexins (4, 5 and 6), which are not produced in 2PS down-regulated transgenic lines. Two of the phytoalexins are the aglycones of gerberin (4) and parasorboside (5) and relate directly to the presence of 2PS activity in gerbera [1].

Coumarins are distributed widely in the plant kingdom and many are known to be biologically-active compounds. 5-Methylcoumarins are mainly found in the tribe Mutisleeae of Asteraceae, where *Gerbera* is also taxonomically located. In addition to being taxonomically restricted, the biosynthesis of 5-methylcoumarins is different from normal coumarin biosynthesis that proceeds via the shikimate pathway. Feeding studies with radioactively-labeled precursors suggest that 5-methylcoumarins are derivatives of polyketides [5]. The methyl group at position 5 is derived from acetyl-CoA, and two-carbon units are added from malonyl-CoA until formation of a pentaketide, which then folds into the bicyclic product (Fig. 3).

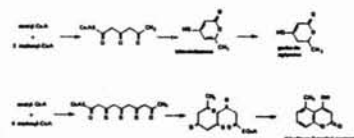


Figure 3. Acetyl-CoA derived polyketides in gerbera. Triacetolactone, putative precursor of both gerberin (2) and parasorboside (3), shares with 4-hydroxy-5-methylcoumarin (6) its biosynthetic precursors. The compounds may be formed by similar enzymes in gerbera.

A family of 2-pyrone synthases in gerbera

Gerberin (2) and parasorboside (3), along with their bioactive, aglycone derivatives (4 and 5, respectively), and 4-hydroxy-5-methylcoumarin (6) share, as part of their biosynthesis, a polyketide intermediate derived from the unusual starter unit acetyl-CoA. Furthermore, biosynthesis of both groups of compounds is concomitantly blocked in transformants with an antisense construct of *g2ps1*. It is possible that the *g2ps1* encoded 2PS is *in vivo* responsible for both triketide- and pentaketide-based metabolites. Alternatively, gerbera may express a second, yet unidentified 2PS with a larger active-site cavity. A small family of *g2ps1*-related genes exists in the gerbera genome [4]. Genes closely related to *g2ps1* that might encode for as yet uncharacterized 2PS enzymes could be concomitantly down-regulated in the transgenic plants investigated in this study.

LITERATURE CITED

[1] Eckermann S, Schröder G, Schmitt J, Starck D, Edrache RA, Helakitta Y, Elomaa P, Kallinen M, Kipellinen I, Proksch P, Teeri TH, Schröder J (1996) New pathway to polyketides in plants. *Nature* 380:387-389.
[2] Elomaa P, Helakitta Y, Kallinen M, Teeri TH (1996) Transformation of antisense constructs of the chalcone synthase gene superfamily into *Gerbera hybrida*: differential effect on the expression of family members. *Mol Breeding* 2:41-50.

[3] Helakitta Y, Elomaa P, Kallinen M, Olesch R, Schröder J, Teeri TH (1995) Chalcone synthase-like genes active during corolla development are differentially expressed and uncharacterized with different catalytic properties in *G. hybrida* (Asteraceae). *Plant Mol Biol* 28:47-60.
[4] Helakitta Y, Kallinen M, Elomaa P, Kallinen M, Boman K, Teeri TH, Albert V (1996) Duplication and functional divergence in the chalcone synthase gene family of *Asteraceae*: Evolution of substrate change and catalytic simplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3033-3038.
[5] Inoue T, Toyonaga T, Nagano S, Nagai M (1989) Biosynthesis of 4-hydroxy-5-methylcoumarin in a *Gerbera jamaicensis* hybrid. *Phytochemistry* 28:2329-2330.
[6] Nagano S, Toyonaga T, Inoue T, Nagai M (1989) New glucosides of a 4-hydroxy-5-methylcoumarin and a dihydro-pyrone from *Gerbera jamaicensis* hybrid. *Chem Pharm Bull* 37:2821-2823.

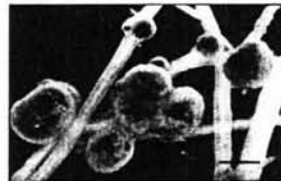
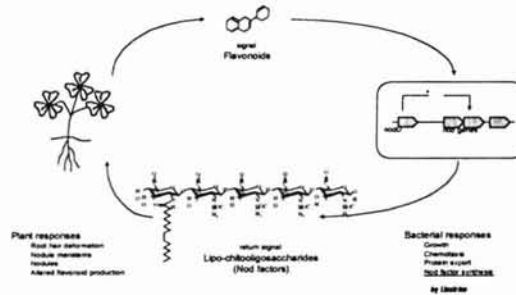
THE FUNCTION OF CHITINASES IN DEFENCE RESPONSE AND DURING NODULATION IN *GALEGA ORIENTALIS*

Ulrika Troedsson and Carin Jarl-Sunesson, Cell and Organism Biology, Lund University,
S-223 62 Lund SWEDEN
carin.jarl-sunesson@cob.lu.se

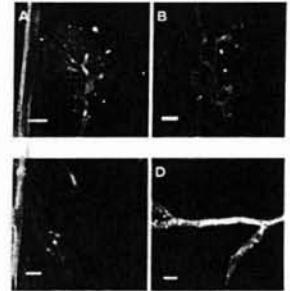
LUND UNIVERSITY



Galega orientalis

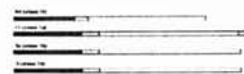


Rhizobium galegae nodules

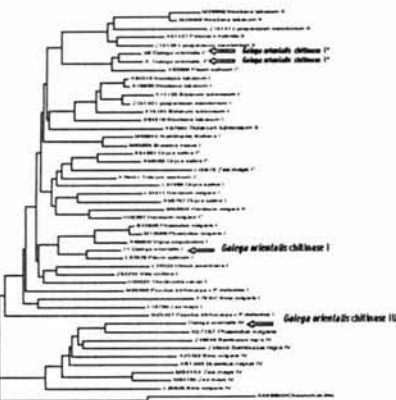


Galega orientalis infected with vesicular arbuscular mycorrhiza [*Glomus intraradices*]. R&B: arbuscules, C: vesicle, D: external hyphae

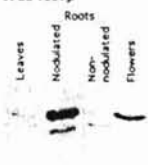
Communication between plants and microbes
What is the difference between symbiosis and a pathogen attack?
We are studying plant proteins (chitinases, lectins and defensins) postulated to be involved in both processes. *Galega orientalis* is a legume with a very specific interaction with its microsymbiont, *Rhizobium galegae*. The plant can be colonized by mycorrhiza (as shown above). Expression patterns of the proteins are investigated by immunolocalization. We are also investigating the genes coding for the proteins.



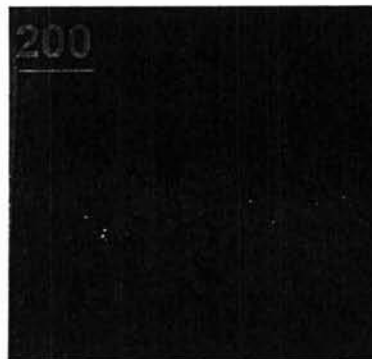
We have isolated four chitinases from *Galega orientalis*, three class I-chitinases and one class IV.



Phylogenetic tree made with sequences from chitinases genes (partly based on Hamel et al. 1997).



Western blot using different tissues of *Galega* with an antibody (class I and II chitinases)



Thin transversal section of a young *Galega orientalis* root nodule and root.



Thin longitudinal section of a *Galega orientalis* root nodule



Phylogenetic tree made with sequences from legume lectin genes (partly based on Brewin & Hardalvik 1997).



Sequence alignment of n93 from *Galega* with proteins of the gamma-thionin family

Genetic Engineering of the Tropane Alkaloids Hyoscyamine vs. Scopolamine in Transgenic Hairy Root Cultures of *Atropa baetica* Willk.

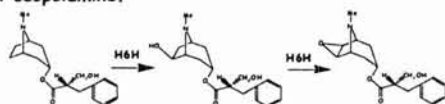
Nabil el Jaber, Angel G. Ravelo, Rafael Zárte

Inst. Universitario de Bio-Organica "A. González", Universidad de La Laguna. Ave. Fco. Sánchez 2, La Laguna, 38206. Tenerife. Spain.

INTRODUCTION

Plants constitute a major source of natural products broadly used by the pharmaceutical, agrochemical, fragrance and food industries. Lately, biotechnological strategies have been applied in attempts to increase product yield employing different plants and culture systems; and more recently, Recombinant DNA Technology has been applied to achieve this aim, attaining significant advances^[1].

Atropa baetica (Solanaceae) (Fig. 1) is a herbaceous perennial plant endemic to southern Spain and northern Morocco, able to accumulate important tropane alkaloids of pharmaceutical interest such as hyoscyamine and scopolamine. The latter showing higher properties as it is more active at lower doses and displays less number of side effects. The conversion of hyoscyamine into scopolamine is catalyzed by the enzyme H6H (hyoscyamine 6 β -hydroxylase, EC. 1.14.11.11), an enzyme showing two different functions: hydroxylation at position 6, forming the intermediate 6 β -hydroxyhyoscyamine, and subsequent epoxidation without the existence of a double bond, synthesising the end product scopolamine.



The application of Recombinant DNA Technology allows alteration and control of metabolic pathways. Here, the overexpression of *h6h* coding gene in transgenic hairy roots of *A. baetica* has been performed to redesign the alkaloid profile of this species.

RESULTS & DISCUSSION

Control and *h6h* hairy roots were established following *A. rhizogenes* infection. Selection of transgenic roots using km (10mg/L) added to the liquid medium failed as cultures died in the presence of this agent. Nevertheless, the presence of *npt-II* gene was demonstrated from genomic DNA by PCR as shown in Fig. 2, indicating gene silencing of this selection marker.



Fig. 1 - Mature *A. baetica* plant.

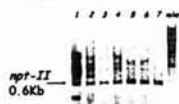


Fig. 2 - Agarose gel of *npt-II* PCR analyses of different hairy root samples (1 *gus*-control), (2-4 cell line 7 *h6h* grown in MS) (5-6 cell line 7 *h6h* grown in 1/2MS), (7 cell line 7 *h6h* grown in B₃).

As expected, control cell line presented a higher atropine (4.0 mg/gDW) than scopolamine (2.2mg/gDW) levels, mimicking the situation in the plant^[2], and showing also 6 β -OH-hyoscyamine (2.3mg/gDW). Nevertheless, the scopolamine amount was higher in control roots than in plants, indicating a higher *h6h* activity in this culture system as reported earlier^[3]. Furthermore, similar to other reports atropine was not released into the liquid medium^[4], unlike scopolamine and minor amounts of the intermediate (Fig. 3a-b).

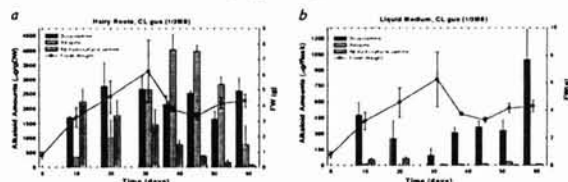


Fig. 3 - Alkaloid content in hairy roots (a) and liquid medium (b) of control *gus* line, growing in 1/2MS.

On the other hand, cell line 7, overexpressing *h6h* gene, cultured in MS, showed the highest growth (8g) and in hairy roots the highest alkaloid accumulation, which appeared parallel to growth (Fig. 4a).

More importantly, here the amount of scopolamine (3.8mg/gDW) was much higher than atropine (0.4mg/gDW) which was almost totally converted, appearing also 6 β -hydroxyhyoscyamine. This indicates that the overexpression of *h6h* resulted in a major scopolamine level. Similarly to *gus* line, atropine and the intermediate were not released into the liquid medium, but considerable amounts of scopolamine (1.6mg/fask) were detected in this fraction (Fig. 4b).

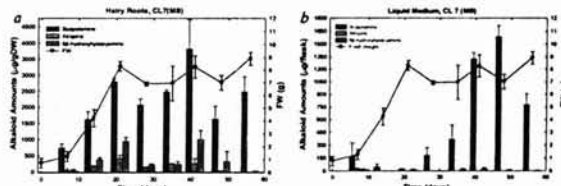


Fig. 4 - Alkaloid content in hairy roots (a) and liquid medium (b) of cell line 7 overexpressing *h6h*, growing in MS.

Moreover, despite the change in alkaloid profile, following RNA extraction and RT-PCR analyses, it was observed that *h6h* gene expression was similar to control *gus* (Fig. 5), but this appears to be due to damage of the CL7 RNA sample since the same cell line grown in B₃ or 1/2MS media gave a much higher gene expression than *gus* control (30x) (Fig. 5).

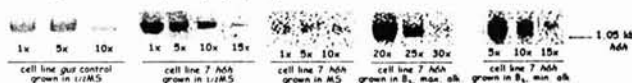


Fig. 5 - RT-PCR analyses of *h6h* mRNA level in different transgenic *Atropa baetica* hairy root cell lines grown in different media. RNA samples were diluted down (5 fold increments) and then RT-PCR was performed with appropriate *h6h* primers to evaluate the mRNA levels.

When culturing cell line 7 in two other nutrient media (1/2MS & B₃), offering lower nitrogen and phosphate, it was observed a growth decrease. However, scopolamine was again the major alkaloid despite accumulating at lower amounts (1.9-2.6mg/gDW) than in MS medium, and was also present in the liquid medium (Fig. 6a-d). This indicates a higher *h6h* activity, as also determined by mRNA levels (Fig. 5). Again hyoscyamine was almost totally converted into scopolamine, and was not released into the liquid medium as reported for other transformed hairy roots^[4].

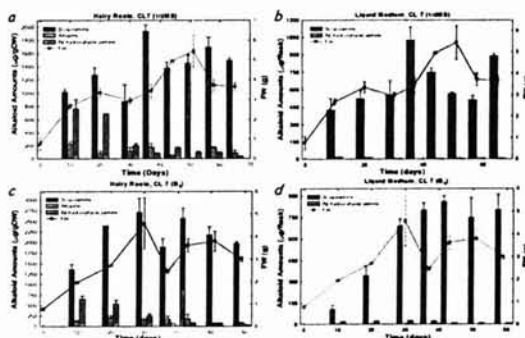


Fig. 6 - Alkaloid content in hairy roots (a, c) and liquid medium (b, d) of cell line 7 overexpressing *h6h*, growing in 1/2MS and B₃ media.

These data indicate that conversion of hyoscyamine into scopolamine in this transgenic hairy root system was virtually total, unlike other work overexpressing the same enzyme where large amounts of hyoscyamine were not converted^[5]. Besides, the change in nutrient media, trying to reduce primary metabolism and stimulate secondary metabolism did not result in a larger alkaloid accumulation, although again *h6h* conversion of these metabolites was very effective.

CONCLUSIONS

- The overexpression of *h6h* resulted in virtually a total conversion of hyoscyamine into scopolamine in *A. baetica* transgenic hairy roots.
- In the best nutrient medium, the accumulation of scopolamine paralleled culture growth, unlike the scopolamine released into the liquid medium. The release of alkaloids into the medium was a feature of this culture system.
- Higher *h6h* mRNA levels appeared related to a higher conversion.
- The control culture showed a higher hyoscyamine accumulation in comparison to scopolamine.
- Recombinant DNA technology allowed altering and tailoring the tropane alkaloid profile in *A. baetica* transgenic hairy roots.

REFERENCES

- [1] Zárte R, Yeoman MM (2001) Application of Recombinant DNA Technology to Studies on Plant Secondary Metabolism. In: From Soil to Cell - A Biotech Approach to Plant Life, (Bender L., Kumar A., eds.) pp. 82-96. Elsevier Science, Germany.
- [2] Zárte R et al. (1997) J. Chem. Ecol. 23: 2059-2066
- [3] Zárte R (1999) Plant Cell Rep. 18: 418-423
- [4] Sharp JM, Doran PM (1990) J. Biotechnol. 16:171-186

Abstract

中国汽车工业协会

Expression Profile of *O₅MADS50*

Frequency Distribution of Days to Heading in T1 Transgenic Plants Suppressing *OsMADS50* Transcripts

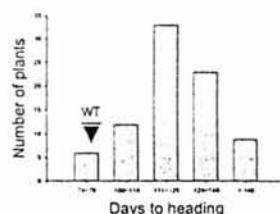


Figure 7

Flowering time of 82 T1 transgenic plants were measured in the field. Days to heading indicates the number of days required flowering from transplanting. Wild type and other transgenic control plants flowered 74–78 days after planting. Most of the RNAi transgenic plants flowered late. Nine lines did not flower until 140 days after planting.

Transgenic Plants Over-Expressing *OsMADS50*

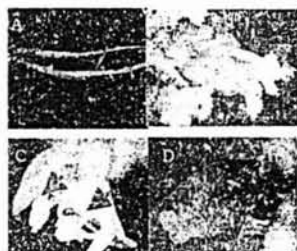


Figure 9

Majority of the transformants that carry the *ubi* promoter-*GmMADS50* showed the phenotype of extreme early flowering at callus stages. Some calli regenerated and flowered when they were young.

- (A) The first leaf does not have a visible leaf blade while the second leaf exhibited a twisted leaf blade. The third leaf was a flag leaf and a panicle was observed in the leaf sheath of the flag leaf.
- (B) Callus with multiple pea/lemma-like structures (p1) and stigma-like structures.
- (C) Callus with stamen-like (st) and ovule-like (ov) structures.
- (D) Callus with panicle-like (p) structures.

One Late Flowering Line, Co-segregated with T-DNA



Figure 1

For forward genetic approach, T2 plants of 2933 lines were segregated in the field, and mutant lines that exhibited alteration of the flowering time were screened. One late flowering mutant line, which co-segregated with T-DNA was selected for further study. Flowering time was delayed about a month in the mutant progeny.

Genomic Structure of *OsMADS50*, and T-DNA Insertion Position



Figure 2

The *OxMLH39* gene is located on chromosome 3. Genomic structure of the gene was predicted by comparing the cDNA and genomic DNA. As observed from other MAD5-box genes, it contains four conserved regions, M, I, K, and C. The K region consists of four exons, whereas the other regions are composed of one exon each. The length of the 1st intron is large (27 631-bps). T-DNA was inserted into the 4th intron.

Transgenic Plants Suppressing the *OsMADS50* Expression Showed Late Flowering Phenotype

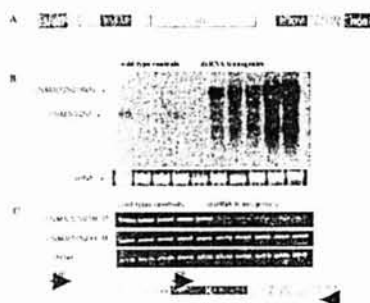


Figure 6

- (A) A schematic diagram of the *ChLM1530* RNAi construct. The GUS spacer was inserted between two ITC regions of *ChLM1530*. The construct was inserted between the maize ubiquitin (ubi) promoter and the nopaline synthase (nos) terminator.
- (B) RNA gel blot analysis of the *ChLM1530* and *ChLM1530* RNAi transcripts in transgenic plants expressing the *ChLM1530* RNAi construct. Five wild-type plants (left) and five independent transgenic plants (right) were examined. The RNA level was observed as a control (bottom).
- (C) RT-PCR analyses for the *ChLM1530* and *ChLM1530* RNAi transcripts in wild-type plants (left) and transgenic plants (right). MF, a forward primer on the MADS-box region; KF, a forward primer on the K region; R, a reverse primer on the C' terminal region. Actin was used as a control.

The proportion of Elongated Internodes in the *OsMADS50* RNAi Transgenic Stems

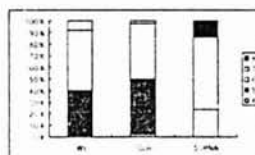


Figure 3

The wild type and transgenic control plants carry five (38.1% and 47.4%, respectively) to six (52.4% and 47.4%, respectively) elongated internodes. In contrast, most of the *OaMADS50* RNAi plants carry six (23.5%) to seven (62.7%) elongated internodes. In addition, 13.7% of the *OaMADS50* RNAi plants carry eight elongated internodes.

Effect of *OsMADS50* Over-expression on Other MADS-Box Genes

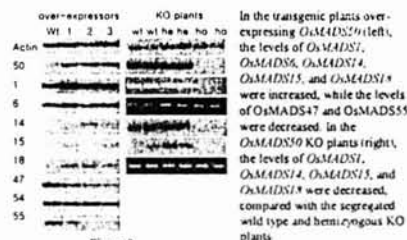


Figure 9

In the transgenic plants over-expressing *OsMADS20* (left), the levels of *OsMADS1*, *OsMADS6*, *OsMADS74*, *OsMADS15*, and *OsMADS18* were increased, while the levels of *OsMADS47* and *OsMADS55* were decreased. In the *OsMADS59* KO plants (right), the levels of *OsMADS1*, *OsMADS14*, *OsMADS15*, and *OsMADS18* were decreased, compared with the segregated wild type and hemizygous KO plants.

Phylogenetic Tree

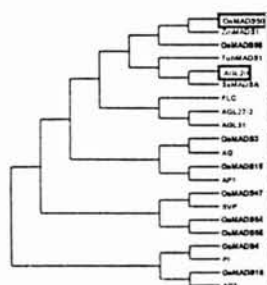


Figure 3

BLAST search results showed that OsMADS50 is most homologous to AGL20, sharing 50.6% amino acid sequence identity. The *AtGL20* gene is a major flowering activator in *Arabidopsis*. Rice MADS-box proteins were indicated as orange.

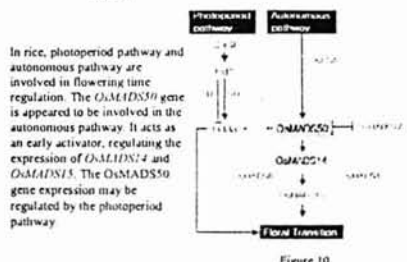


Figure 10

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported in part by grants from SRC, NRL, and 21C Frontier Program of KISTEP.

SSR analysis of grapevine varieties autochthonous in the Carpathian Basin

E. KISS^{1,3}, A. BALOGH¹, A. VERES¹, Z. GALLI³, T. KONCZ¹, M. KOCSIS², L. HESZKY^{1,3}, P. KOZMA²

1. Szent István University, Gödöllő, H-2103, Hungary

2. Research Institute for Viticulture and Enology, Pécs, H-7634, Hungary

3. Research Group for Molecular Breeding of the Hungarian Academy of Sciences, Gödöllő

List of grapevine cultivars of gene bank of the Research Institute of Viticulture and Enology, Pécs.

1. Alatsiennő	33. Gergely	65. Mézesfő
2. Aprófehér	34. Gohér, fehér (white)	66. Mustos
3. Agasfark	35. Gohér, piros (red)	67. Pápaszka
4. Bajor, kek (blue)	36. Gohér, változó	68. Pettyes szőlő
5. Bajor, szürke (grey)	37. Gómbaszőlő	69. Peci dinka
6. Bakator, piros (red)	38. Halapi	70. Peci szagos
7. Bakator, piros (red)	39. Hamusdőlő	71. Pirok fűmirt
8. Balaftani	40. Hárslevél	72. Pirok gránit
9. Balint	41. Hosszúlevél	73. Pirok tőcs
10. Bányai rizling	42. Istáki (Aranyvárfő)	74. Polihos
11. Beregi	43. Jászóvár	75. Pozsonyi Fehér
12. Betyárszőlő	44. Juhfark	76. Pucsin
13. Bihari	45. Kadarka	77. Rákaszőlő
14. Bogdányi dinka	46. Kéklopor	78. Rákafark
15. Böszörmény	47. Kéknyelű	79. Rohad
16. Budai	48. Királyleányka	80. Rózsaszőlő
		81. Sárfehér
17. Cudarszőlő	49. Királyszőlő	
18. Cukorszőlő	50. Kolontár	
19. Csikos muskotály	51. Kovács	82. Sárpiros
20. Csokaszőlő	52. Kovácskegy	83. Somosdőlő
21. Csomorka	53. Korma	84. Szagos bajnár
22. Creiger	54. Kódos	85. Szeredi
23. Denjén	55. Kóporos	86. Szeremi
24. Deke	56. Kővesszőlő	87. Tihanyi
25. Ende	57. Kővidinka	88. Tóka
26. Ezerjék	58. Kubeli	89. Tökaszőlő
27. Fekete balaftani	59. Lányosdőlő	90. Tulipiros
28. Fodroslevél	60. Lánglevél	91. Tükörszőlő
29. Furmint	61. Leányka	92. Tuskepipő
30. Fűrér	62. Lisztes fehér	93. Ürömi dinka
31. Füzesdőlő	63. Lisztes piros	94. Vékonybő
32. Furmány	64. Magyarka	95. Vörös dinka (red)
		96. Zöld dinka (green)



Introduction: history

At the end of the 19. century the cultivar assortment, growing strategy, agrotechniques and breeding purposes were changed in grapevine production in the Carpathian Basin, including the territory of present Hungary, as a consequence of the huge and fatal Phylloxera epidemic. Cultivars grown for centuries till that time in the Carpathian Basin were excluded from the production because of their Phylloxera sensitivity. The structure of cultivars have been changed: new Phylloxera resistant rootstocks were applied, the number of cultivars were decreased. Thanks to Márton Németh's activity the ancient cultivars of the Carpathian Basin have not disappeared, he collected and systematized these cultivars, founding the gene bank of Research Institute for Viticulture and Enology, Pécs.

The grapevine cultivar collection of Hungary is, consisting of about one hundred cultivars indigenous in the Carpathian Basin.

Our objective is to set up a new system applicable for characterization of these cultivars, which can be

- basic breeding material,
- genetic source,
- still registered cultivars.

Based on international results we are looking for molecular microsatellite primers on 96 cultivars

Microsatellite analyses (even distribution throughout the nuclear genome, high polymorphism, frequent occurrence, co-dominant inheritance, reproducibility (Lefort and Roubetakis-Angelakis, Greek Vitis Database, Thomas et al., 1993, Cipriani et al., 1994, Sefc et al., 1998b, 1999, Di Gasparo et al., 2000, Meredith, 2001).

Coordination of analyses and results: GENRES CT96 No 81 EU project (Dettweiler and This, 2000) based on multilocal examinations

Plant material: Fresh young leaves of cultivars

DNA isolation: DNA was isolated with DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

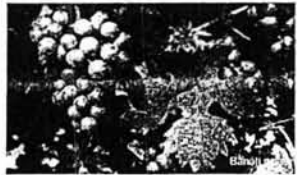
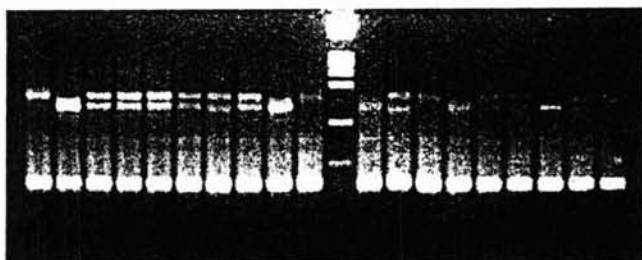
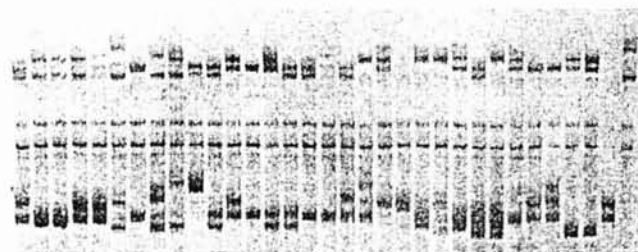
DNA analysis: Microsatellite primers: scu10v, VVMD5, VVMD21, VVMD36, VrZag64, VrZag79 (Dettweiler and This, 2000, Greek Vitis Database).

DNA amplification: Microsatellite reactions were performed in a volume of 10 µl in a Bio-Rad iCycler thermal cycler.

Microsatellite fragments were separated on 4 % Metaphor agarose (TAE buffer), or on 5 % polyacrylamide gel and used ALF Express (Pharmacia)

Microsatellite fingerprint of cultivars 1-32 (lower row), 33-63 (upper row) from the 96 cultivars with VVMD21 primer on 5 % polyacrylamide gel.

In case the existing allele size differences are between 137-197 bp (VrZag64) separation on Metaphor gel provided sufficient resolution of the fragments, so that some of the cultivars could be differentiated from each other



Result of ALF express (Pharmacia) with scu10 primer

1. 206-212	14. 217	28. 206-217	41. 205-211	55. 207-212	72. 194-207	82. 194-207
2. 206	15. 206-209	29. 206-212	43. 206-211	56. 206	69. 191-198	84. 191-198
4. 206-212	16. 206-212	30. 212	45. 206-211	57. 206-212	71. 196-203	87. 198-204
5. 206-212	17. 212-217	31. 212	46. 196-205	58. 206-212	73. 196	88. 198-204
6. 206-212	18. 206-211	32. 209-211	47. 196-205	59. 205-208	74. 195-208	89. 200
7. 206-212	19. 214-220	33. 206-212	48. 194-205	60. 195-211	75. 200-206	92. 198-201
8. 206	21. 212-215	34. 194-204	49. 197-206	61. 195-205	76. 200	93. 204
9. 212-218	23. 206	35. 194-204	50. 194-204	62. 206	77. 197-205	94. 195-200
10. 212-215	24. 206-211	37. 204-210	51. 206	65. 198-204	78. 196-200	95. 200-205
11. 212-217	25. 206-217	38. 205-214	52. 194-207	67. 199-209	79. 196-200	96. 197-204
12. 214-220	26. 206	39. 206	53. 198-207	68. 192-198	80. 192-198	97. 204-210
13. 206-209	27. 206	40. 195-206	54. 206	69. 192-198	81. 192-198	

Summary

Microsatellite analyses are being carried out - on the one hand with the primer combinations recommended by the GENRES CT96 No 81 EU project based on multilocal examinations, proving that altogether 6 primer pairs can differentiate the European cultivars at the molecular level on the basis of number and size of alleles. On the other hand other microsatellite primer sequences available from databases (e.g. Greek Database) or from publications are also being tested.

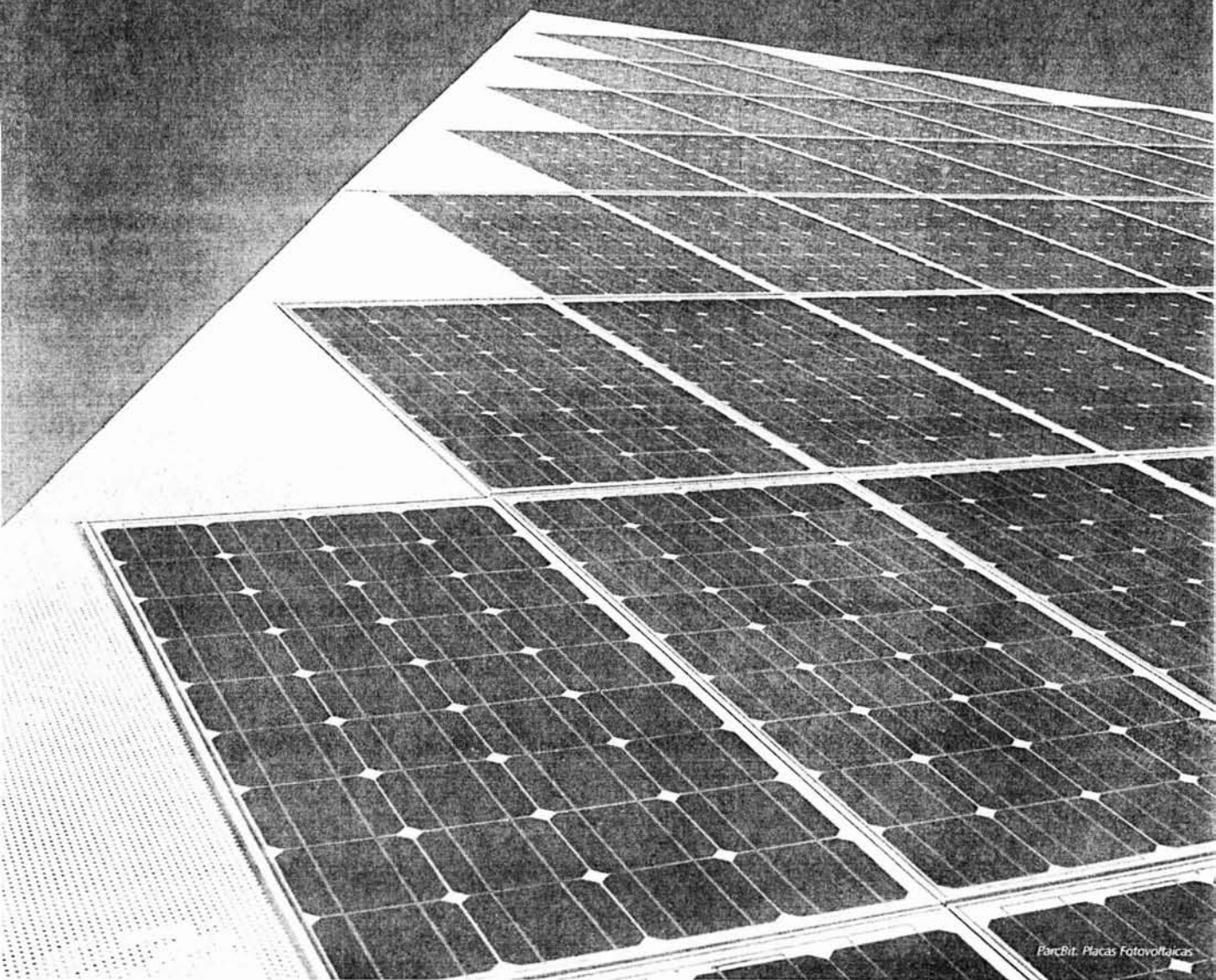
Microsatellite primers including the scu10v, VVMD5, VVMD21, VVMD36, VrZag64, VrZag79 produced amplification products of various number (1-6) in the cultivars autochthonous in the Carpathian Basin.

This research was supported by FVM 128-a/2001, FVM 129-131, FEP380/2000, OTEA TS 040887 Tudományos Iskolai és az OTEA M 36630

Entrevista
Philippe Busquin
Comisario Europeo de
Investigación

Informe
**El sistema español de
Incentivos Fiscales a la
Innovación**

Tecnópolis
**Toda la actualidad de los
parques Científicos y
Tecnológicos españoles**



LA APTE APORTA SU DEFINICIÓN DE

SUMARIO



Parques adscritos a APTechno

Parque Tecnológico de Álava
Parque Tecnológico de Andalucía
Parque Tecnológico de Asturias
Parque Balear de Innovación Tecnológica (PARCBIT)
Parc Científic de Barcelona
Parque Tecnológico de Castilla y León
Parque Tecnológico de Galicia
Parque Científico Tecnológico de Gijón
Parque Tecnológico de San Sebastián
Parque Científico y Tecnológico de Sevilla (Cartuja 93)
Parc Tecnològic del Vallès
Parque Tecnológico de Bizkaia
Leganés Tecnológico
Biocampus. UAB-Campus Científic i Tecnològic
Red de Parques Vascos
València Parc Tecnològic
Parque Científico Tecnológico de Córdoba S.L.
(Rabanales 21)
Parque Tecnológico Walqa
Polo de Innovación Garaia S.A.
Campus de Ciencias de la Salud de Granada
Parque Tecnológico y Logístico de Vigo
Aerópolis. Parque Tecnológico Aeroespacial de Andalucía



apte tecnho Revista de la Asociación de Parques Científicos y Tecnológicos de España

Edita: Asociación de Parques Científicos y Tecnológicos de España (APTE)
Presidente del Consejo Editorial: Felipe Romera Lubias
Director: Francisco Rubiales Moreno
Jefe de Redacción: Manuela Hernández Bermúdez
Director de Publicidad: José Antonio Colón Fraile
Han colaborado en este número: Philippe Busquin, Josep Miquel Piqué, Miguel Ángel Pérez Pérez, Miguel Ángel Robles, Esteban Rubiales y José Miguel Rey
Diseño y producción: Ernesto Sánchez. Diseño y Comunicación.
Traducción: Fco. Javier González Sánchez.
Imprime: Ingrasa, S.A. Depósito Legal: CA-720-02
ISSN: 1696-0661

Sede: Parque Tecnológico de Andalucía. C/ Marie Curie, 35. Campanillas. 29590 Málaga-España.
Telf.: 952 61 91 14. Fax: 952 61 91 17.
e-mail: presidencia@apte.org
Redacción y publicidad: Euromedia Comunicación
Grupo. Avda. Bueno Monreal, Edificio ATS. Bajo, Local A. 41013 Sevilla. Telf.: 95 462 27 27 Fax: 95 462 34 35
e-mail: jacolon@euromediagrup.com

Ilustración cubierta> ParcBit. Placas fotovoltaicas

EDITORIAL 04

Los parques son la clave

EN PORTADA 06

La APTE aporta su definición de Parque Científico y Tecnológico

Proyecto Infobusiness

INFORME 16

El sistema español de Incentivos Fiscales a la Innovación

ENTREVISTAS 10

Philippe Busquin, Comisario Europeo de Investigación

Josep Miquel Piqué, Presidente de la XPCAT

TECNÓPOLIS 26

Toda la actualidad de los parques científicos y tecnológicos españoles

PUNTO DE VISTA 32

La teleformación como oportunidad de futuro

Miguel Ángel Pérez Pérez, Parque Tecnológico de Galicia

EMPRESA INVITADA 36

Grupo NOVASOFT, nacimiento y consolidación de un grupo ligado al PTA

TENDENCIAS 38

EN LA RED 40

CONSULTORÍA 52

QUIÉN ES QUIÉN 64

Empresas TIC en los Parques Científicos y Tecnológicos Españoles



Los parques son la clave

Por Francisco Rubiales

Los expertos coinciden en admitir que en el panorama español, los parques científicos y tecnológicos están llamados a desempeñar un papel muy especial en el desarrollo de la innovación, la ciencia y la tecnología. El papel a desempeñar por los parques en España será más destacado que el asumido por las redes de parques en otros países desarrollados como Estados Unidos, Gran Bretaña, Alemania, o Francia, entre otros. Las razones son muchas, pero destacan tres:

La debilidad general del tejido empresarial en España impide que las empresas privadas desempeñen ese papel determinante que han ejercido en otros países desarrollados como piezas claves del desarrollo de la innovación y la tecnología.

La escasa capacidad de interactuar que tienen las universidades y las empresas españolas, así como la preocupante desconexión entre la investigación y la empresa.

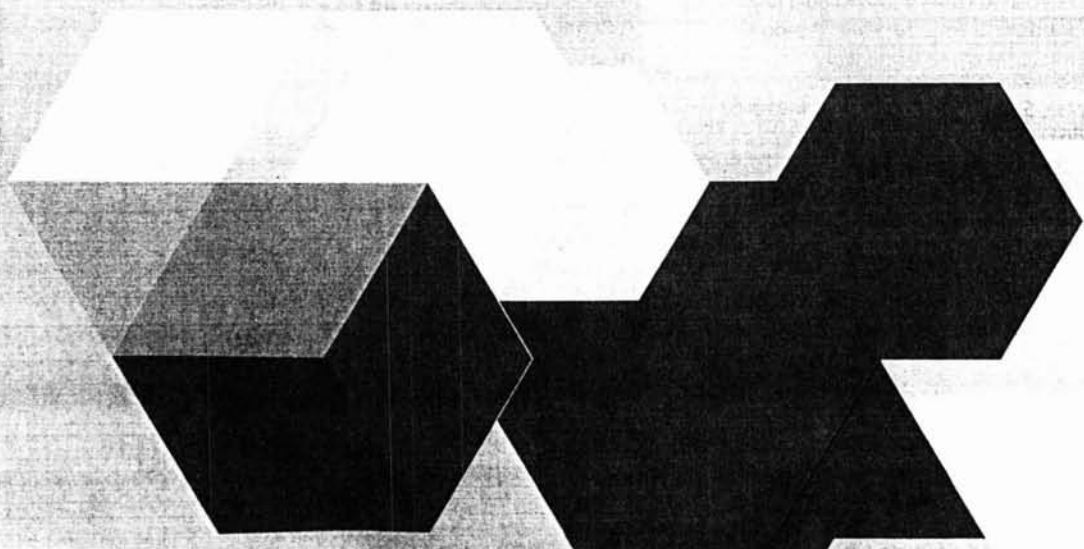
La falta de cohesión y la dispersión característica del Sistema Español de Ciencia y Tecnología.

Ante esas dificultades, a las que se suman otras como la arraigada costumbre española de importar tecnologías foráneas, y la falta de incentivos a la investigación y a sus aplicaciones, los parques científicos y tecnológicos se alzan como los

espacios donde es más posible desarrollar políticas intensivas destinadas a superar nuestros atrasos y carencias.

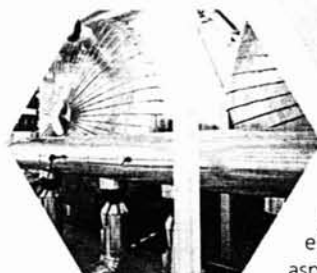
Las administraciones públicas competentes, responsables de diseñar y ejecutar políticas que neutralicen el retraso español y las carencias de nuestra sociedad en materia tecnológica, tienen en los parques un espacio idóneo sobre el que intervenir para estimular el desarrollo de la innovación y la tecnología. En los parques es más fácil conseguir que interactúen las empresas y las universidades. También es más fácil propiciar el diálogo entre científicos, investigadores y empresarios. Los parques son el espacio natural donde están surgiendo nuevas empresas y nuevas tendencias, más sensibles a la innovación, más convencidas de la necesidad de acercarse a la investigación, y más cercanas, en general, a los parámetros vigentes en los países de nuestro entorno.

Lo que queremos concluir es que la política española de innovación y tecnología debe apoyar uno de sus pilares en la red de parques y que nuestros grandes retos tecnológicos deben afrontarse en los parques, que deberán posteriormente actuar como focos difusores para que los avances se extiendan al tejido empresarial y a los centros de formación e investigación.



LA ASOCIACIÓN APTA APORTA SU DEFINICIÓN DE PARQUE CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

**LA ASOCIACIÓN ALCANZA LOS 49 MIEMBROS,
PERTENECIENTES A 15 COMUNIDADES AUTÓNOMAS**



El pasado día 31 de enero, la Asociación de Parques Científicos y Tecnológicos de España (APTE) celebró su primera Asamblea General del año en Las Palmas de Gran Canaria.

Además, de esta forma, la Asociación quiere animar el paso de miembros Asociados a miembros Socios. Para ello, entre los requisitos que el Parque aspirante a socio debe cumplir están:

En esta Asamblea, la APTE quiso definir claramente qué se entiende por Parque Científico y Tecnológico, ya que, debido al *boom* que se está produciendo en estos momentos en la creación de Parques, se deben fijar las características que diferencian a un Parque Científico y Tecnológico de otro emplazamiento empresarial.

Para ello, la Asociación ha elaborado la siguiente definición:

"Se trata de un proyecto, generalmente asociado a un espacio físico, que:

1º) Mantiene relaciones formales y operativas con las universidades, centros de investigación y otras instituciones de educación superior.

2º) Está diseñado para alentar la formación y el crecimiento de empresas basadas en el conocimiento y de otras organizaciones de alto valor añadido pertenecientes al sector terciario, normalmente residentes en el propio Parque.

3º) Posee un organismo estable de gestión que impulsa la transferencia de tecnología y fomenta la innovación entre las empresas y organizaciones usuarias del Parque.

- > Poseer un suelo apto para su ocupación y al menos un edificio que dote al Parque de servicios comunes.
- > Disponibilidad de infraestructuras de apoyo a la innovación.
- > Tener relaciones con la universidad, institutos de investigación, etc..
- > Contar con un organismo estable de gestión que impulsa la transferencia de tecnología.
- > Acreditar la presencia de empresas innovadoras y otras instituciones relacionadas implantadas en el Parque.

Por otro lado, durante el transcurso de la Asamblea, la Asociación dio la bienvenida a tres nuevos miembros asociados: el Parque Tecnológico de Telde, la Ciudad Politécnica de la Innovación, y Móstoles Tecnológico.

El Parque Tecnológico de Telde se construirá sobre una superficie de 200.000 m² en el Lomo Silva (Telde). En él se ubicarán empresas de tecnologías avanzadas, empresas de investigación y desarrollo, empresas de servicios y tratamiento de la información, institutos tecnológicos, facultades y centros universitarios de telecomunicaciones y tecnologías. Además, el Parque contará con una amplia gama de servicios como hostelería, restauración, servicios comerciales e instalaciones deportivas.





La Asociación de Parques Científicos y Tecnológicos de España (APTE) fue creada en 1988 por los gerentes de los seis primeros Parques Científicos y Tecnológicos que se estaban desarrollando en esos momentos en España. Sus miembros se dividen en socios y asociados. Los socios son los parques científicos y tecnológicos ya constituidos y los asociados pueden ser organizaciones cuyos objetivos estén de acuerdo con los fines de la Asociación, aunque su desarrollo se encuentre en vías de proyecto o planificación, además de aquellas entidades y personas físicas o jurídicas, públicas o privadas,

HACIA UN NUEVO MODELO DE PARQUE

que acrediten un especial interés en la promoción y desarrollo de Parques Científicos y Tecnológicos, y en la transferencia de tecnología entre el mundo del conocimiento y la empresa. En estos momentos, se asiste a un proceso vertiginoso de creación de parques científicos y tecnológicos vinculados, en gran parte, a las universidades y a la iniciativa privada, y en los que el Gobierno Central y las Comunidades Autónomas apoyan con distintos programas su desarrollo. En este sentido, también es una nueva tendencia la creación de parques vinculados a los ayuntamientos.



Según sus promotores, la Ciudad Politécnica de la Innovación es un proyecto rentable social y académicamente. La CPI se desarrollará sobre un espacio físico de alrededor de 140.000 m², con más de 100.000 m² construidos dentro del Campus de la Universidad Politécnica de Valencia. Tendrá un espacio propio para la incubación de empresas de base tecnológica y para la instalación de departamentos de I+D de empresas.

La APTE ha querido definir claramente qué es un Parque Científico y Tecnológico para diferenciarlo de otro emplazamiento empresarial



Por último, Móstoles Tecnológico se situará en el área metropolitana de Madrid, a unos 16 kilómetros de la capital. Está promovido mediante "Consortio Urbanístico" para su desarrollo y puesta en marcha y constituido por el Instituto Madrileño de Desarrollo (IMADE), que aportará la experiencia en el desarrollo de otros parques tecnológicos; el Ayuntamiento de Móstoles, que aportará el conocimiento directo del tejido productivo; y la Universidad Rey Juan Carlos, que proporciona el compromiso con la innovación y el desarrollo económico. La inversión aproximada será de 50 millones de euros y el objetivo es de facilitar las implantaciones empresariales, centros tec-

nológicos y empresas incubadoras (spin-off) a finales de 2004.

Con estos 3 nuevos miembros, la APTE reúne ya 49 socios pertenecientes a 15 comunidades autónomas diferentes.



EN PORTADA

EL PROYECTO INFOBUSINESS CREA 36 NUEVAS EMPRESAS DE LA SOCIEDAD DE LA INFORMACIÓN DURANTE 2002

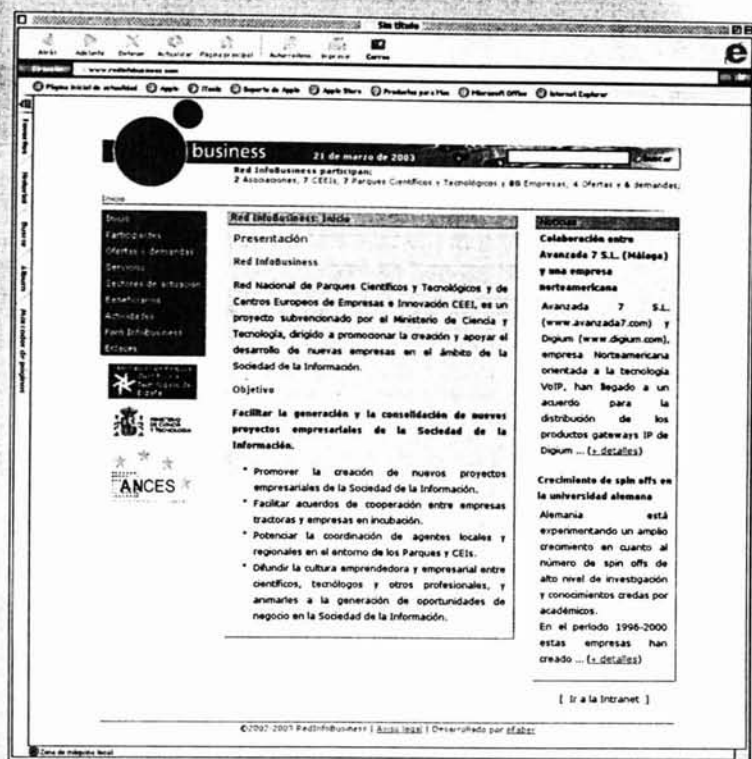
redinfo business

El proyecto Infobusiness, nacido en 2001 y desarrollado entre la APTe y la Asociación Nacional de CEEIS Españoles (ANCES), concluyó en 2002 con un balance más que positivo. Así, durante ese año, Infobusiness permitió la creación de 36 nuevas empresas de la Sociedad de la Información. Además, dentro del programa se ha creado una página web o portal para facilitar la información en red entre los integrantes del proyecto.

En esta página web www.redinfobusiness.com se han habilitado una Intranet y una Extranet. El objetivo no es otro que fomentar las relaciones

entre las empresas a fin de generar nuevos negocios relacionados con la Sociedad de la Información.

Dentro de las actividades realizadas durante 2002 en el marco del proyecto destaca también la I Jornada de la Sociedad de la Información, que se celebró bajo el título "Creación y Desarrollo de Empresas de la Sociedad de la Información desde los Parques Científicos y Tecnológicos y los Centros Europeos de Empresas e Innovación CEEI". El evento tuvo lugar el pasado 11 de diciembre en el Salón de Palacio del Ministerio de Ciencia y



www.redinfobusiness.com

Tecnología y contó con la presencia de ponentes como Fernando Aguirre (Director de Márketing y Ventas de OWASIS), Jacinto Canales (Director de División, Dpto. Telec. TECSIDEL), José Rando Romero (Socio Fundador del Centro de Teleservicios de Galicia), Mario Reyes de los Mozos (Administrador general de SystemCap) y Jesús Campos (NetMCPtechnology S.A.).

Para el 2003, el objetivo de los promotores de Infobusiness es promover y apoyar la creación de 30 nuevos proyectos empresariales de la Sociedad de la Información y difundir la cultura

emprendedora y empresarial entre científicos, tecnólogos y otros profesionales, y animarlos a la generación de oportunidades de negocio en la Sociedad de la Información. Para lograrlo, el pasado día 20 de febrero tuvo ya lugar en el PTA el primer desayuno tecnológico de Infobusiness del año. En esta reunión, a la que acudió una representación de grandes empresas del parque y de empresas que se encuentran en fase de incubación, se presentó la página web del proyecto, presentación que se llevará a cabo en cada una de las sedes de los socios de Infobusiness.

"LOS GOBIERNOS DE LA UE SE HAN COMPROMETIDO A CONVERTIR EUROPA EN LA ECONOMÍA BASADA EN EL CONOCIMIENTO MÁS COMPETITIVA Y DINÁMICA DEL MUNDO EN LA PRÓXIMA DÉCADA"

Por Manuela Hernández

La iniciativa e-EUROPE pone a los gobiernos a trabajar en el desarrollo de la Sociedad de la Información. Más administración electrónica, más sanidad electrónica, más educación electrónica para estimular el uso de las TIC. ¿Cómo está haciendo sus deberes en este sentido el Gobierno español? La iniciativa e-Europe es parte de un escenario más amplio y ambicioso: la creación en Europa de la sociedad basada en el conocimiento. Europa se ha propuesto convertirse en la economía basada en el conocimiento más competitiva y dinámica del mundo para el año 2010. Todos los gobiernos están comprometidos con este objetivo a través de la declaración conjunta de Jefes de Estado y Gobiernos acordada en Lisboa en marzo de 2000. Por razones obvias, los medios y formas de alcanzar estos objetivos pueden variar de un país a otro. Lo que cuenta es la orientación y ambición globales, y un compromiso político total que ahora no tenemos.

En España estamos todavía lejos de la media europea y no digamos de la de EEUU respecto a la distribución

de la inversión en I+D entre el sector público y privado. España está poniéndose al día rápidamente en inversiones en investigación, tanto pública como privadas. Toda Europa —con la excepción de los Países Nórdicos— va a la zaga de EEUU en la inversión empresarial en investigación. Europa, EEUU y Japón invierten básicamente la misma proporción de su P.I.B. en investigación pública. Las cifras de inversiones públicas en investigación son comparables: 0'83 % del P.I.B. en la U.E., 0'88 % en EEUU y 0'81 % en Japón. Pero donde encontramos un salto es en las inversiones privadas en investigación, inversiones de empresas en I+D. Las cifras son respectivamente 1'09 % del P.I.B. en la U.E., 1'78 % en EEUU y un enorme 2'12 % en Japón. Y este salto se incrementa entre la U.E. y sus socios comerciales. La situación en España es mixta. La conclusión es ineludible: Europa debe movilizarse categóricamente para aumentar rápidamente la inversión empresarial de manera general.

¿Y qué propone usted para invertir esa tendencia? Por supuesto, no es algo que vaya a ocurrir por arte de

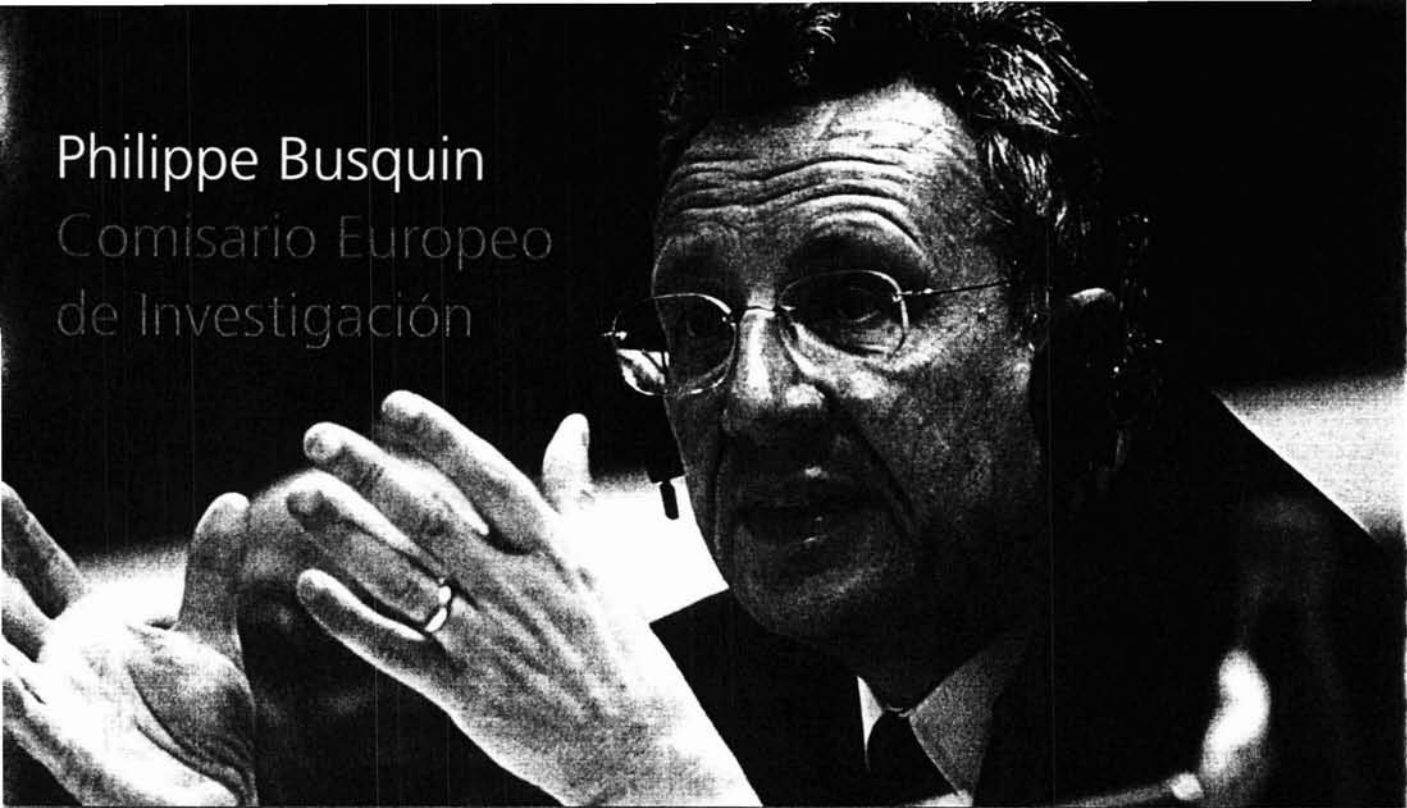
magia. Debemos crear las condiciones estructurales adecuadas para que las empresas aumenten decididamente su gasto en I+D. En lo que a la situación específica de España concierne, vuelvo a insistir en que España está poniéndose progresivamente al día. Tiene el cuarto índice más bajo de Europa en inversión empresarial en investigación, pero también el cuarto índice de crecimiento más alto en esta área. Estoy seguro de que las autoridades nacionales son perfectamente conscientes de los problemas a los que se están enfrentando a nivel nacional y son también conscientes de las adaptaciones que hay que diseñar y llevar a cabo pronto para responder a los retos a los que nos enfrentamos.

Mirado desde una perspectiva europea general, tenemos que admitir que, en mayor o menor grado, todos los Estados Miembros sufren las mismas dificultades estructurales, en respuesta a lo cual hay que desarrollar y llevar a cabo un paquete completo de medidas para remediar las dificultades existentes. Estas medidas incluyen incentivos fiscales para inversores que inviertan en investigación e innovación; la promoción de vínculos

de política de I+D de los gobiernos europeos. La austeridad presupuestaria que impone el Pacto de Estabilidad de la U.E. No olvidemos que el verdadero nombre de este pacto es el de Pacto de Estabilidad y Crecimiento. Este pacto es una importante salvaguarda pero no es un rígido collar de fuerza. La Comisión ha propuesto una flexibilidad limitada bajo ciertas circunstancias. En mi opinión, ésta debería cubrir también inversiones en

Philippe Busquin

Comisario Europeo de Investigación



¿A quién le corresponde fomentar la cultura de la innovación? No hay un único actor, servicio u organización que se pudiera declarar "responsable" de la innovación. Es una responsabilidad colectiva y común de todas las autoridades públicas, de los empresarios, de instituciones financieras y de capitalistas de riesgo, tanto como de los "productores" de conocimiento científico y de procesos tecnológicos.

más cercanos entre investigación, el mundo de la industria y la empresa; la promoción de una mayor movilidad de personal de un sector a otro. También significa reducir el papeleo y dismantelar barreras burocráticas, que son obstáculos actuales a la innovación en los productos y los procesos y acelerar y reestructurar el proceso de patentar mediante la creación de una Patente Europea.

En la evidente desconexión que existe en Europa entre el sistema científico-tecnológico y el sistema productivo, ¿qué parte de culpa corresponde a la Universidad y qué parte a las empresas? No comparto su visión de que no existen vínculos entre universidad e industria. Sin embargo, estoy de acuerdo en que hay que desarrollarlos y promocionarlos. Ambas partes tienen que asumir el reto y adaptar sus respectivos comportamientos y actitudes a los requerimientos de un mundo cambiante. Las personas que trabajan en la universidad deben dejar de considerar el mundo de la industria y la empresa como algo, de algún modo, "sucio". Deben dejar de llevar a cabo su investigación con el sólo propósito de

publicar sus artículos en prestigiosas revistas científicas e impresionar a sus colegas. La industria, por otra parte, debe reconocer que la ciencia y la investigación llevadas a cabo en las universidades rara vez producirán beneficios. Deben reconocer de manera decisiva que las universidades son los proveedores esenciales de prácticas para las generaciones más jóvenes y, en particular, de las destrezas necesarias para la economía basada en el conocimiento. Sin recursos humanos bien entrenados y ampliamente cualificados la industria y la empresa no llegarán a ninguna parte. Este papel de las universidades debe ser reconocido. Ésta es una de las razones por las que la Comisión Europea publicó un comunicado de suma importancia relativo a "El Papel de las universidades en la Europa del Conocimiento".

¿Qué papel le corresponde jugar a la Universidad en el desarrollo tecnológico de un país? Puedo referirme a lo que dije en respuesta a la pregunta previa y me gustaría subrayar tres aspectos principales. Primero: las universidades juegan un papel vital en relación con el entrenamiento de una parte

sustancial de la generación más joven, preparándola para la vida y para sus respectivas actividades profesionales. La ecuación es simple: sin gente bien entrenada no hay progreso tecnológico. Segundo: aunque muchos académicos se quejan de la dura carga de trabajo resultante de enseñar a un número creciente de estudiantes, dejando cada vez menos tiempo para las actividades de investigación, es verdad que las universidades siguen siendo lugares para la investigación de alto nivel y para la producción de nuevo conocimiento, para la creación de una base sólida para la futura sociedad fundada en el conocimiento. Tercero: las universidades son factores esenciales para el desarrollo regional. Conocemos muchos ejemplos, en un gran número de Estados Miembros, y en otros países, donde la creación, refuerzo o nueva orientación de las universidades han tenido un impacto decisivo en el desarrollo de las ciudades y regiones enteras en términos de innovación industrial, creación de nuevas empresas, creación de empleo, etc. Le hablo del fructífero modelo de "racimos", donde las universidades y compañías innovadoras en alta tecnología se

investigación y conocimiento. Sin embargo, me gustaría resaltar que la responsabilidad pública con respecto a la financiación de I+D debería estar orientada hacia la creación de las adecuadas condiciones estructurales y de incentivos y la definición de orientaciones, de modo que las inversiones privadas puedan sucederle inmediatamente después.



desarrollan en simbiosis, alimentándose de la misma fuente de talento y conocimiento y compartiendo el mismo impulso hacia la excelencia. En resumen, las universidades son componentes esenciales de nuestras sociedades – no sólo como infraestructuras académicas y humanas esenciales sino también como impulsores básicos de la competitividad económica.

Y la ciencia, ¿a quién corresponde divulgarla?, ¿a los periodistas o a los científicos? Es una pregunta importante e interesante. Estoy profundamente convencido de que sin una inversión sustancial en una mejor comunicación científica, la ciencia tendrá un futuro muy difícil en nuestras sociedades. La ciencia es hoy en día una parte tan importante de nuestra vida diaria que debemos asegurarnos de que nuestros ciudadanos tengan una visión positiva de la misma, de las actividades científicas y de los desarrollos tecnológicos. Lamentablemente, hay que decir que, en este momento, la ciencia no tiene una imagen pública especialmente positiva: la clonación humana, la investigación con células madre, órganos modificados genéticamente, la enfermedad de las vacas locas, etc., son algunos de los términos de moda que han producido las inquietudes y temores de muchos de nuestros ciudadanos que temen a los desarrollos científicos y las tendencias tecnológicas.

¿Cuál es entonces el papel de los medios? El papel de los medios de comunicación como “traductores” y multiplicadores de información es más

“Estoy profundamente convencido de que sin una inversión sustancial en una mejor comunicación científica, la ciencia tendrá un futuro muy difícil en nuestras sociedades”

importante que nunca. Nos enfrentamos a un doble reto: los científicos deben familiarizarse con los medios de comunicación, cómo utilizarlos con los mejores propósitos. Esto ya está ocurriendo en toda Europa en la medida en que la práctica en comunicación se está convirtiendo en parte del currículo universitario de los científicos. Y, además, se está convirtiendo progresivamente en una necesidad, puesto que los científicos tienen que justificar sus presupuestos, buscar patrocinadores, convencer a la industria y ganarse el apoyo público, más allá del de sus colegas.

Por el contrario, los periodistas “generales”, que cada vez cubren más y más crónicas científicas, tienen que aprender sobre ciencia. Ésta es progresivamente más compleja y complicada, cada vez

más especializada e interdisciplinaria. Por tanto, los periodistas tendrán que invertir un tiempo y energía sustanciales en “captar” y entender la información científica de interés periodístico, escribirla y presentarla de una manera que sea comprensible pero, a su vez, correcta científicamente.

Lamentablemente, la posición de los escritores e informadores de ciencia en los medios de comunicación generales no siempre es favorable. Un número considerable de medios de comunicación ha reducido su sección sobre ciencia, básicamente por razones comerciales. A menudo, temas científicos delicados son tratados por estos corresponsales “generales” de forma sensacionalista. Todo esto significa que tenemos que trabajar seriamente con todos las partes implicadas, científicos, periodistas y editores, para asegurar que la cantidad y la calidad de la información sobre ciencia estén donde deberían estar, de modo que reflejen con exactitud el papel que la ciencia, la investigación, el desarrollo tecnológico y la innovación juegan en nuestras sociedades. No será ésta una tarea fácil pero debemos abordarla urgentemente.

¿Por qué informan tan poco los periódicos de ciencia y tanto de política o de deporte? ¿es posible que la ciencia interese poco a los ciudadanos? No puedo darle una respuesta razonable a la primera parte de su pregunta. De hecho, mi percepción de la ciencia y la investigación es que son temas fascinantes y, a menudo, emocionantes que se podrían presentar de tal

¿Cómo se ve desde Europa, en general, la política de I+D del Gobierno Español? Permítame decirle, en primer lugar, que España está mostrando uno de los índices de crecimiento más rápidos en inversión para el desarrollo de Europa. La media de crecimiento anual real de las inversiones en desarrollo desde 1995 ha alcanzado cerca del 7 % anual. Esto supone casi dos veces el crecimiento medio de la Unión Europea, y coloca a España cerca del primer puesto en esta categoría. Igualmente, España se encuentra en segunda posición entre los 15 Estados miembros en cuanto a cre-

¿Qué papel se otorga en Europa a los parques científicos y tecnológicos como espacios de transferencia de resultados de I+D como espacios para la innovación y comunicación? A veces, del desarrollo regional. No hay duda: los parques científicos y tecnológicos han jugado y jugarán un papel crucial. Todos sabemos que prácticamente en todos los Estados Miembros de la U.E. y más allá hay ejemplos excelentes de cómo este modelo puede funcionar para beneficio de todos. No debemos olvidar, sin embargo, que los parques científicos y tecnológicos no se deben ver como la cura a todas nuestras dificultades y retos.

Es más, no sólo los parques científicos y tecnológicos desarrollan interesantes conceptos y aproximaciones orientadas al futuro. Sé, por mis múltiples visitas a grandes y pequeñas compañías, que se pueden desarrollar y llevar a cabo con éxito conceptos similares a éstos dentro de compañías individuales. Tales compañías son a menudo capaces de mejorar sustancialmente su comportamiento tecnológico y empresarial. Debo decir también que incluso en muchas universidades —en particular aquellas con facultades de ingeniería y tecnología de peso— ha cambiado drásticamente la forma de ver y hacer las cosas. La industria y el mundo empresarial no son ya considerados como los “enemigos naturales” de la investigación académica. Ciertamente, muchos parques científicos y tecnológicos no son más que una aglomeración de institutos universitarios y compañías concebidas por personal universitario. Pero en conjunto, el sistema de parques es muy positivo.

manera que los lectores de los periódicos desearan leer esta sección, quizás no antes, pero ciertamente justo después de leer los deportes u otra sección de entretenimiento cualquiera. La razón de este relativo lugar secundario de las secciones científicas en los periódicos, las revistas y los programas de televisión es algo que sólo los editores de estos medios de comunicación podrán explicar.

En lo que se refiere a la segunda parte de su pregunta, estoy bastante seguro de que los ciudadanos están verdaderamente interesados en la ciencia y en temas científicos y que nuestro reto es y será empaquetar y presentar la ciencia, la investigación y la tecnología de tal forma que el ciudadano acceda a la esencia de la información. La ciencia en televisión presenta un reto particular. Discrepo de quienes afirman que “no hay ciencia en televisión”. De hecho, en muchos países (Reino Unido, Alemania, Francia) la ciencia está ampliamente presente tanto en la televisión pública como en la privada, alcanzando a veces notables índices de audiencia. Pero esto no puede aplicarse al resto de Europa. En un buen número de Estados Miembros no hay lugar para la ciencia en la pantalla. Además, cada año en Europa se producen un número considerable de horas de nuevos programas científicos que desgraciadamente no se exportan debidamente. Este fenómeno no es exclusivo de los programas científicos, sino que también afecta a la mayoría de los productos audiovisuales de Europa.

¿Y cuáles son sus retos, en este sentido? ¿Dónde está la solución? En



“Soy un firme creyente del potencial científico de Europa y sigo convencido de que Europa es capaz de competir con todas las demás regiones del mundo”

primer lugar, se hace necesario encontrar buenas historias: éstas abundan en Europa con carismáticos científicos y descubridores, muchos de los cuales son maestros comunicadores. Luego, hay que escribir, desarrollar y, a continuación, producir estas películas. La UE está proporcionando un apoyo sustancial para escribir y desarrollar programas de ciencia a través de su programa Media Plus y su Plan de Acción Ciencia y Sociedad. Al final, hay que difundir estos documentales. Aquí de nuevo la situación en Europa varía considerablemente y encontramos que muchas emisoras han comprendido el interés de proporcionar a la ciencia la cobertura que merece, obteniendo así excelentes audiencias en el proceso.

Por último, los documentales deben tener una audiencia. Las recetas para el éxito son difíciles, pero es posible hacer películas sobre ciencia que sean a la vez científicamente precisas y eminentemente disfrutables. Y a medida que la ciencia cobra importancia en Europa, así lo hace también en televisión. Estoy convencido de que veré mayores esfuerzos entre profesionales, especialmente entre productores de películas científicas para difundirlos por toda Europa, compartir proyectos, experiencia en imágenes y mejores prácticas.

¿Qué nivel diría Ud. que tiene Europa en ciencia, por un lado, y en cultura científica, por otro? Soy un firme creyente del potencial científico de Europa y sigo convencido de que Europa es capaz de competir con todas las demás regiones del mundo, siempre

cimiento anual de su presupuesto público para I+D (Investigación y Desarrollo), con un aumento medio del 11'30 % anual desde 1995. Esto último es extraordinario. Puedo decir también con confianza que España lo está haciendo extremadamente bien en nuestros diversos programas de investigación. Estoy igualmente encantado con el firme compromiso de España de trabajar hacia nuestra meta común del 3% del P.I.B. dedicado a I+D, especialmente a través del Plan Nacional de Investigación, Desarrollo e Innovación Tecnológica para el período 2004-2007.

que superemos los obstáculos de nuestro propio pasado, como la fragmentación de los esfuerzos en investigación, una insuficiente movilidad de investigadores entre países y sectores, niveles insuficientes de cooperación entre equipos y entre la universidad y la industria, niveles insuficientes de inversión en investigación y desarrollo tecnológico, etc.

De hecho, si observamos la cifra, la UE es con diferencia el líder mundial en número de publicaciones científicas, con más de 300.000 publicaciones en 2001, muy por delante de los EEUU y Japón. Sin embargo, las proporciones se invierten si miramos el número de patentes registradas por los investigadores de la UE. Incluso en Europa, hoy en día se registran bastantes más patentes por parte de entidades japonesas y norteamericanas que por entidades europeas. Este es el clásico dilema al que se enfrenta Europa: lo hacemos bien en investigación pero la innovación y la comercialización no siempre le siguen como deberían. No obstante, se ha identificado claramente estos problemas y se está poniendo remedio.

La cuestión que concierne a la "cultura científica" de Europa es muy difícil y admite diferentes interpretaciones. Permítame decir dos cosas. Primero: la cul-

tura científica de Europa se encuentra ciertamente en su infancia. Europa es un actor relativamente nuevo en la escena científica y tengo que admitir que el papel que juega en este dominio es poco conocido -incluso en aquellos círculos que deberían estar directamente interesados porque les concierne directamente. Segundo: si miramos la "cultura científica" de Europa como suma de culturas científicas nacionales, la situación tampoco impresiona. La ciencia y la cultura están más o menos separadas estrictamente -en la mente de la gente tanto como en los medios de comunicación, en la política y otros campos. Y, sin embargo, deberíamos percatarnos de que la ciencia tiene su historia, su filosofía y, por muchas razones, está en las raíces mismas de la manera en que nuestro continente se ha desarrollado y se desarrollará en el futuro. Este futuro desarrollo requiere inevitablemente la dimensión europea, requiere avanzar más hacia visiones y perspectivas comunes para la investigación en Europa. Y es en ello en lo que estoy trabajando.

¿Qué lectura tiene que la mayor potencia científica del mundo, EEUU, sea también la mayor potencia tecnológica? Implica simplemente que un alto nivel de investigación es esencial para la innovación, para el creci-

miento económico, para el empleo, pero también para solventar problemas sociales, para la apertura de perspectivas y para el bienestar de los individuos. En comparación con Europa, EEUU ha gozado de la gran ventaja de haber sido una nación y un mercado desde los mismos inicios del desarrollo de la ciencia y la industria moderna. Tendremos éxito al construir esta dimensión europea, como hemos creado con éxito el mercado único, la moneda europea y la ampliación de la UE hacia el este y el sur.

Como ya le he comentado, en Lisboa, los jefes de Estado y de Gobierno europeos se han comprometido con una nueva meta estratégica para Europa: "convertirse en la economía basada en el conocimiento más competitiva y dinámica del mundo en la próxima década". Alcanzar este objetivo requiere una estrategia global encaminada a preparar la transición hacia una economía basada en el conocimiento. El concepto I+D está en el centro de esta estrategia. El progreso no es tan rápido como desearíamos, pero es firme, y no me cabe la menor duda de que nuestro rendimiento científico, que ya es impresionante, y nuestro potencial económico, nos llevarán en el futuro a la cumbre del ranking mundial de regiones y naciones que compiten pacíficamente por una posición destacada.

El Gobierno español ha apostado por un sistema de incentivos fiscales a la innovación que, según nuestro Ministro de Ciencia y Tecnología, Josep Piqué, es el mejor de toda Europa. ¿Qué piensa Ud. al respecto?

El sistema de incentivos fiscales puesto en marcha en España parece, efectivamente, estar funcionando muy bien. Incentivos similares en favor de la investigación están también siendo utilizados, con efectos positivos, por un número de Estados Miembros (Países Bajos, Reino Unido, Bélgica, etc.). Estos incentivos suponen un primer paso fundamental, pero sé - y el Ministro Piqué también lo sabe - que estos incentivos fiscales no son suficientes. Hay que desarrollar otros elementos y añadirlos a otros proyectos y medidas existentes, y sé que el Ministro Piqué comparte esta apreciación. Esta es una de las razones por las que el Gobierno español está muy comprometido con nuestras iniciativas y



objetivos, los cuales están diseñados para dar visión y perspectiva a iniciativas nacionales y -al mismo tiempo- proporcionar apoyo político si se necesita y cuando se necesite. En

todas estas áreas, la U.E puede ayudar, en particular ofreciendo oportunidades para políticas nacionales de referencia, los mejores análisis de práctica y mejoras en la eficiencia.

INCENTIVOS FISCALES A LA INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA

Juan Manuel González Camúñez
Ernst&Young Abogados



16

La deducción fiscal por actividades de I+D e innovación tecnológica ha calado en la sensibilidad de las empresas españolas.

La base de la deducción por actividades de innovación tecnológica se minorará en el 65% de las subvenciones recibidas para fomento de dichas actividades e imputables como ingreso en el periodo impositivo.

El presente informe tiene por objeto exponer la regulación fiscal de la deducción en la cuota íntegra del Impuesto sobre Sociedades (en adelante, IS) a que tienen derecho las entidades que realicen actividades de investigación y desarrollo (en adelante, I+D) y de innovación tecnológica.

En este sentido, el legislador español se ha preocupado por incentivar a través de beneficios fiscales a aquellas empresas que inviertan en investigación y desarrollo e innovación tecnológica. La regulación de este incentivo fiscal se ha materializado en el artículo 33 de la Ley del Impuesto sobre Sociedades, en el Capítulo dedicado a "incentivos por la realización de determinadas actividades" en los términos que se expondrán en adelante.

Esta deducción se presumía ambiciosa en términos cuantitativos, admitiendo una deducción fiscal que podría alcanzar hasta el 60% de los gastos en que se hubiese incurrido por la realización de estas actividades, sin embargo, la experiencia profesional nos pone de manifiesto en multitud de ocasiones que, en la práctica, difícilmente resulta de aplicación, debido en gran medida a la dificultad y casuística de su regulación.

En definitiva, hemos observado que la deducción fiscal por actividades de I+D e innovación tecnológica no ha calado en la sensibilidad de las empresas españolas fundamentalmente:

a) Por el desconocimiento de los propios responsables

técnicos de las compañías sobre la calificación de la actividad que vienen desarrollando.

b) La complejidad y restricción de los gastos que podrían incluirse en la base de deducción hace que en ocasiones no resulte operativa la aplicación de la deducción.

c) La dificultad de determinar si un proyecto empresarial determinado tiene la consideración de I+D o de innovación tecnológica.

Cuanto antecede ha sido reconocido por el propio ministro de Ciencia y Tecnología, Josep Piqué, en un reciente artículo publicado en *Expansión*, en el que señalaba su intención de que las empresas españolas aprovechen el marco tributario actual beneficiándose de los incentivos fiscales existentes en la realización de actividades de I+D e innovación tecnológica.

El Sr. ministro manifestaba que el aprovechamiento del marco de deducciones fiscales para las inversiones en I+D e innovación tecnológica por parte de las empresas ha sido insuficiente y que era necesario transferir nuestra capacidad de investigar al mundo de la empresa transformando conocimiento en puntos de crecimiento de PIB.

Entendemos que para que de forma efectiva y eficaz las empresas españolas inviertan en actividades de investigación y desarrollo se hace necesario un plan global de actuación que, además de incentivos fiscales, establezcan un sistema operativo de subvenciones e incluso de deducciones en cuotas de la seguridad social.

1. Normativa aplicable

La deducción por actividades de I+D e innovación tecnológica se encuentra regulada en el artículo 33 de la Ley 43/1995, de 27 de diciembre, del Impuesto sobre Sociedades en su nueva redacción dada por la Ley 24/2001, de 27 de diciembre, de Medidas Fiscales, Administrativas y del Orden Social, que ha modificado la redacción dada por la Ley 55/1999, de 29 de diciembre.

2. Actividades de I+D e innovación tecnológica

2.1. Actividades de I+D

La Ley del IS establece los siguientes conceptos de I+D:

> La investigación es la indagación original y planificada que persigue descubrir nuevos conocimientos y una superior comprensión en el ámbito científico o tecnológico.

> El desarrollo es la aplicación de los resultados de la investigación o de cualquier otro tipo de conocimiento científico para la fabricación de nuevos materiales o productos, para el diseño de nuevos procesos o sistemas de producción, así como para la mejora tecnológica sustancial de materiales, productos, procesos o sistemas preexistentes.

> La I+D comprende también el diseño y elaboración del muestrario para el lanzamiento de nuevos productos y la concepción de software avanzado, siempre que suponga un progreso científico o tecnológico significativo mediante el desarrollo de nuevos teoremas y algoritmos o mediante la creación de sistemas operativos y lenguajes nuevos.

> Innovación tecnológica es la actividad cuyo resultado sea un avance tecnológico en la obtención de nuevos productos o procesos de producción o mejoras sustanciales de los ya existentes.

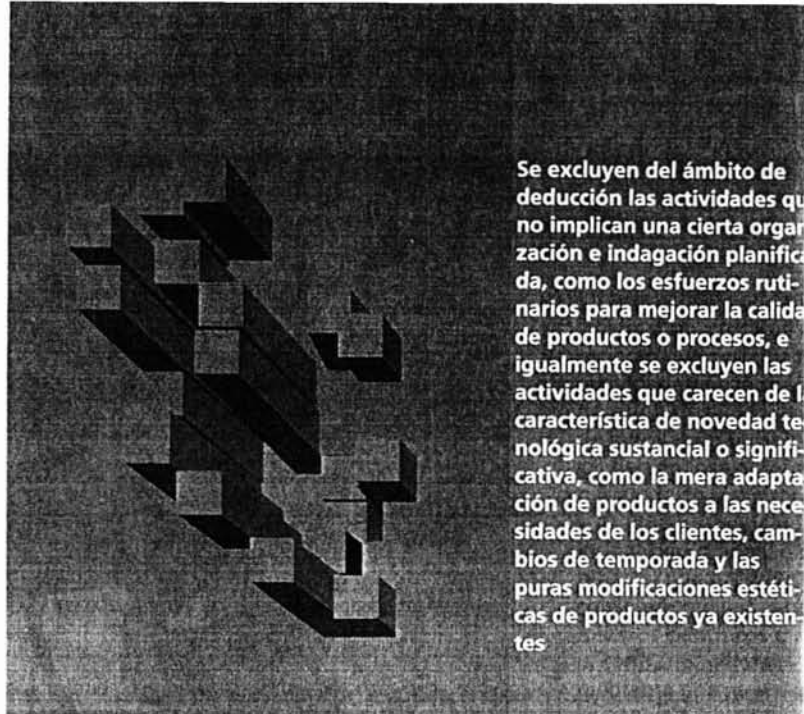
Se considerarán nuevos aquellos productos o procesos cuyas características o aplicaciones, desde el punto de vista tecnológico, difieran sustancialmente de las existentes con anterioridad.

Por tanto, cabe realizar dos precisiones básicas al objeto de entender el alcance de las actividades de I+D que dan derecho a deducción en el IS:

> El desarrollo puede originarse tanto de los resultados obtenidos de la investigación como de los conocimientos científicos externos a este proceso.

> El desarrollo abarca no sólo la obtención de nuevos materiales, productos o procesos, sino que cubre también las mejoras tecnológicas que se efectúen sobre materiales, productos, procesos o sistemas preexistentes, siempre y cuando dicha mejora tenga carácter sustancial.

Se incluye, por tanto, el desarrollo realizado después de la producción comercial.



Se excluyen del ámbito de deducción las actividades que no implican una cierta organización e indagación planificada, como los esfuerzos rutinarios para mejorar la calidad de productos o procesos, e igualmente se excluyen las actividades que carecen de la característica de novedad tecnológica sustancial o significativa, como la mera adaptación de productos a las necesidades de los clientes, cambios de temporada y las puras modificaciones estéticas de productos ya existentes.

2.2. Actividades de innovación tecnológica

El nuevo concepto de innovación tecnológica, conforme se ha expuesto anteriormente, tiene un carácter residual y parece estar pensado para aquella actividad que no va precedida de investigación o que, en sí misma, no supone una novedad científica.

La Ley del IS define los productos o procesos nuevos como aquellos cuyas características o aplicaciones, desde el punto de vista tecnológico difieran sustancialmente de las existentes anteriormente.

Por su parte, aunque no existe una definición unánimemente aceptada podría definirse el producto mejorado sustancialmente como aquel producto existente cuyas prestaciones han sido incrementadas o perfeccionadas significativamente.

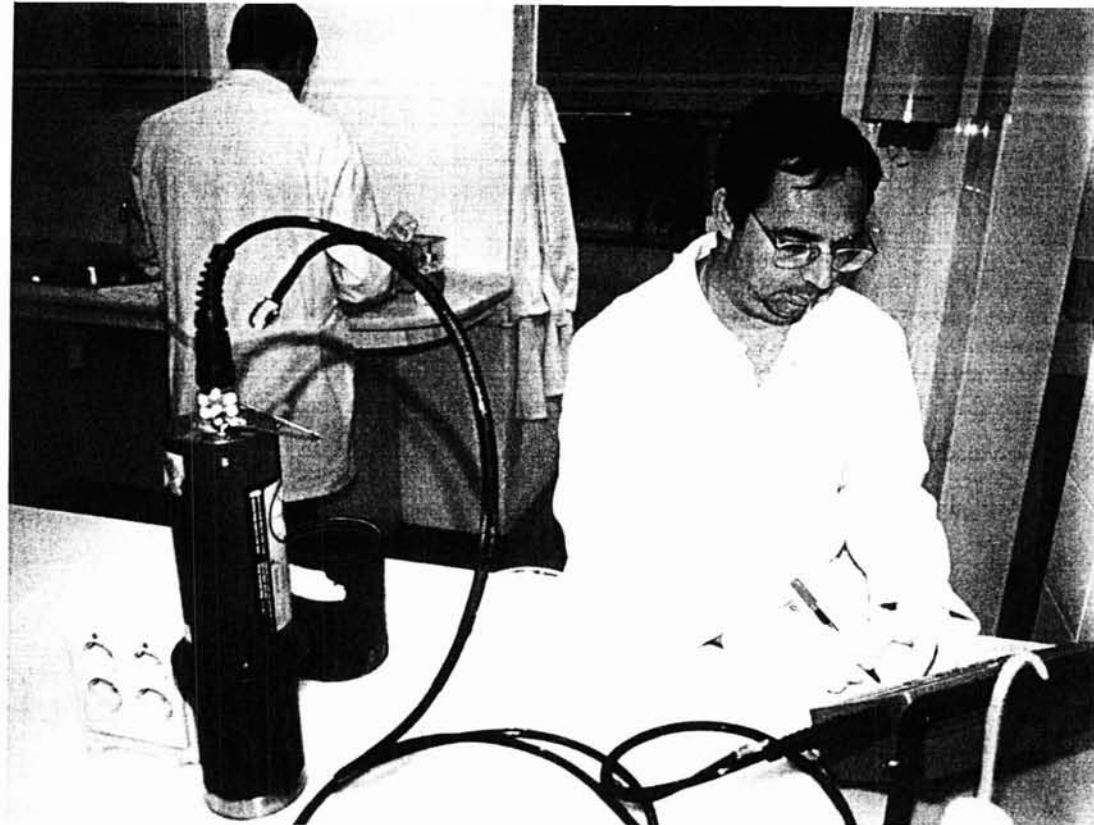
En la práctica podrían existir supuestos que hicieran dudar si una actividad tiene la consideración fiscal de I+D o de innovación tecnológica, debiéndose determinar al efecto si el proceso o producto supone una indagación original o planificada que persigue conseguir nuevos conocimientos científicos o por el contrario mejorar, mediante una nueva aplicación, un proceso ya existente.

Las dudas que se plantean en la práctica han llevado a la Dirección General de Tributos a pronunciarse sobre esta cuestión en varias ocasiones, en las que ha intentado matizar o reforzar los distintos conceptos que intervienen en la posible aplicación de la deducción que estamos analizando.

En este sentido, la Dirección General de Tributos, con fecha 26 de marzo de 2001, resuelve una consulta realizada por un contribuyente, en la que se plantea la posible aplicación de la deducción por I+D a la actividad que viene realizando. La consultante señala que ha desarrollado un sistema de iluminación que permite crear expositoros luminosos de un espesor mínimo, dotándoles de una mayor estética. En su respuesta, la Dirección General de Tributos

Innovación tecnológica es la actividad cuyo resultado sea un avance tecnológico en la obtención de nuevos productos o procesos de producción o mejoras sustanciales de los ya existentes.

Además de los gastos directos, también deberían poder ser incluidos los gastos indirectos en tanto que contribuyen a posibilitar la realización de un proyecto de I+D, siempre que se pruebe su efectiva vinculación al mismo.



considera que la actividad realizada por la consultante no podría beneficiarse de la deducción por I+D, pero en cambio podría beneficiarse de la deducción en concepto de Innovación tecnológica en los siguientes términos:

"El sujeto pasivo ha efectuado un desarrollo propio que le ha permitido la obtención de un producto novedoso en cuanto a su espesor, estética, facilidad de cambio y luminosidad, circunstancias todas que permiten concluir que el resultado final de sus actividades genera un producto cuyas características o aplicaciones difieren sustancialmente de las existentes con anterioridad en los productos propios de la consultante. Ello posibilitaría considerar la actividad desarrollada por la misma como de innovación tecnológica".

En consecuencia, la DGT considera que en el supuesto de que se trate de un producto o proceso nuevo para el sujeto pasivo, aunque sea un producto o proceso ya existente en el mercado, el sujeto pasivo podría aplicarse la deducción por actividades de innovación tecnológica. Por el contrario, si se tratara de un producto o proceso nuevo para el mercado estaríamos ante una actividad de I+D. En cualquier caso, el sujeto pasivo puede plantear consultas a la Administración tributaria, cuya contestación tendrá carácter vinculante, sobre la interpretación y aplicación de la deducción por actividades de I+D e Innovación Tecnológica.

3. Actividades que no tienen la consideración de I+D e innovación tecnológica

De otro lado, conviene precisar que la Ley del Impuesto sobre Sociedades en su artículo 33 no sólo regula aquellas actividades que podrían beneficiarse de la deducción, sino que establece además aquellas actividades que no tienen la consideración de I+D o de innovación tecnológica, y por tanto, no dan derecho a deducción.

En la letra a) de dicho precepto se determina la exclusión de aquellas actividades que no comporten la existencia de una novedad científica o tecnológica significativa, precisando en la letra b) la lógica exclusión de las actividades de producción industrial y provisión de servicios o de distribución de bienes y servicios, ya que las mismas no van encaminadas a la I+D.

En consecuencia, se excluyen del ámbito de deducción las actividades que no implican una cierta organización e indagación planificada, como los esfuerzos rutinarios para mejorar la calidad de productos o procesos, e igualmente se excluyen las actividades que carecen de la característica de novedad tecnológica sustancial o significativa, como la mera adaptación de productos a las necesidades de los clientes, cambios de temporada y las puras modificaciones estéticas de productos ya existentes para diferenciarlos de otros similares.

Es por ello que deben considerarse como actividades que no dan derecho a deducción aquellas que no suponen la búsqueda de nuevos conocimientos tecnológicos ni la aplicación de los resultados de una actividad de investigación, sino que se trata de actividades encaminadas a la producción o fabricación.

4. Base de la deducción

En la determinación de la base de deducción se hace necesario distinguir las actividades de I+D y las actividades de Innovación tecnológica.

4.1. Deducción por I+D

La base de la deducción está constituida por el importe de los gastos de I+D y en su caso, por las inversiones en elementos de inmovilizado material e inmaterial excluidos los inmuebles y terrenos. Este importe se minorará en el 65% de las subvenciones recibidas para

Deben considerarse como actividades que no dan derecho a deducción aquellas que no suponen la búsqueda de nuevos conocimientos tecnológicos ni la aplicación de los resultados de una actividad de investigación.

el fomento de las actividades de I+D imputables como ingreso en el ejercicio.

La Ley del IS es muy genérica en la acotación de los gastos que generan el derecho a la deducción, ya que se limita a establecer la necesidad de que los gastos de I+D, incluidas las amortizaciones de los bienes afectos, tengan una relación directa con dichas actividades y se apliquen efectivamente a la realización de las mismas, constando específicamente individualizados por proyectos.

A falta de mayor precisión normativa, hay que acudir tanto a la doctrina administrativa como al criterio manifestado por el Instituto de Contabilidad y Auditoría de Cuentas (Resolución de 21 de enero de 1992 sobre valoración de los costes de producción del inmovilizado inmaterial cuando los proyectos se realizan con medios propios de la empresa), dada la voluntad del legislador de adecuar el Impuesto sobre Sociedades a la normativa contable.

Además de los gastos directos, también deberían poder ser incluidos los gastos indirectos en tanto que contribuyen a posibilitar la realización de un proyecto de I+D, siempre que se pruebe su efectiva vinculación al mismo. No obstante, dado que es una materia que puede suscitar controversias, habrá que estar en última instancia al parecer de la Administración Tributaria acerca de la inclusión de los costes indirectos dentro de la base de deducción por I+D.

Asimismo, es preciso puntualizar que para determinar la base de la deducción se tomará en consideración el importe de los gastos efectuados en el periodo impositivo por este concepto, independientemente de la actividad contable o no de los mismos como inmovilizado inmaterial.

4.2. Deducción por investigación tecnológica

La base de la deducción está constituida por el importe de los gastos del periodo en actividades de innovación tecnológica por los siguientes conceptos:

> Proyectos encargados a Universidades, Organismos Públicos de Investigación, Centros de Innovación y Tecnología expresamente regulados.

> Diseño industrial e ingeniería de procesos de producción, que incluirán la concepción y la elaboración de planos, dibujos y soportes destinados a definir los elementos descriptivos, especificaciones técnicas y características de funcionamiento necesarios para la fabricación, prueba, instalación y utilización de un producto.

> Adquisición de tecnología avanzada en forma de patentes, licencias, Know-how y diseños. No se incluyen las cantidades satisfechas a personas vinculadas al sujeto pasivo. La base por este concepto no puede superar los 500.000 euros.

> Obtención del certificado de cumplimiento de las normas de aseguramiento de la calidad de la serie ISO 9000, GMP o similares, sin incluir los gastos correspondientes a la implantación de dichas normas.

La base de la deducción por actividades de innovación tecnológica se minorará en el 65% de las subvenciones recibidas para fomento de dichas actividades e imputables como ingreso en el periodo impositivo.

4.3. Requisitos formales

En cuanto a los requisitos formales, básicamente la Ley del IS señala que tanto los gastos por las actividades de I+D como los gastos de innovación tecnológica tienen que estar individualizados por proyectos.

Por ello, es oportuno y necesario que la Compañía tenga la debida documentación para cada proyecto en la que se reflejen específicamente los trabajos realizados y los costes imputables a cada uno de los proyectos.

La actividad principal debe llevarse a cabo materialmente en España, con independencia de que la actividad de I+D se efectúe por el propio sujeto pasivo como por encargos a terceros.

Sin embargo, cabe la posibilidad de efectuar actividades o trabajos complementarios en el extranjero siempre que los gastos incurridos en el extranjero no superen el 25% del importe total invertido en el proyecto.

5. Porcentajes de deducción

Los porcentajes de deducción aplicables son los siguientes:

5.1. Deducción por I+D

> El 30% de los gastos efectuados en el periodo impositivo por este concepto.

> Cuando los gastos del periodo sean superiores a la media de los efectuados en los dos años anteriores, se aplicará el 30% sobre la media y el 50% sobre el exceso (en el primer año de aplicación 50%).

> Existe una deducción adicional del 10% de los gastos de personal correspondientes a investigadores cualificados adscritos en exclusiva a actividades de I+D, y de los gastos correspondientes a proyectos, debidamente registrados, con Universidades, Organismos Públicos de Investigación y demás Centros de Innovación y Tecnología expresamente regulados.

> El 10% de las inversiones en elementos de inmovilizado material e inmaterial, excluidos los inmuebles y terrenos, siempre que estén afectos exclusivamente a las actividades de I+D.

5.2. Deducción por investigación tecnológica

> El 15% para los proyectos encargados a Universidades, Organismos Públicos de Investigación, Centros de Innovación y Tecnología expresamente regulados.

> El 10% para los restantes conceptos.

En la práctica, podrían existir supuestos que hicieran dudar si una actividad tiene la consideración fiscal de I+D o de innovación tecnológica, debiéndose determinar al efecto si el proceso o producto supone una indagación original o pluriactiva que persigue conseguir nuevos conocimientos científicos o por el contrario mejorar, mediante una nueva aplicación un proceso ya existente.

La base de la deducción está constituida por el importe de los gastos de I+D, y en su caso, por las inversiones en elementos de inmovilizado material e inmaterial excluidos los inmuebles y terrenos.



❖ "LA CREACIÓN DE UNA RED QUE COORDINE Y ARTICULE LOS PARQUES Y A SU VEZ A ÉSTOS CON EL SISTEMA, SERÁ CLAVE EN TODOS LOS TERRITORIOS"



Josep Miquel Piqué
Presidente de la Red de Parques
Científicos y Tecnológicos de Cataluña
(XPCAT)

Josep Miquel Piqué, presidente de la recién creada Red de Parques Científicos y Tecnológicos de Cataluña, está convencido de que la creación de redes que articulen y coordinen a los distintos parques de una Comunidad y, a su vez, éstos con el sistema Ciencia-Tecnología-Empresa será imprescindible en los próximos años. Ése es, básicamente, el objetivo de la Xarxa catalana, que agrupa a 11 espacios de excelencia, muchos de ellos hitos o modelos en la historia de los Parques Científicos y Tecnológicos Españoles.

Por Manuela Hernández

¿Por qué han decidido unirse en una RED los parques catalanes? La Red (Xarxa, en catalán) de Parques Científicos y Tecnológicos de Catalunya (XPCAT) nace con la voluntad de colaborar, mediante la potenciación y difusión de los Parques, a la renovación y diversificación de la actividad productiva, al progreso tecnológico y al desarrollo económico y social de Cataluña, actuando como motor en el proceso de transferencia y difusión del conocimiento y la tecnología.

¿Cree que la idea de los parques catalanes, y teniendo en cuenta que ya existe una RED vasca, será copiada, en el buen sentido, claro, por otras CC.AA.? ¿Sería deseable que así fuera? Los dos modelos nacen de un sistema diferente, uno de ellos más rico en fuentes del conocimiento, como es el catalán (Universidades y Centros de Investigación), y el otro basado en un sistema tecnológico más maduro (Centros Tecnológicos). Ambos persiguen el acercamiento entre el conocimiento y la innovación tecnológica (hecho éste de gran importancia en las políticas europeas, puesto de manifiesto

en el denominado espacio europeo de investigación e innovación).

Cada territorio tiene que desarrollar su sistema de innovación, lo que los anglosajones denominan "regional innovation system". En éste constatamos que una pieza clave del sistema son los Parques Científicos y Tecnológicos. La creación de una red que coordine y articule los parques y a su vez éstos con el sistema, será clave en todos los territorios. Eso sí, cada CC.AA., partiendo de sus activos, tiene que crear el sistema y la red que mejor resuelva la competitividad de las empresas de su territorio, y mejor posicione este territorio a nivel internacional.

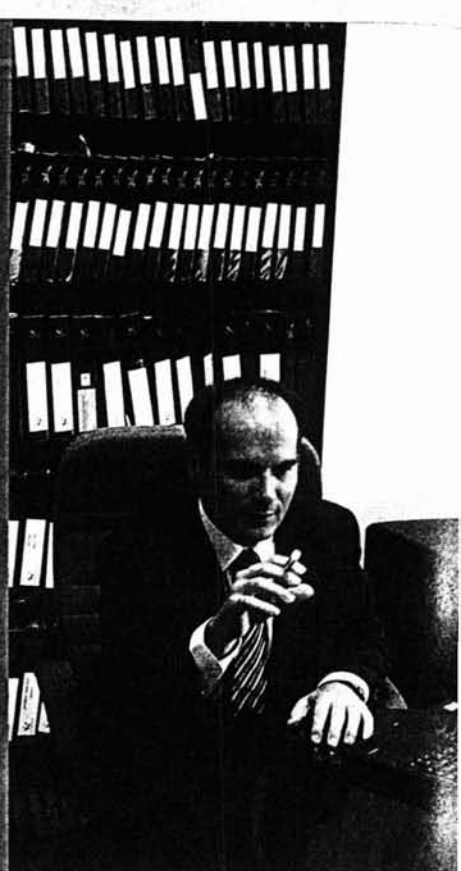
¿Cuáles serán los objetivos y actividades inmediatas de la RED? La Red coordina los grandes espacios de producción y transferencia científica y tecnológica de Cataluña, y tiene por objetivo el crear sinergias y dinámicas comunes, compartir recursos e información, y establecer fórmulas de colaboración en diversos ámbitos. La XPCAT tiene la voluntad de convertirse en un agente clave del Sistema Ciencia-Tecnología-Empresa en Cataluña.

Y ese cometido, ¿cómo lo va a realizar? La XPCAT pretende dar a conocer y difundir entre los distintos colectivos sociales la existencia de los Parques Científicos y Tecnológicos como un instrumento de desarrollo empresarial, de la innovación y de la transferencia de tecnología y de conocimiento, impulsando el acercamiento Universidad-Empresa. Una línea clave será la transferencia de empresas de base tecnológica y el correspondiente modelo de incubación (donde cabe destacar el papel de las incubadoras, las fuentes de financiación y el diseño de itinerarios de empresas de base tecnológica resultantes de los procesos de incubación). Además, la XPCAT planteará la creación de una Metodología de Creación de Parques Científicos y Tecnológicos (Modelo Catalán de Parques) a partir de la experiencia de sus miembros, y que constituya un manual de referencia para la constitución de nuevos Parques.

¿Qué capacidad de decisión o participación tendrá la RED en el diseño de la política científico-tecnológica de Cataluña? La XPCAT se presentó en sociedad el miércoles 22 de enero de



"Un Parque Científico y Tecnológico, como estructura de intermediación dentro del Sistema Ciencia-Tecnología-Empresa, tiene el papel clave de crear el medio donde la innovación procedente del conocimiento fluya de la forma más eficiente"



2003 en el Palau de la Generalitat, en presencia del Consejero de Trabajo, Industria, Comercio y Turismo, el Sr. Antoni Fernández Teixidó, así como del Consejero de Universidades, Investigación y Sociedad de la Información, el Sr. Andreu Mas-Colell. Ambos consejeros mostraron su total apoyo a la iniciativa de la Red de Parques. Una de las finalidades estatutarias de la XPCAT es la de participar en el desarrollo de los planes de Investigación e Innovación que se promuevan en Cataluña. A tal efecto se mantiene un diálogo muy fluido con las diversas consejerías.

En Cataluña, y en otras muchas Comunidades, ya hay un buen número de parques científicos y tecnológicos, ¿pueden seguir creciendo ilimitadamente? ¿dónde está el freno? ¿quién o qué lo pone? Podemos identificar dos orígenes en la constitución de los Parques, los de procedencia universitaria, y los promovidos por una administración pública (local o autonómica).

El límite de parques científicos está relacionado con la potencia científica de las universidades. En este sentido, veremos como toda Universidad que quiera ser eficiente en su diálogo con el entorno desarrollará Parques Científicos. Éstos también podrán ser el resultado de la suma de varias universidades que promuevan alianzas estratégicas. Los parques tecnológicos tendrán que responder a un diferente estado en la

cadena de valor del conocimiento. Por una parte, el número de parques tecnológicos vendrá delimitado directamente por el número de universidades y/o Parques Científicos con los que se conecten. Por otra parte, la focalización temática de los parques, así como la demanda de las empresas que pidan medios innovadores, dimensionará naturalmente el número de Parques.

¿Cómo definiría la situación actual de la I+D+i en su Comunidad? ¿Existen planes coordinados de actuación en el sistema Ciencia-Tecnología-Empresa? Cataluña dispone en este momento del Plan de Investigación y del Plan de Innovación, promovidos por el Departamento de Universidades y por el Departamento de Industria. El nuevo reto es la creación de un Plan que una Ciencia-Tecnología-Empresa. Me consta que en la mente de la Generalitat se plantea trabajar en esta línea.

La I+D sigue dependiendo fundamentalmente en España del sector público.

¿Cómo piensa usted que se podría invertir esa tendencia? Los fondos públicos tienen que contribuir a transformar dinámicas y a corregir ineficiencias del mercado cuando éste no resuelve de forma eficiente la relación Investigación, Desarrollo e Innovación. Cabe identificar qué función tienen estos fondos y qué retornos se pretenden obtener. Cuando hablamos de investigación básica, por tanto con retornos a medio-

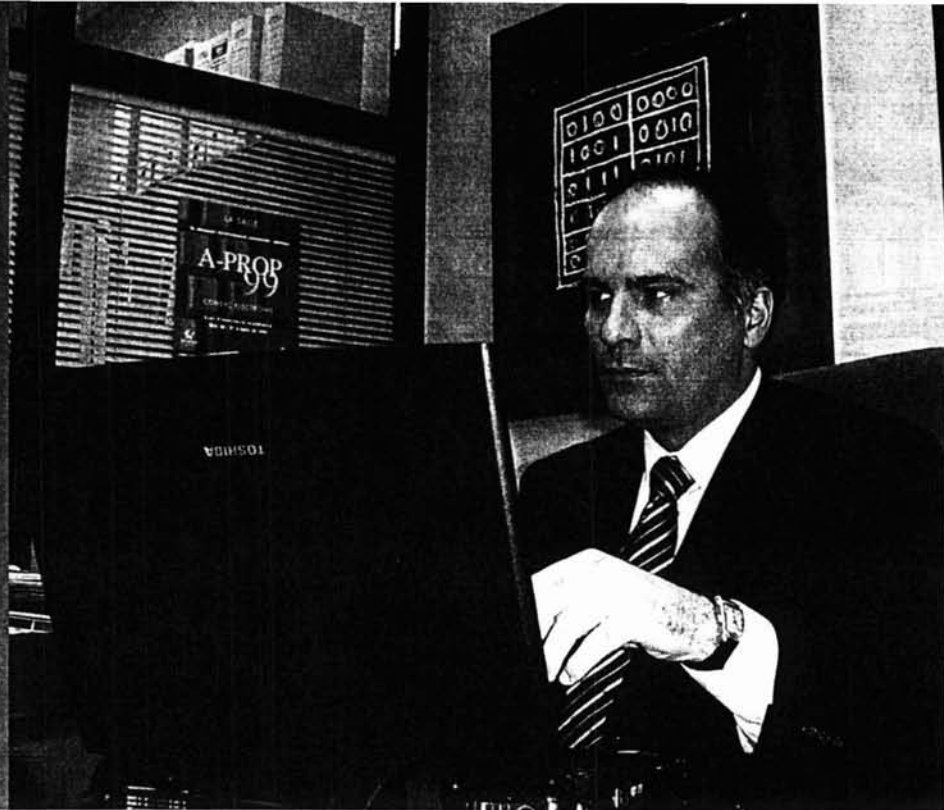
largo plazo, sólo una contribución decidida del sector público puede crear los cimientos necesarios para un futuro resultado. Ahora bien, si lo que se pretende es fomentar la eficiencia del Sistema Ciencia-Tecnología-Empresa, el sector público debe apostar por estructuras de intermediación que aseguren un mejor funcionamiento de las interrelaciones entre agentes. Éstas, en fase de estabilización, tendrían que encontrar escenarios de sostenibilidad. En la medida en que las empresas inviertan en una I+D colaborativa público-privada, se podrá cambiar la tendencia.

No obstante, ¿le parecen suficientes los recursos públicos que se destinan a fomentar la I+D tanto a nivel autonómico como estatal? Los recursos públicos destinados a fomentar la I+D en España distan de los destinados en los países más avanzados. Aún así, la correlación de los indicadores de productividad científica de las universidades españolas con la transformación de éstos en patentes constatan el stocaje de conocimiento universitario que no ve luz en la explotación empresarial. Los recursos públicos que vayan destinados a fortalecer la investigación, desarrollar estructuras de intermediación, y a su vez a beneficiar a las empresas del uso de dicho conocimiento, estarán contribuyendo al encaje del sistema.

Otro de los problemas tradicionales de la innovación en España es la falta de conexión entre universidad

Miembros de XPCAT

- > Parc Científic i Tecnològic de la UdG [Girona]
- > Parc Tecnològic de Girona (PTGI) [Girona]
- > TecnoCampus Mataró (TCM) [Mataró]
- > Parc Tecnològic del Vallès (PTV) [Cerdanyola]
- > Parc Científic i Tecnològic de la UAB [Cerdanyola]
- > Parc Científic de Barcelona - UB [Barcelona]
- > Parc d'Innovació Tecnològica i Empresarial La Salle [Barcelona]
- > Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB) [Barcelona]
- > Parc Tecnològic de Barcelona [Barcelona]
- > Parc Mediterrani de la Tecnologia [Castelldefels]
- > Parc Tecnològic del Camp Tecnoparc [Reus]



y empresa. ¿Cómo se afrontará desde la Red este problema y qué soluciones piensa arbitrar para mejorar la interconexión ciencia-empresa? La Universidad tradicionalmente ha transferido conocimiento a su entorno. En etapas de industrialización ha sido clave en la transferencia de personas altamente capacitadas. Durante los años 90, en el marco de la Ley de Reforma Universitaria se consolida la Transferencia de Tecnología. Desde hace pocos años, constatamos el crecimiento de nuevas empresas de base tecnológica de origen universitario.

Los Parques Científicos y Tecnológicos actúan como estructuras de intermediación entre universidad y empresa, y contribuyen de forma decidida a su interconexión, mediante la conexión con los grupos de investigación universitarios, la subcontratación del I+D, la integración de los departamentos de I+D de empresas y con el soporte a la creación de nuevas empresas de base tecnológica. La Red, en este sentido, aparte de la promoción del desarrollo del Sistema Ciencia-Tecnología-Empresa, pretende activar la conexión entre los propios Parques Científicos y los Tecnológicos, y así contribuir al aprovechamiento por parte de las empresas del conocimiento acumulado en la universidad.

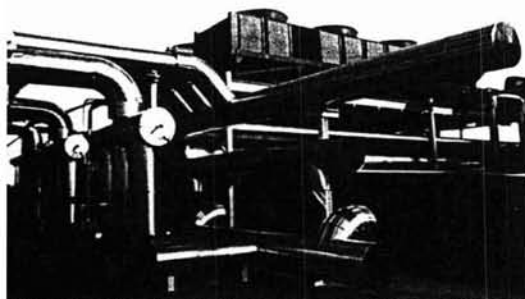
¿Ha tomado conciencia la empresa española de la incidencia de la innovación sobre su competitividad y la

estabilidad en el nuevo entorno socioeconómico? Las empresas que están gestionando su innovación de forma sistemática están comprobando que la competitividad en el futuro depende de la orientación a la innovación que tengan hoy. En este sentido, cada vez son más las empresas que identifican a las universidades como una de las fuentes de la innovación para la competitividad permanente. La participación de empresas en los distintos Parques Científicos y Tecnológicos es una muestra de la importancia de la innovación empresarial y del papel determinante de estas estructuras de interme-

diación para acoger a la empresa más innovadora.

¿Qué papel atribuye, en general, a los parques tecnológicos en la innovación del tejido productivo? Un Parque Científico y Tecnológico, como estructura de intermediación dentro del Sistema Ciencia-Tecnología-Empresa, tiene el papel clave de crear el medio donde la innovación procedente del conocimiento fluya de la forma más eficiente. En este sentido, los Parques han de proveerse de los mejores entornos tecnológicos, que contribuyan a que las empresas instaladas cuenten con activos de competitividad provenientes no sólo de ellas, sino del medio en el que habitan.

¿En la evidente falta de conexión entre la universidad y las empresas, qué parte de culpa corresponde a cada una? La evidente falta de conexión entre la universidad y las empresas, existente hace unos años, está siendo eliminada gracias a las distintas iniciativas de los tres agentes del Sistema: Universidad, Administración y Empresa. De todas formas, necesitamos potenciar algunas de estas iniciativas para mejorar en el entorno europeo. La universidad ha de ser más eficiente en la transmisión del resultado de la investigación hacia las empresas. En este sentido, los Parques Científicos y Tecnológicos, como estructuras de intermediación, pueden contribuir de forma decidida a la conexión de Universidad y empresa.



Planta de Cogeneración

- 1 Sala Multiusos.
- 2 Sala Multiusos. Detalle de las instalaciones.
- 3 Centro Empresarial Son Espanyol.
- 4 Edificio 17.
- 5 Edificio 17.

Nuevos servicios de valor añadido en

PARCBIT

La empresa ParcBIT Desenvolupament, S.A., gestora del Parque Tecnológico de Baleares, amplía su oferta de servicios a empresarios, emprendedores y a la sociedad en conjunto a través de la creación del Área de Innovación en el Parque.

La creación del Área de Innovación es el resultado de las sinergias surgidas entre la implantación en la Región de Baleares del Plan INNOBAL XXI (primer Plan de Innovación de las Islas Baleares, desarrollado por la Conselleria de Innovació i Energia del Govern de les Illes Balears a través del programa RITTS (Regional Innovation and Technology Transfer Strategy), promovido por la Unión Europea y el Plan Estratégico de ParcBIT, encaminado a posicionar al Parque como eje principal de dinamización de la innovación en las Islas Baleares y a superar el problema de la insularidad en las Islas, a través de la innovación y la tecnología.

En este marco, el Área de Innovación inicia su actividad dando soporte a dos acciones del Plan Innobal XXI: la creación de una red de antenas tecnológicas (puntos de información y asesoramiento) de apoyo a empresarios y emprendedores con sedes en las principales ciudades industriales de Mallorca, Menorca e Ibiza; y el establecimiento de una incubadora

de empresas de base tecnológica.

Para poder implantar dichas acciones y asegurar el éxito del Plan Estratégico del Parque se han establecido las siguientes bases:

- > Ampliación del equipo de profesionales de ParcBIT mediante la contratación de personal con amplia experiencia en Innovación y Tecnología
- > Establecimiento del espacio físico para el Área de Innovación
- > Creación de las infraestructuras y ubicación del espacio físico de la incubadora (800 m²)
- > Primeras fases del análisis de la situación actual en Innovación y Tecnología del tejido empresarial balear, a través de la realización de diagnósticos en un total de 160 empresas y Centros Tecnológicos de Baleares
- > Definición de los servicios ofrecidos por el Área de Innovación.

Los servicios que ofrece el Parque desde el Área de Innovación incluyen:

- > Servicios de apoyo a empresas, ofreciendo asesoramiento sobre los recursos





(empresas de servicios, ayudas y subvenciones, financiación, contactos, etc.) existentes para cubrir cualquier necesidad de innovación que detecten, incluyendo un servicio de diagnóstico de Innovación. En este servicio se incluye asesoramiento técnico, de gestión, financiero o jurídico según las necesidades de la empresa. Está prevista también la creación de un Centro de Documentación sobre Innovación y una bolsa de trabajo de profesionales cualificados, orientada a cubrir las demandas de personal cualificado de las PYMES.

> Servicios de apoyo a emprendedores, estructurados sobre la base de la incubadora de empresas, ofreciendo además servicios de orientación, formación, financiación y asesoramiento para la creación de empresas de base tecnológica y spin-offs académicos y de empresas existentes, promoción de nuevas ideas a través de seminarios de creatividad y concursos de ideas empresariales, y organización de foros y eventos para asegurar el intercambio de experiencias entre los nuevos emprendedores y los empresarios ya instalados en el Parque.

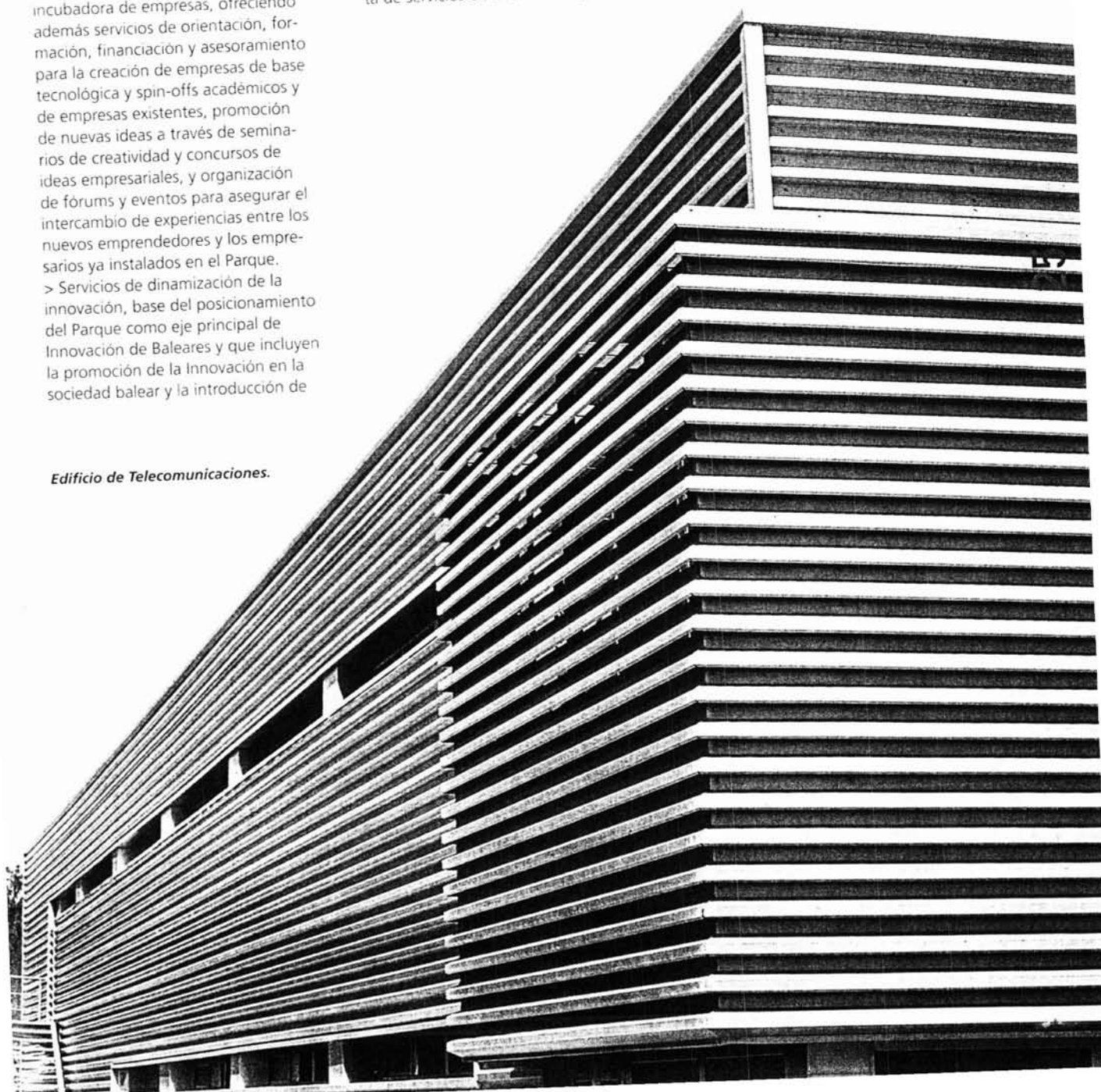
> Servicios de dinamización de la innovación, base del posicionamiento del Parque como eje principal de Innovación de Baleares y que incluyen la promoción de la Innovación en la sociedad balear y la introducción de

una cultura innovadora en Baleares a través de la organización de eventos (seminarios, actividades lúdicas, actividades deportivas, presentaciones en la Universidad, desayunos innovadores, etc.) y formación para directivos y personal cualificado.

En paralelo, y de cara a garantizar la calidad de los servicios ofrecidos desde el Parque, se establecen los servicios de mejora continua, centrados en analizar el grado de aceptación de los eventos y servicios ofrecidos en la comunidad Balear y a reelaborar el Plan Estratégico del Parque en sus futuras ampliaciones y la oferta de servicios en línea con el grado

de aceptación de los servicios. Con la creación del Área de Innovación, y considerando que el Parque ya incluye en sus instalaciones empresas de base tecnológica (algunas de reciente creación), y empresas de consultoría en todos los campos, el ParcBIT se convierte en un excelente trampolín para la instalación de empresas innovadoras y nuevos emprendedores. De este modo, el Parque tecnológico no sólo cubre las necesidades de espacio de empresas innovadoras, sino también las necesidades de innovación para la sociedad balear en conjunto.

Edificio de Telecomunicaciones.



EL CAMPUS DE LA SALUD DE

GRANADA

CONTARÁ CON UN CENTRO DE FORMACIÓN DE PROFESIONALES
SANITARIOS CON UN ALTO NIVEL TECNOLÓGICO

El Complejo Multifuncional Avanzado de Simulación e Innovación Tecnológica (CMAT), que promueve la Empresa Pública de Emergencias Sanitarias del 061 y que entrará en funcionamiento a finales de este año, contará con procedimientos innovadores como sistemas virtuales, robots que simulan pacientes reales e incluso empleará actores como enfermos, lo que le convierte en uno de los pocos del mundo con estas prestaciones.

El CMAT es mucho más que un centro de formación, es un centro de entrenamiento donde los profesionales sanitarios se instruirán de manera práctica en los casos y situaciones que luego se encontrarán diariamente en el desempeño de sus funciones. El edificio albergará todos los procedimientos y técnicas de enseñanza con las últimas tecnologías, lo que permitirá recrear simulaciones en zonas urbanas, para accidentes de tráfico u otras emergencias, en domicilios, o en el área de urgencias hospitalarias, así como el proceso asistencial completo desde la primera atención. "Hay en el mundo centros donde se realizan las

prácticas que en el CMAT se pueden realizar, es cierto, pero no hay ninguno donde se hagan todas, como aquí", según explicó el propio consejero de Salud de la Junta de Andalucía, Francisco Vallejo, durante la presentación del proyecto.

Toda clase de intervenciones quirúrgicas, el diagnóstico y atención de pacientes en accidentes de tráfico o en cualquier clase de emergencias, la recepción de heridos en urgencias o la atención de enfermos en consultas son algunas de las prácticas que proporcionará el CMAT. Para ello, se emplearán simuladores robotizados y sistemas de última generación que permitirán ensayar numerosas técnicas y procedimientos de diagnóstico y terapéuticos, desde los más complejos a los más simples, en condiciones semejantes a las reales.

Además de los sistemas de simulación virtual en tres dimensiones y los robots, el CMAT también empleará actores como pacientes para entrenar a los profesionales en la atención integral, lo que exige, junto a las competencias asistenciales, otras como la capacidad de comu-

nicación con el enfermo y sus familiares. El CMAT estará situado junto al futuro hospital del Campus de Ciencias de la Salud, por lo que se convertirá en un centro neurálgico para la preparación de los profesionales sanitarios. El complejo estará conectado mediante las nuevas tecnologías de la información a los centros de la red del sistema sanitario público andaluz, lo que les podrá convertir en aulas virtuales que podrán transmitir en directo o diferido experiencias de especial interés o recibir las que se realicen desde el Campus de la Salud. Con un presupuesto de algo más de nueve millones de euros, el CMAT pretende convertirse en el primer centro a nivel internacional que aglutine todas las metodologías existentes para la formación de profesionales en emergencias sanitarias, y a la vez en el centro coordinador del servicio provincial del 061. Se tratará de un edificio inteligente con tecnología digital que facilite la gestión de sus recursos para dar respuesta a las actividades que en él se desarrollen, equipado con tecnología punta para emisión on-line de cursos y simulaciones, y que usará energías limpias para su funcionamiento.

26

El Complejo Multifuncional Avanzado de Simulación e Innovación Tecnológica (CMAT) es mucho más que un centro de entrenamiento donde los profesionales sanitarios se instruirán de manera práctica en los casos y situaciones que luego encontrarán diariamente en el desempeño de sus funciones.



Presentación de la maqueta del edificio del CMAT.

EL PRESIDENTE DE LA JUNTA DE ANDALUCÍA ASEGURA QUE EL CAMPUS DE LA SALUD AVANZA "A VELOCIDAD DE CRUCERO"

Manuel Chaves recordó que el proyecto "es la mayor inversión en el sector hospitalario que se haya hecho nunca en Andalucía".

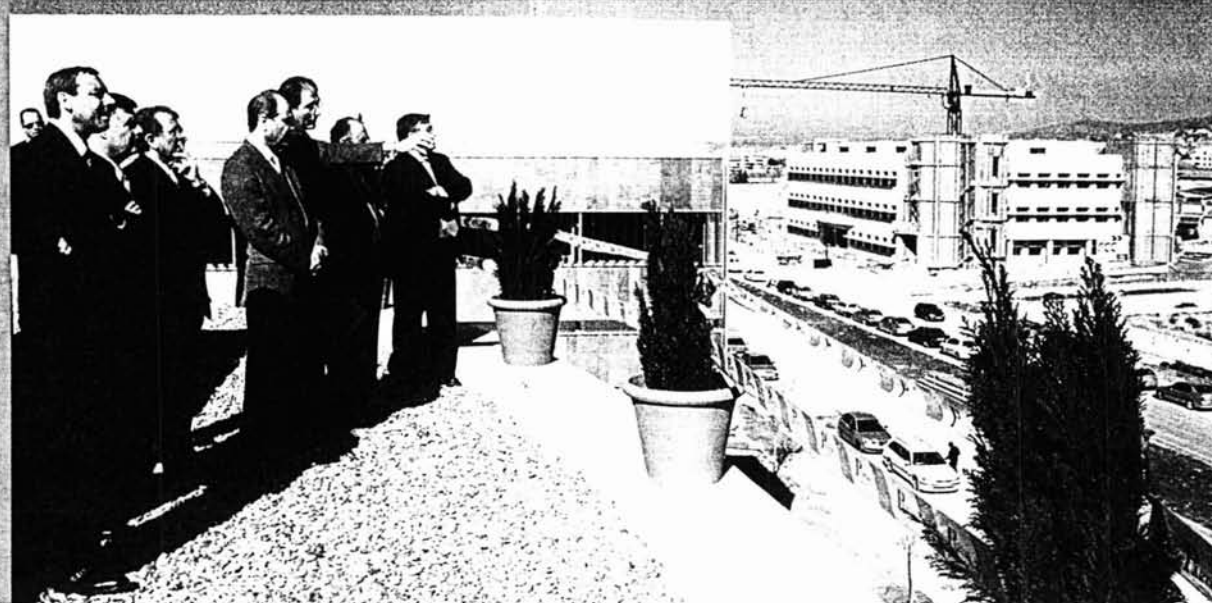
El presidente de la Junta de Andalucía, Manuel Chaves, visitó el pasado mes de febrero las obras de los distintos edificios que se ejecutan en el Campus de Ciencias de la Salud de Granada, que este año contarán con una inversión de 153 millones

de euros (unos 25.000 millones de pesetas).

En su primera visita institucional al Campus de la Salud, Manuel Chaves señaló que el Parque es un proyecto "irreversible" que avanza "a velocidad de crucero", y añadió que se trata de la mayor inversión en el sector hospitalario que se haya hecho nunca en Andalucía.

Acompañado por el presidente de la

Fundación Campus de la Salud, David Aguilar, y el gerente de esta institución, Jesús Quero, el presidente del Gobierno andaluz recorrió el Centro Europeo de Empresas e Innovación, un edificio que entrará en funcionamiento dentro de un mes, y comprobó la evolución de las obras del Instituto de Parasitología y de la Planta Piloto de Investigación Farmacéutica, que estarán concluidas antes de que finalice este año.



Visita del presidente de la Junta de Andalucía, Manuel Chaves, al Campus de la Salud.

CONSTITUIDA LA

RED VALENCIANA

DE GENÓMICA Y
PROTEÓMICA

Recientemente se ha constituido de forma oficial la Red Valenciana de Genómica y Proteómica de la Comunidad Valenciana, cuyo objetivo es impulsar el desarrollo de la biotecnología en la región. La nueva Red está conformada por la Universidad Politécnica de Valencia, la Universitat de València Estudi General, el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

Los proyectos relacionados con genómica y proteómica tienen un elevado

potencial científico técnico y son apoyados ampliamente por las instituciones públicas. Buena prueba de ello es el apoyo recibido a esta Red por parte del Ministerio de Ciencia y Tecnología, que concedió un anticipo reembolsable en el año 2001 con carácter trienal, a través de las ayudas para actividades realizadas por entidades de derecho público y entidades sin fines de lucro en parques científicos y tecnológicos, para el desarrollo del proyecto Tecnologías Genómicas y Proteómicas en Agroalimentación, proyecto que se desarrolla parcialmente en las instalaciones del Parque Científico Burjassot-Paterna.

- | | | | |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|
- 1 UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
 - 2 UNIVERSITAT DE VALÈNCIA ESTUDI GENERAL
 - 3 CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
 - 4 INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

WALQA

YA TIENE DOS EDIFICIOS
A PLENO RENDIMIENTO

El parque Tecnológico Walqa tiene ya dos edificios en funcionamiento. El edificio Uno, de Servicios Generales, que cuenta con la sede de la Sociedad Gestora, el Área de Transferencia de Tecnología, los servicios comunes para el Parque (cafetería/restaurante, salas de reuniones, salas de formación salón de actos, etc) y cinco empresas. El edificio Dos, dedicado exclusivamente a las empresas, está al máximo de ocupación y cuenta con seis empresas.

El tercer edificio de Walqa tiene prevista su entrega en enero de 2004 y ya está reservado en su totalidad por una empresa que va a comenzar sus actividades en otras instalaciones provisionales arrendadas por el Parque y subarrendadas a esta empresa. Los gestores estiman que el cuarto edificio estará listo en enero de 2005 y también dispone ya de determinadas reservas, aunque no en la totalidad de su superficie.

28

ARRANCA EL ÁREA DE TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA DEL PARQUE

También en el Parque Tecnológico Walqa acaba de comenzar su andadura el Área de Transferencia de Tecnología del Parque, materializada principalmente en cinco Laboratorios de Investigación Avanzada de la Universidad de Zaragoza: laboratorio de UMTS, laboratorio de Banda Ancha, laboratorio de Aplicaciones Informáticas Avanzadas, laboratorio de Radiofrecuencia y laboratorio Jurídico/Empresarial. Todos ellos se encuentran equipados con tecnolo-

gía puntera en las distintas áreas y cuentan con actividades de I+D del Centro Politécnico Superior de la Universidad de Zaragoza, la facultad de Derecho, y la facultad de Ciencias Económicas y Empresariales de la Universidad de Zaragoza. Su objetivo es constituirse en un importante centro de I+D de la Universidad de Zaragoza y la prestación de servicios de investigación y desarrollo tanto a las empresas del Parque Tecnológico como a otras de fuera.

HISPAMOLDES ABRE EN EL

PARQUE TECNOLÓGICO DE GALICIA

UNO DE LOS MAYORES CENTROS DE ESPAÑA EN LA FABRICACIÓN DE MOLDES PARA AUTOMOCIÓN

El Grupo Hispamoldes acaba de inaugurar en el Parque Tecnológico de Galicia (Ourense) una de mayores factorías de España dedicada a la fabricación de moldes de gran tonelaje para la industria de la automoción. Las nuevas instalaciones ocupan una superficie de 5.500 metros cuadrados de los que 3.500 se destinan a fábrica de moldes e inyección. La empresa se dedica al diseño, desarrollo y construcción de moldes de inyección para la industria de termo plásticos, termo estables y aluminio para el sector del automóvil y cuenta con una participación del 52% de capital portugués y 48% español.

El proyecto tiene por objeto, además, la creación de nuevas líneas de negocio: una de moldes para inyección sobre tejido y mecanizados, y otra de mecanizados de alta velocidad para productos de desarrollo y atención rápida al cliente. Sus piezas son exportadas a países como Brasil, Turquía, Alemania y Francia y tra-



Manuel Fraga, presidente de la Xunta, durante la inauguración del Centro de Hispamoldes.

baja para marcas como SEAT, Mercedes, Audi, Citroen y Renault, y en estos momentos tiene un proyecto para Volkswagen en México.

El presidente de la Xunta de Galicia, Manuel Fraga, destacó durante la inauguración de las instalaciones la madurez alcanzada por el sector de automoción para competir en los mercados, y dijo que la automoción "es un sector estratégico para la economía gallega", que "concentra la mitad de las exportaciones". El titular de la Xunta insistió en que, pese a la fuerte competencia de países emergen-



Aspecto de la fábrica de Hispamoldes en el PTG.

tes, el sector gallego de automoción "está demostrando su fortaleza y aprovechando su posición de ventaja".

Hispamoldes cuenta con una plantilla de noventa trabajadores, con la previsión de alcanzar los 130, y la inversión total prevista para el trienio 2001-2003 se cuantifica en 6.010.121 € de los que hasta la fecha se han invertido 4.207.084,70 €. Además, las nuevas instalaciones de Hispamoldes disponen de una Escuela de Formación, apoyada por la Diputación provincial de Ourense y homologada por la Xunta de Galicia. Se trata de una experiencia única en España, pues ofrece formación específica de segundo grado para jóvenes que se especializarán como Técnicos de Centro de Mecanizado, una disciplina de nueva creación en España, promovida por el Grupo Hispamoldes con la colaboración del Parque Tecnológico de Galicia.



LA II CONFERENCIA INTERNACIONAL DE LA APTe SE CELEBRARÁ EN OCTUBRE EN EL PARQUE TECNOLÓGICO DE GALICIA

Los días 16 y 17 de octubre de 2003 la Asociación de Parques Científicos y Tecnológicos de España (APTe) celebrará en el Parque Tecnológico de Galicia (Ourense) la II Conferencia Internacional sobre "El papel de la empresa, el emprendedor y las instituciones en el entorno de los parques científicos y tecnológicos".

En la primera jornada tendrá lugar una conferencia magistral a cargo de un representante de una universidad internacional impulsora de la creación de un destacado parque

científico y una mesa redonda sobre "Modelos de cooperación entre universidades y parques tecnológicos" (mesa científico-tecnológica). En la segunda jornada habrá también una conferencia magistral a cargo de un directivo de una multinacional promotora de la construcción de otro destacado parque tecnológico y dos mesas redondas sobre "Los parques tecnológicos como instrumentos de desarrollo regional" (mesa institucional) y "Las tecnópolis: espacios de convivencia y negocio para empresas y emprendedores" (mesa empresarial). Además, está previsto

desarrollar un taller de trabajo monográfico sobre el Proyecto Infobusiness, en el que se presentarán los resultados de 2003 y habrá encuentros bilaterales entre emprendedores, empresas líderes y pymes del ámbito TIC.

La información detallada del programa de conferencias, sesiones paralelas y actividades culturales, así como el formulario de inscripción, se dará a conocer próximamente en las web de la APTe (www.apte.org), la IASP (www.iaspworld.org), y el Parque Tecnológico de Galicia (www.ptg.es).



CUATRO INVESTIGACIONES PIONERAS A NIVEL MUNDIAL ENCABEZAN LA ACTIVIDAD QUE DESARROLLA EL PARQUE TECNOLÓGICO DE

SAN SEBASTIÁN

El Parque Tecnológico de San Sebastián desarrolla a través de diferentes mecanismos numerosas actividades encaminadas a favorecer la Transferencia de Tecnología y Conocimiento. En esta línea, además de los proyectos de investigación que se realizan en el Parque Tecnológico por parte de las empresas y centros de investigación ubicados en él, es el propio Parque quien a su vez diseña, lidera y desarrolla diversos proyectos avanzados en

ámbitos relacionados con las Tecnologías de la Información y las Telecomunicaciones.

Estos proyectos tienen como objetivos beneficiar al Parque Tecnológico, sus empresas y usuarios, servir como proyectos-demostración generalizables al entorno exterior y proveer un marco para la realización de proyectos fin de carrera y tesis doctorales de ingenieros y científicos.

Imagen del Robot MiReLa, desarrollado en el Parque Tecnológico de San Sebastián.

Obelix, Web Semántico

Así, durante el 2002 se han puesto en marcha dos proyectos dentro del Programa Marco de la Unión Europea. Uno de ellos es el proyecto Obelix que el Parque está desarrollando en colaboración con entidades como la Free University of Amsterdam y el Instituto de Informática Aplicada de la Universidad de Karlsruhe en Alemania, entre otros, y que tiene como objetivo investigar y desarrollar herramientas basadas en ontologías que permitan la integración e interoperabilidad de aplicaciones web de forma escalable. Este tipo de capacidades serán necesarias en la web del futuro, denominada Web Semántica, caracterizada por productos y servicios mucho más complejos, por redes de valor (denominadas Dynamic Value Constellations) que sustituirán a las cadenas de valor actuales entre proveedores y clientes, y por último, y como consecuencia, por transacciones en el mercado electrónico (e-business) mucho más inteligentes y colaborativas.

Tecnología y Arte

En el ámbito cultural, el Parque desarrolla con el Fraunhofer IGD (Institute for Computer Graphics) y la Academia de

Bellas Artes de Viena, entre otros, el proyecto europeo Art-e-Fact. Centrando la investigación en el uso de "interactive digital storytelling" para la creación y expresión de nuevas formas de arte, el objetivo es construir unas infraestructuras de Realidad Mixta (combinando Realidad Virtual y Realidad Física) que permitan la demostración y evaluación de nuevos métodos de creación y expresión artística desarrollados en el proyecto. Dentro de este ámbito, también colabora con la Agencia Espacial Europea y la Orquesta Sinfónica de Londres en el desarrollo del proyecto Sunrise. El objetivo de este proyecto consiste en utilizar los satélites de la Agencia Espacial Europea para la producción y distribución de contenidos multimedia, de modo que cualquier persona pueda recibirlos en su casa sin necesidad de realizar ninguna instalación sofisticada con el ordenador. En este campo, se han celebrado ya varias sesiones experimentales entre Londres y San Sebastián, habiéndose recibido clases magistrales del primer flauta y el primer fagot de la Orquesta Sinfónica de Londres o conciertos entre los dos puntos.

Siendo Naturaleza, Tecnología y Arte los tres fundamentos básicos sobre los que asienta su actividad, con estos dos proyectos el Parque Tecnológico intenta

ligar la tecnología y el arte, experimentando y promoviendo usos innovadores de la Tecnología al servicio del Arte.

Robótica de Servicios

Por último, el proyecto MiReLa, proyecto de Inteligencia Artificial y Robótica que desde hace varios años se está desarrollando en colaboración con el Departamento de Inteligencia Artificial del MIT (Massachusetts Institute of Technology). Este proyecto tiene como objetivo el desarrollo de un robot con capacidad de desplazamiento libre por el Edificio Central del Parque Tecnológico teniendo asignadas tres tareas que están en la auténtica punta de lanza de la investigación en robótica a nivel mundial, como son la recepción, localización y acompañamiento de personas. La base fundamental de este proyecto es el trabajo sobre la interrelación con la persona, que hará posible lo que se conoce como Robótica de Servicios, y que constituye el gran campo de aplicación de la robótica.

Con el desarrollo de estos proyectos, el Parque Tecnológico de San Sebastián, identificando oportunidades y necesidades que cubrir, desarrollando herramientas y aplicaciones, y utilizando la infraestructura física como plataforma experimental, pretende actuar de forma innovadora con vistas a convertir a la tecnología en herramienta al servicio de la sociedad.



EL PARQUE CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO DE GIJÓN

ACOGUE LA 2ª ASAMBLEA GENERAL DE
APTE Y LA REUNIÓN ANUAL DE COTEC



El Gobierno de Asturias ha iniciado la construcción en el PCTG de dos centros tecnológicos, uno de tecnologías de la Información y otro de Diseño y Producción Industrial.

APTE :: COTEC

32

El Parque Científico Tecnológico de Gijón acogió durante el mes de abril la Asamblea Anual de la Asociación de Parques Científicos y Tecnológicos de España (APTE). Pero esta no ha sido la única actividad nacional que registraron las instalaciones municipales gijonesas en abril, ya que la Fundación COTEC celebró en ellas su 9º Encuentro Anual, dedicado este año a analizar y debatir sobre los nuevos papeles de los centros tecnol-

ógicos, en cuya organización colaborará también el Club Asturiano de la Innovación.

Según los responsables del parque, la celebración de estos eventos "ponen la guinda a la trayectoria de un parque científico-tecnológico, el primero de iniciativa municipal, que tras algo más de dos años de actividad ha sacado a la venta su segunda fase de parcelas, después de comercializar la primera en la que se localizan varias empresas, y dos edificios destinados a los emprendedores tecnológicos en los que se alojan 16 empresas tecnológicas en régimen de alquiler". De hecho, la última incorporación al parque ha sido la del centro de AENOR en Asturias.

En la actualidad, la empresa de estructuras metálicas Esmena tiene su centro

tecnológico en funcionamiento en el PCTG y la operadora del cable en Asturias, Telecable, ya cuenta con una plantilla de unas cien personas trabajando en sus instalaciones del PCTG. Otras, como la Autoridad Portuaria de Gijón, ITK Ingeniería o Delcam, construyen en estos momentos sus edificios.

El Gobierno del Principado de Asturias ha iniciado la construcción en el PCTG de dos centros tecnológicos, uno de Tecnologías de la Información y la Comunicación, y otro de Diseño y Producción Industrial, que supondrán una inversión de tres millones de euros y que forman parte de una red de centros que el Ejecutivo asturiano está construyendo con el objetivo de incrementar la oferta de servicios para la innovación de las empresas regionales.



Aspecto del Parque Científico y Tecnológico de Gijón.

FERROL METRÓPOLI

Y LA FUNDACIÓN
UNIVERSIDADE DE A
CORUÑA
PROMOCIONAN
PRÁCTICAS DE
EMPRESAS PARA
UNIVERSITARIOS

La Fundación Ferrol Metrópoli y la Fundación Universidade de A Coruña han firmado un convenio de colaboración para que universitarios, recién titulados y estudiantes de Tercer ciclo, puedan realizar prácticas en empresas.

Según Doroteo López, presidente de Ferrol Metrópoli, "esta fórmula se muestra como una de las mejores herramientas para que los universitarios

adquieran experiencia profesional y las empresas puedan disponer de recursos humanos en periodo formativo para adaptar sus conocimientos a las necesidades empresariales". "De este modo, además, -subraya López- se facilita que las empresas incorporen a sus departamentos de investigación personal universitario vinculado y se genere una sinergia entre empresa, recursos humanos, innovación y Universidad".

NUEVA ACTIVIDAD EN EL

PARC CIENTÍFIC DE BARCELONA

"LOS SEMINARIOS DEL PARC 2003"

El 2003 será el primer año en el que el PCB funcionará a pleno rendimiento con todos sus espacios ocupados. Por este motivo, se ha planteado crear un espacio que permita la creación de sinergias y el intercambio de conocimiento tratando temas que puedan interesar a la comunidad que convive en el PCB, ya sean sobre ciencias experimentales, derecho, la bioética o patentes. Ese

espacio se ha bautizado como "Los Seminarios del Parc". La conferencia inaugural del ciclo, presentada por el rector de la Universitat de Barcelona, Joan Tugores, tuvo lugar el pasado viernes 17 de enero con la intervención del director del Laboratorio de Bioinvestigación de Merck Farma y Química, Jaume Piulats, que trató el tema de las nuevas aportaciones en la terapia oncológica.

ACUERDO DE INVERSIÓN ENTRE ORYZON GENOMICS Y LA EMPRESA DE CAPITAL DE RIESGO NAJETI

La empresa de genómica funcional ubicada en el Parc Científic de Barcelona Oryzon genomics (www.oryzon.com) ha firmado un acuerdo con la compañía de capital de riesgo Najeti (www.najeti.com) por el que ésta adquiere el 28% de su sociedad. Con esta operación, Oryzon financiará los programas de desarrollo de nuevas variedades vegetales y de herramientas genómicas de aplicación biotecnológica en el sector industrial y biomédico.

Según el director general de Oryzon genomics, Carlos Buesa, "con la entrada de Najeti, conseguimos no sólo incorporar los recursos que garantizan el desarrollo de nuestro

plan de identificación de dianas genéticas, sino también elementos de valor en la definición estratégica de negocio, que valoramos muy positivamente. Oryzon se encuentra en un momento de aceleración y optimización de sus programas de I+D para entrar en "break even" de aquí a dos años".

Por otra parte, con este acuerdo, Najeti se consolida como una sociedad de capital de riesgo en España especializada en operaciones en empresas biotecnológicas y de tecnología de la información y comunicaciones.

Oryzon genomics, *spin-off* de la UB y del CSIC especializada en el descubri-

miento y análisis de genes, forma parte de la Bioincubadora CIDEM-PCB. Integrada por un equipo multinacional de 20 científicos, la empresa cuenta con una tecnología propia de análisis genómico y de métodos de mapeo genético. Entre sus proyectos destaca "Orygene" que, centrado en los cereales y sobre todo en el arroz, tiene el objetivo de producir cultivos mejorados en rendimiento, cualidades nutritivas y resistencia ante patógenos y adversidades climáticas. Asimismo, Oryzon cuenta con el proyecto "Orymold", una nueva concepción de plataforma bioinformática que permite integrar una gran cantidad de datos biológicos generados en los procesos de I+D.

33

EL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL PCB RECIBE UNA AYUDA DEL MINISTERIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA COORDINAR UN PROYECTO DE GENÓMICA

El Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona del Parc Científic de Barcelona (IRBB-PCB) participará en un proyecto para la identificación de los genes de susceptibilidad a la diabetes de tipo 2, gracias a una de las nueve ayudas que el Ministerio de Ciencia y Tecnología ha otorgado dentro de la Acción Estratégica de Genómica y Proteómica del Plan Nacional de I+D+I convocada en el año 2002. Los resultados de esta investigación, que utilizará la genómica funcional, la transcriptó-

mica y el *screening* de los SNPs (polimorfismos de base única), podrán ser aplicados para identificar nuevas dianas en el descubrimiento de nuevos fármacos y de diagnósticos en la población de riesgo.

El proyecto está coordinado por el director del Grupo de Patología Molecular y Terapia de Enfermedades heterogéneas y poligénicas del IRBB-PCB y catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología

Molecular de la Universitat de Barcelona, Antonio Zorzano, y contará con la participación de destacados grupos de investigación en el campo de la diabetes, la transcriptómica y la bioinformática como son los que lideran los investigadores Xavier de la Cruz (IRBB-PCB), Javier Luque (Universitat de Barcelona), Fátima Bosch (Universitat Autònoma de Barcelona) y Ana Dopazo (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas), entre otros.

CALENDARIO

Presentación

Fecha y lugar de la presentación

CALENDA RI DEL PARC 2003

Los Seminarios del Parc 2003 son una iniciativa del Parc Científic de Barcelona, que tiene como objetivo dinamizar la actividad científica y social en la vida diaria del PCB, a través de una serie de conferencias que tratarán diversas disciplinas y en las que participarán principalmente ponentes vinculados con el PCB. Las sesiones se realizarán semanalmente en la recién inaugurada Aula 1 del Edificio Modular y se irán anunciando a través de la web www.pcb.ub.es/seminaris.

ÉXITO DE PARTICIPACIÓN EN EL I CONCURSO DE IDEAS DE LA CARLOS III

PARA LA CREACIÓN DE EMPRESAS DE BASE CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

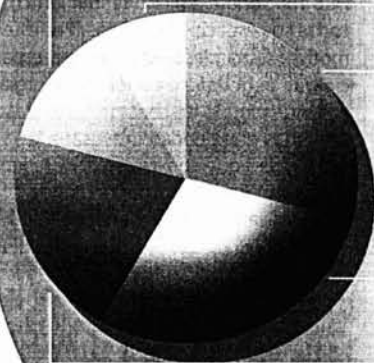
El pasado mes de diciembre finalizó la 1ª ronda del concurso de ideas que promueve la Universidad Carlos III para la creación de empresas de base tecnológica, con una participación muy significativa de alumnos y egresados de la Universidad. Un total de 51 promotores han presentado al concurso 24 propuestas pertenecientes a los sectores de las Tecnologías de la Información, las Comunicaciones y la Ingeniería Industrial, principalmente.

La evaluación de las ideas ha sido realizada por profesores de la Universidad de las áreas de conocimiento al cual se circunscriben las propuestas. Para objetivizar el proceso evaluador se ha desarrollado un cuestionario cuyos epígrafes principales y pesos en la valoración total han sido son:

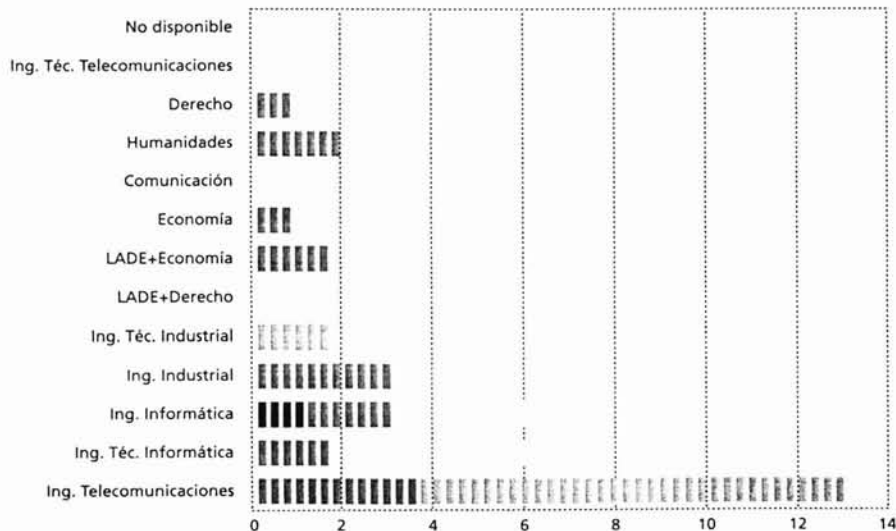
- > Viabilidad técnica y económica (30%)
- > Originalidad e innovación de la propuesta (30%)
- > Nivel de madurez de la idea (25%)
- > Carácter multidisciplinar del proyecto (15%)

Entre las ideas que han pasado a la siguiente ronda figuran algunas de nombre tan sugerente como Redes inalámbricas de banda ancha para servicios multimedia en los hogares, Sistema Domótico, Aplicación de las nuevas tecnologías al marketing de la PYME, Plataforma de servicios compartidos para PYMES, Hacia un mundo de servicios personalizados, INNOVA o Tecnología aplicada a la educación profesional.

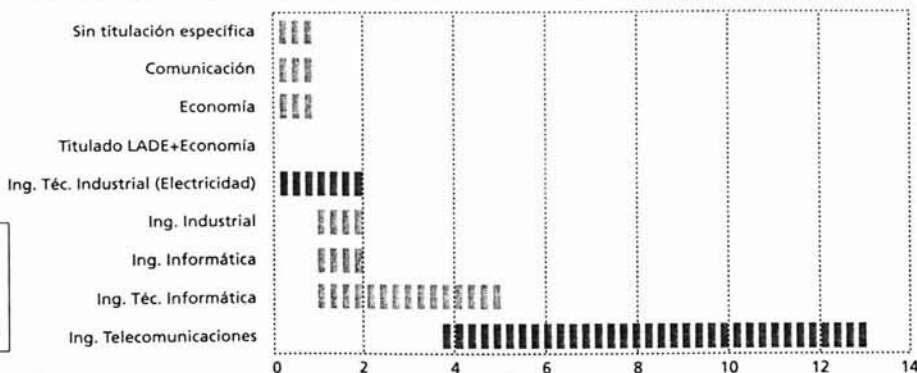
Las ideas que se han presentado al concurso están enmarcadas en las siguientes áreas:



NIVEL DE FORMACIÓN DE LOS EMPRENDEDORES 1ª RONDA



NIVEL DE FORMACIÓN DE LOS EMPRENDEDORES 2ª RONDA



En la segunda ronda, que comenzó el 17 de febrero y finaliza el 9 de mayo, los emprendedores de los proyectos elegidos participarán en un taller en el que serán asesorados en el diseño, estructura y elaboración del plan de negocio para evaluar la viabilidad técnica y económica de la idea. Como

resultado de este taller se seleccionarán las 8 ideas más viables técnica y económicamente y pasarán a una tercera ronda, en la cual realizarán una defensa pública de la propuesta ante un jurado. La resolución final del concurso se hará pública el 12 de junio del 2003.

INAUGURADOS DOS NUEVOS EDIFICIOS EN EL PARQUE CIENTÍFICO DE LA UNIVERSITAT DE VALENCIA

BURJASSOT-PATERNA

El pasado 24 de enero tuvo lugar el acto inaugural de los nuevos edificios que amplían el Parque Científico de la Universitat de Valencia Burjassot-Paterna, que corrió a cargo del rector de la Universitat de València, D. Francisco Tomás Vert, y del en ese momento Presidente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Rolf Tarrach. Al acto se sumó D. Javier Quesada, Subsecretario de la Oficina de Ciencia y Tecnología de la Generalitat Valenciana.

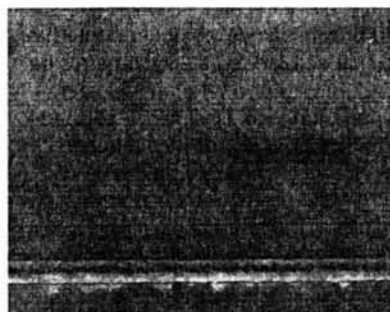
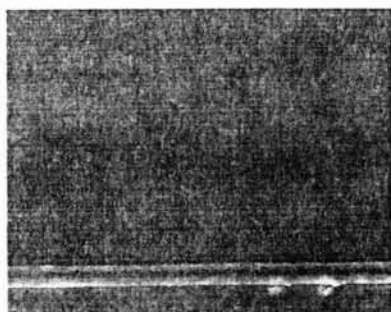
Dos nuevos edificios, con una superficie útil de más de 5.000 m², albergan ya el Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, el Instituto de Ciencia de los Materiales y el Instituto de Robótica. Un tercer edificio acoge el Instituto de Física Corpuscular, centro mixto CSIC-Universitat de Valencia, sumándose a los edificios ya construidos, un polígono de una superficie aproximada de 200.000 m², que se extiende por los municipios de Paterna y Burjassot, contiguos al Campus Universitario de Ciencias Básicas de la Universitat de Valencia.

Además de los nuevos Institutos de Investigación, en la actualidad se ubican en el Parque el Instituto Universitario de Ciencia Molecular y otros servicios e instalaciones como el Servicio Experimental de Soporte a la Investigación, el Centro

de Cálculo Científico Paralelo, y el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, perteneciente este último al CSIC.

El objetivo de la Universitat de València al diseñar este Parque ha sido el de proyectar la investigación básica de excelencia, que se realiza en el marco de los grupos de investigación e institutos mencionados, en el entorno social y económico de la Comunidad Valenciana y del resto de España. De esta forma, se pretende proporcionar a las empresas, sobre todo a las pymes, acceso fácil a servicios tradicionalmente universitarios como la formación, la investigación, la colaboración y el asesoramiento. Asimismo, se crean las condiciones necesarias para que estudiantes y profesorado de la Universitat puedan acceder a opciones empresariales a través de la comercialización de su investigación y conocimiento o la puesta en marcha de empresas a través de sus ideas (creación de spin-off).

Para cumplir este objetivo, se ha definido y construido un modelo propio de Parque, adaptado a las necesidades de la investigación, pero también de los requerimientos empresariales, donde conviven la investigación pública y privada en un único espacio, equipado con potentes servicios de apoyo.



LA COMUNIDAD VALENCIANA

DISPONDRÁ DE UN PARQUE DE 15 MILLONES DE METROS CUADRADOS. UBICADO EN EL ARCO MEDITERRÁNEO Y CON EQUIPAMIENTOS DE VANGUARDIA

Estará situado en Sagunto, en un emplazamiento con una amplia oferta de infraestructuras terrestres, marítimas y ferroviarias, y con aeropuerto internacional cercano.

La Generalitat Valenciana, a través de la empresa pública SEPIVA (Seguridad y Promoción Industrial Valenciana), en colaboración con la Sociedad Estatal de Participaciones Industriales (SEPI), está desarrollando en Sagunto (Valencia) la mayor oferta de suelo empresarial de Europa, con equipamientos de vanguardia. El proyecto, denominado Parc Sagunt, se asienta sobre una superficie de 15 millones de metros cuadrados, en una localización privilegiada por las condiciones económicas y por su estratégica situación, la ciudad de Sagunto (Valencia).

El municipio de Sagunto, en el Noroeste de la provincia de Valencia, a 25 kilómetros de la capital, tiene una ubicación y una red de comunicaciones que lo configuran como un territorio privilegiado para el desarrollo de importantes proyectos empresariales. La autopista A-7 y la N-340, que transcurren a lo largo del eje Norte-Sur de la costa mediterránea, comunican Sagunto con Andalucía Oriental y Cataluña. La Comunidad Autónoma está bien comunicada, asimismo, con el Norte de la Península, a través de la N-230, carretera que en los próximos años se convertirá en una autovía Sagunto-Somport para enlazar a través de Francia con Europa Central. Las comunicaciones terrestres se completan con una amplia oferta de ferrocarril, que incluirá la línea de alta velocidad, actualmente en desarrollo.

La proximidad del aeropuerto internacional de Manises, a 28 kilómetros de Sagunto, es otro valor añadido del emplazamiento. Finalmente, el puerto conecta todo el arco Mediterráneo con el Océano Atlántico. Esta red de comu-

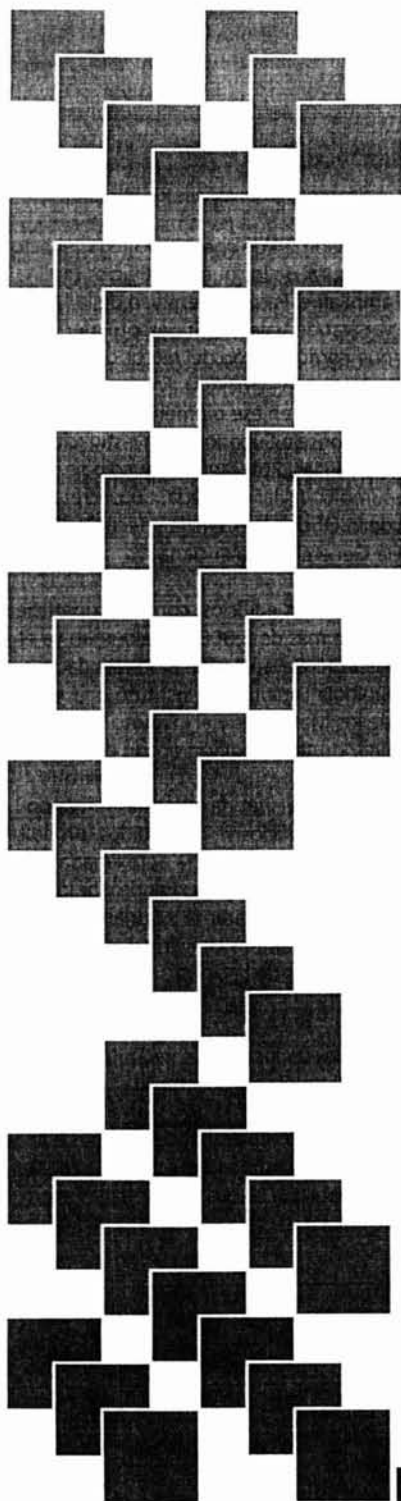
nicaciones define a Sagunto como un lugar óptimo para la implantación tanto de zonas industriales como culturales, residenciales y de ocio, porque aporta importantes ventajas económicas, geográficas y medioambientales.

Al respecto, el consejero de Industria, Comercio y Energía, y presidente de SEPIVA, Fernando Castelló, ha destacado que la ejecución de esta iniciativa "supondrá un revulsivo industrial sin precedentes tanto para Sagunto como para la Comunidad Valenciana y el conjunto nacional". En este sentido, Castelló ha subrayado que Parc Sagunt "se presenta como un gran parque de última generación y como el mayor polígono industrial de la Europa del futuro, con los servicios y las infraestructuras más avanzadas y vanguardistas".

Asimismo, el consejero ha señalado que una vez estén ubicadas y en pleno funcionamiento todas las empresas sobre los 15 millones de metros cuadrados que albergará Parc Sagunt "se habrá generado una inversión cercana a los 6.000 millones de euros y se habrá propiciado la creación de entre 25.000 y 30.000 puestos de trabajo".

Castelló también ha resaltado la importante labor de coordinación entre todos los organismos implicados en esta iniciativa. "Tanto el Ministerio de Economía, como la Generalitat Valenciana y el ayuntamiento de Sagunto han estado trabajando conjuntamente para sacar adelante este proyecto y para hacer de Parc Sagunt una de las acciones más interesantes tanto en el ámbito nacional como internacional", ha apuntado el consejero.

El titular de Industria, Comercio y Energía ha señalado que el éxito de Parc Sagunt está más que garantizado, ya que son numerosas las empresas tanto nacionales como extranjeras las interesadas en ubicarse sobre estos terrenos.



PARC SAGUNT >>

Parc Sagunt es una iniciativa conjunta que desarrollan la Generalitat Valenciana y la SEPI (Sociedad Estatal de Participaciones Industriales) y en la que ambos organismos se han comprometido a invertir 252 millones de euros (40.000 millones de pesetas) para hacer realidad este proyecto.

El recinto de Parc Sagunt se dividirá en varios distritos adaptados a las necesidades específicas de cada sector y tipo de empresa. Integrará proyectos que ya están en funcionamiento o en fase avanzada con otros en fase de planificación. Entre los primeros -en funcionamiento o en desarrollo- destacan las siguientes áreas:

> **Distrito de las PYMES y Servicios:** Abarca una extensión de 563.600 metros cuadrados. Esta zona es el núcleo a partir del cual se ha gestado el proyecto de Parc Sagunt. Actualmente, las 76 empresas instaladas en esta área han realizado una inversión de 129 millones de euros.

> **Distrito Químico:** Su extensión será de 280.500 metros cuadrados, de los que 145.000 están ocupados por las instalaciones de Fertiberia, empresa líder en su sector y dedicada a la producción de fertilizantes.

> **Distrito del Acero:** Ocupa una extensión global de 1.861.500 metros cuadrados. En esta zona ya se encuentran instaladas empresas de primer nivel tecnológico como Sid-

med, Gálmec, Solmed, Ferradina y Hierros de Levante, entre otras. Todas ellas, facturan más de 180,30 millones de euros (30.000 millones de pesetas) anuales y dan empleo directo a 1.616 personas.

> **Distrito de Tratamiento Medioambiental:** En el Parque hay instalaciones de depuración de aguas para el tratamiento medioambiental que ocupan una superficie de 161.000 metros cuadrados.

> **Distrito de las Energías Avanzadas:** En estos terrenos se ha proyectado la construcción de dos nuevas instalaciones de gran capacidad, una planta de generación de energía eléctrica mediante ciclo combinado, que quedará finalizada en 2006 y que tendrá una potencia total de 2.400 megavatios (MW), y una planta de regasificación, con una inversión de 234 millones de euros, que estará operativa en el año 2005.

> **Distrito Portuario:** Sobre el actual Puerto de Sagunto se está llevando a cabo una ampliación con una inversión de 290 millones de euros. Al finalizar las obras, la zona portuaria superará en el 2005 los dos millones de metros cuadrados. Esta ampliación, sumada a la creación del nuevo acceso norte al puerto de Valencia, permitirá una oferta conjunta de la plataforma Valencia-Sagunto que garantiza su status interoceánico a medio y largo plazo.

Por lo que respecta a las futuras acciones en materia de construcción de nuevo suelo industrial, éstas se van a desarrollar en dos fases: Sagunto I y Sagunto II. En cuanto a Sagunto I, las obras de esta fase comenzarán el primer trimestre del próximo año y las inversiones previstas ascenderán a 72,12 millones de euros. Sagunto I comprenderá 3 millones de metros cuadrados de suelo industrial divididos en tres distritos diferenciados por su actividad:

> **Distrito de la Industria:** Tendrá una extensión de 1,6 millones de metros cuadrados.

> **Distrito de la Logística:** Su superficie, de 601.000 metros cuadrados, dará servicio al puerto y a las propias empresas instaladas en el Parque, que contarán con una ágil conexión con mercados y centros avanzados de todo el mundo.

> **Distrito de Oficinas y Servicios:** Ocupa cerca de 190.000 metros cuadrados y albergará servicios de alto valor añadido para las empresas de Parc Sagunt, así como los complementarios de ocio, restauración y comercio.

Por último, la segunda fase de Parc Sagunt, el conocido como proyecto Sagunto II, tendrá una superficie de 6,5 millones de metros cuadrados y contará con un área industrial, actividades terciarias, equipamiento viario y zonas verdes.



EL PTA

CONTARÁ CON UN CLUB SOCIAL Y DEPORTIVO

El complejo se construirá sobre una parcela de 25.000 metros cuadrados

El Parque Tecnológico de Andalucía (PTA), ubicado en Málaga, contará a finales de 2003 con un club social y deportivo "pionero en Europa", debido a las características de sus instalaciones, cuyas obras comenzarán en marzo, según las previsiones de la empresa promotora. El club se construirá sobre una parcela de 25.000 m², situada junto a la sede social del PTA y colindante al nuevo aparcamiento y a la futura zona de ampliación de la tecnópolis. Está formado por un edificio de dos plantas de unos 2.000 metros cuadrados, una piscina climatizada con cubierta móvil, cuatro pistas de pádel, dos de tenis y una polideportiva, además de dos zonas destinadas a la práctica del golf – un *driving range* y un *putting green* y un gimnasio "de última generación". También habrá una zona destinada a "la salud y la belleza", con instalaciones para baños turcos, rayos UVA, peluquería, masajes, jacuzzi, sauna y fisioterapia, entre otros, siendo la inversión estimada para este proyecto de 3,5 millones de euros.

La planta baja del edificio, que estará equipado con dispositivos de domótica, estará destinada al club social, donde unos 2.000 socios dispondrán de cafetería, restaurante, sala de televisión y D.V.D., salas de lectura y de juegos y una terraza de más de 600 metros con capacidad para 800 personas.

El objetivo de esta iniciativa es crear una zona de ocio para los trabajadores del parque donde puedan "relajarse y ejercitarse" en un entorno "tranquilo y agradable", además de relacionarse entre ellos. El club convertirá al Parque Tecnológico de Andalucía en la primera tecnópolis europea con este tipo de instalaciones deportivas.



ISOFOTÓN INVERTIRÁ MÁS DE TREINTA MILLONES DE EUROS EN SU NUEVA SEDE EN EL PTA

La empresa malagueña Isofotón, dedicada a la fabricación de células fotovoltaicas, invertirá más de treinta millones de euros en la construcción de su nueva planta en el Parque Tecnológico de Andalucía (Málaga), con la que triplicará su producción actual hasta los cien megavatios. La compañía, que facturará este año unos ochenta millones de euros y prevé aumentar su facturación hasta los 250 millones en 2005, ha firmado ya la adquisición de los terrenos donde se instalará la fábrica de 25.000 metros cuadrados y que estará operativa a mediados de 2004. Este nuevo recinto se sumará a las tres fábricas existentes en la provincia malagueña, dos de fotovoltaicas y una de térmica, donde se desarrolla el proceso productivo completo, desde el corte de los lingotes de silicio (materia prima) hasta el ensamblado de los módulos. Esta iniciativa

forma parte de los planes de expansión de la firma, líder europeo en el sector de la energía solar, que pretende abrir para 2004 nuevas fábricas en el centro de Europa (Alemania), y en África (Senegal y Ghana), según ha explicado su director general, José Luis Manzano, que ha aclarado que, no obstante, la producción se mantendrá "exclusivamente" en Málaga. La Junta de Andalucía y el Gobierno central aportarán conjuntamente el cuarenta por ciento de la inversión en las obras de la nueva fábrica malagueña. Por su parte, el director general del PTA, Felipe Romera, ha destacado el acuerdo alcanzado por Isofotón y la tecnópolis para crear una central de 50 kilovatios en el parque con el objetivo de "mostrar la capacidad de esta energía" y "animar" a las administraciones y a otros parques españoles a desarrollar iniciativas similares.



De izquierda a derecha: Rafael Sainz, Presidente de Isofotón; Federico Pérez, notario y Manuel López Casero, Secretario General de Industria y Desarrollo Tecnológico de la Junta de Andalucía.



ESTUDIANTES DE TODA ANDALUCÍA PARTICIPARÁN EN UN PROGRAMA SOBRE CREACIÓN DE EMPRESAS

"Emprendejuven" fomentará la cultura empresarial entre 840 alumnos de ciclos formativos que pasarán por el CADE.

La Junta de Andalucía desarrollará durante este año el proyecto "Emprendejuven", dirigido a estudiantes de ciclos formativos en institutos de Enseñanza Secundaria de toda la Comunidad, a los que se pretende inculcar la cultura empresarial y asesorar para que diseñen sus propios proyectos. "Emprendejuven" se presentó el 22 de enero en el Centro Andaluz de Emprendedores (CADE).

con sede en el Parque Tecnológico de Andalucía, ante un grupo de estudiantes de la provincia de Cádiz que durante tres días fueron los primeros en recibir asesoramiento de algunas de las empresas instaladas en la tecnópolis. A lo largo del año, 840 alumnos —tras ampliar el cupo inicial de 600— procedentes de institutos de toda Andalucía acudirán al PTA para participar en este programa, que pondrá a los jóvenes con ideas en contacto con técnicos y atenderá especialmente a los proyectos relacionados con las nuevas tecnologías.

El director del CADE, Enrique Benítez, hizo en el acto de presentación de "Emprendejuven" el balance de este organismo durante su primer año de funcionamiento a lo largo del cual se han puesto en marcha 272 nuevos proyectos y se ha asesorado a 432 emprendedores. La mayoría de ellos son jóvenes menores de 35 años, de los que el 63 por ciento tiene estudios universitarios, el 66 por ciento son desempleados y casi el 70 por ciento son varones, aunque según Benítez se está produciendo "un cambio en lo que refiere a la participación de la mujer en las nuevas empresas".



* Parque Tecnológico de Andalucía.
REDE SOCIAL

EL PARQUE CIENTÍFICO Y
TECNOLÓGICO DE

ALBACETE

INICIA LA CONSTRUCCIÓN DE
SU PRIMERA FASE

*Momento de la colocación de la primera piedra
del Parque.*



El pasado mes de enero se celebró el acto institucional de colocación de la primera piedra del Parque Científico y Tecnológico de Albacete, el primero de estas características en Castilla-La Mancha. Se inicia así la primera fase del proyecto, con la construcción del Instituto de Investigación en Informática. Este centro será referencia de diferentes iniciativas y colaboraciones empresariales. Su principal objetivo es actuar como núcleo de investigación, desarrollo e innovación de las tecnologías de la información en la región, actuando como germen en la introducción de estas nuevas tecnologías en todos los ámbitos.

Las acciones previstas se completan con el inicio de la obra del Centro de Emprendedores en el primer semestre de este año, edificio que albergará la dirección del Parque y acogerá a las primeras empresas. Finalmente, dentro de las actuaciones previstas se incluyen la construcción, tras el verano, del Centro Tecnológico de Automática y Robótica y el Instituto de Investigación en Energías Renovables. Esta primera fase, de 32.000 m², que supone un 10% del espacio total ofertado, se completará con la construcción de un nuevo centro de empresas cuyo comienzo de obras está previsto para principios del próximo año. El montante global de estas acciones superará los 12 millones de euros.

Junto a estas instalaciones, en un espacio anejo, se ha proyectado un Jardín

Botánico de ocho hectáreas cuya construcción comenzará también en el primer semestre de este año. Este lugar de investigación y de esparcimiento, favorecerá la creación de un espacio de alta habitabilidad en el entorno del Parque.

Se completará así el desarrollo de la primera fase de este proyecto que tuvo su inicio con la constitución de la Fundación Parque Científico y Tecnológico de Albacete, a finales de 2001. Esta Fundación, promovida por la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, la Universidad Regional, el Ayuntamiento y la Diputación de Albacete, nace con el propósito de favorecer la creación de un entorno en el que se instalen y surjan iniciativas de corte innovador.

Para alcanzar este objetivo el Patronato de la Fundación ha definido unas áreas de interés preferente en las que inicialmente plantea desarrollar su actividad. Las áreas seleccionadas son: tecnologías de la información, energías renovables y medio ambiente, automática y robótica, y biomedicina. El objetivo básico es fomentar la participación empresarial en los proyectos de investigación y mejorar el nivel de innovación e investigación de empresas regionales.

El proyecto definido por la Fundación se apoya en las siguientes ideas que definen su identidad: mejorar el proceso de transferencia de tecnología y de innovación;

apostar por sectores estratégicos de alta tecnología; diseñar el proyecto ateniéndonos a un modelo basado en el desarrollo sostenible; potenciar la creación de iniciativas empresariales; buscar un diseño urbanístico apropiado que favorezca la interrelación entre empresa-empresa y empresa-universidad; y diseñar un espacio, integrado en la ciudad, con modernas infraestructuras y alta habitabilidad.

Para conseguir estas metas el Parque cuenta con una magnífica ubicación y un amplio respaldo social materializado en el apoyo de los agentes sociales, de las instituciones públicas, y de la Universidad de Castilla-La Mancha. Su ubicación en Albacete, primera ciudad en población de la región, ofrece una situación privilegiada en comunicaciones y un amplio desarrollo y dinamismo industrial, elementos esenciales para el éxito del proyecto. Además, Albacete alberga uno de los campus universitarios más importantes de la región, lo que garantiza el apoyo científico necesario básico para el desarrollo de esta ambiciosa iniciativa. Por último, Albacete cuenta con una magnífica tradición de entendimiento entre empresarios, universidad, sindicatos y administraciones públicas, con una cultura del diálogo y colaboración muy extendida y asentada.

En definitiva, el Parque Científico y Tecnológico de Albacete propone un modelo de Parque capaz de convertirse en impulsor de los procesos e iniciativas de innovación en el que empresas, centros de investigación y de desarrollo tecnológico, junto a la Universidad de Castilla-La Mancha den lugar a un nuevo tipo de espacio económico, cuyos efectos incidan eficazmente en la modernización del tejido productivo de Castilla-La Mancha y le permitan incorporarse con éxito a los nuevos retos que la Sociedad del Conocimiento plantea.

40

De izquierda a derecha:
Pascual González López,
director del Parque Científico
y Tecnológico de Albacete
D. Manuel Pérez Castell,
Alcalde de Albacete,
Rodrigo Hernández Perlines,
Consejero de Ciencia y
Tecnología JCCM,
D. Luis Arroyo Zapatero,
rector de la Universidad de
Castilla-La Mancha,
Pedro Antonio Ruiz Santos,
presidente de la Diputación
de Albacete.



INAUGURACIONES Y SEMINARIOS SOBRE
INNOVACIÓN EN EL PARQUE TECNOLÓGICO DE

ASTURIAS

PHOENIX CONTACT INAUGURA SU SEDE EN EL PARQUE TECNOLÓGICO DE ASTURIAS EL PRÓXIMO MES DE MAYO

El Grupo Temper ultima la construcción de un edificio de 2.800 m² en el que se ubicará próximamente una de sus sociedades, la empresa Phoenix Contact, dedicada al control de procesos industriales, campo que abarca desde la consultoría y formación específicas, hasta el diseño, montaje y distribución de componentes y aparatos para instalaciones eléctricas. La empresa fue creada en 1998 mediante una *joint venture* con el grupo alemán Phoenix Blomberg y en el 2000 contaba con una plantilla de 16 trabajadores en Asturias, en su mayor parte ingenieros. Con este proyecto, Phoenix Contact pretende cubrir las necesidades de crecimiento para la próxima década.

Entre las actividades de la empresa se encuentran el diseño, integración y comercialización de sistemas de automatización, conexión e interface

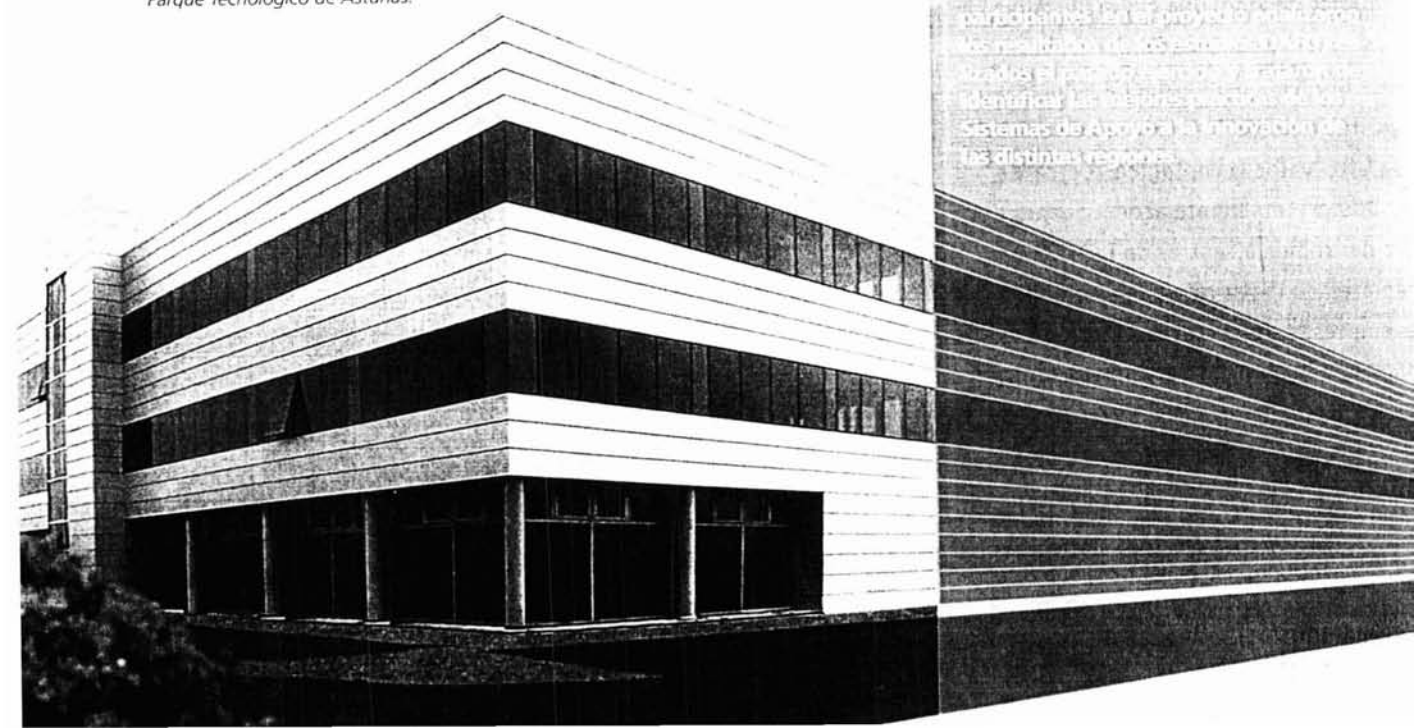
para equipos industriales, así como protecciones de circuitos contra transitorios.

De ellas destaca, por su carácter tecnológico, el diseño de sistemas específicos de automatización que son posteriormente implementados por ingenierías integradoras. Estos sistemas se basan en buses de campo industrial, compuestos por módulos de entradas y salidas de señales, una CPU, un software básico y un software de usuario específico para cada cliente.

Otras líneas de productos de la empresa son los sistemas de interfaz entre el proceso y los sistemas inteligentes, sistemas de conexión para tarjetas de circuitos impresos o cuadros eléctricos, conectores industriales, y cajas de protección de circuitos contra sobretensiones provocadas por transitorios.

Nueva sede de Phoenix Contact en el Parque Tecnológico de Asturias.

CELEBRACIÓN EN EL IDEPA DE UN SEMINARIO SOBRE METODOLOGÍA DE APOYO A LA INNOVACIÓN INCLUIDO EN EL PROYECTO EUROPEO INNOBA-SME



LA SEGUNDA FASE DE CENTROELENA, CON CASI 3.000 M² ÚTILES, AUMENTARÁ LA OFERTA DE OFICINAS EN EL PARQUE

El Grupo CEYD ha finalizado recientemente la construcción de la segunda fase de Centro Elena, edificio de iniciativa privada que cuenta con 3.178 m² construidos, de los que 2.948 m² útiles se destinarán a la venta de oficinas para la instalación de empresas. Este edificio es gemelo de la primera fase, inaugurada en junio de 2000, y hoy día ocupada prácticamente en su totalidad por empresas de los sectores de ingeniería, tecnologías de la información y comunicaciones, consultoría medioambiental y otros servicios avanzados de gestión empresarial. Este edificio, al igual que en años anteriores la primera fase, constituirá sin duda un puente que permita a las pequeñas empresas nacidas en el CEEI-Asturias disponer de una solución intermedia antes de abordar la construcción su propio edificio en una parcela del Parque. De momento, el edificio cuenta ya con

dos ocupantes, la Sociedad Regional de Turismo, SRT, que es una sociedad pública, destinada a contribuir al desarrollo turístico de la comunidad autónoma y el Club Asturiano de Calidad, asociación sin ánimo de lucro, cuya Secretaría ostenta el Instituto de Desarrollo Económico del Principado de Asturias. Su misión consiste en fomentar la cooperación entre las empresas para el desarrollo e implantación de la gestión total de la calidad, concienciar de la importancia de exigir y ofrecer niveles adecuados de calidad en productos y servicios, y divulgar la calidad a todos los niveles de la sociedad.



En la imagen, CENTROELENA.

NUEVO IMPULSO A

RABANALES 21

El Consejo de Administración del Parque Científico-Tecnológico de Córdoba, Rabanales 21, se reunirá la primera semana de abril para convocar la Junta General de Accionistas que habrá de decidir sobre la ampliación del capital social y sobre la forma y cuantía en que ésta se llevará a cabo. El interés manifestado por las entidades financieras de El Monte de Sevilla y Huelva y Cajasur de participar en esta ampliación de capital se debe compaginar con el derecho preferente de todos o parte de los actuales socios por mantener o ampliar su cuota de participación en la sociedad.

Esta ampliación se produce por la necesidad de incorporar 30 hectáreas, como resultado del concurso internacional de ideas convocado por la Gerencia de Urbanismo de Córdoba, y que se suman a las 36 hectáreas iniciales. En la parte norte de esa superficie se ubicará el

nuevo recinto de Exposiciones y Muestras. El equipo ganador del concurso de ideas, liderado por el arquitecto González Fustegueras, será el encargado de dirigir y coordinar los trabajos de elaboración de los documentos de ordenación urbanística de la zona.

Más de una docena de empresas han mostrado su interés por instalarse en Rabanales 21 bajo alguna de las modalidades establecidas: compra de parcelas, alquiler, alquiler con opción de compra,

concesión administrativa. Algunas de ellas se han puesto en contacto con la sociedad del Parque a través del portal Raitec (Red Andaluza de Innovación y Tecnología).

Por otra parte, Rabanales 21 participará en la próxima feria "Innovacor", que se celebrará en Córdoba entre el 3 y el 6 de abril próximo, con un stand en el que se dará a conocer el proyecto del Parque y participará en las Jornadas Técnicas organizadas con motivo de este evento.



Rabanales 21

PARQUE CIENTÍFICO
TECNOLÓGICO DE CÓRDOBA

EL PARC TECNOLÒGIC DEL VALLÈS

ABORDA LAS LÍNEAS DE SU FUTURO

Los máximos responsables del Parc Tecnològic del Vallès celebraron recientemente una reunión de trabajo, a la que asistió el Consejero de Trabajo, Industria, Comercio y Turismo del Gobierno Catalán, presidente de la Junta de Accionistas del Parque, para abordar las líneas maestras de futuro del PTV. El Parque se encuentra en un momento clave de su camino, ya que en su entorno se encuentran en juego, entre otras cuestiones, el ensanchamiento de Cerdanyola del Vallès con la urbanización de un área tecnológica de vital importancia para la ampliación del PTV. Ésta última prevé la construcción del Sincrotrón, que se convertirá, probablemente, en una de las instalaciones científicas y tecnológicas más grandes de España. También está en juego la llegada del TGV y la construcción del Túnel de Horta. A la reunión asistieron también el delegado especial del Estado en la Zona Franca, Enric Lacalle, que es vicepresidente de la Junta de Accionistas del PTV; el director general de Industria, Antoni Gur-

gui, presidente del Consejo de Administración del PTV, Jordi Toboso, consejero delegado del Parc Tecnològic del Vallès, y Xavier Mateu, director general del Parque. Tras el almuerzo que siguió a la reunión, el grupo se dirigió a las instalaciones del Centro Tecnológico de Pierre Fabre, centro de investigación de referencia mundial en nuevas tecnologías para la administración de medicamentos, ubi-

cado en el PTV, y se reunió con los representantes de la Asociación de Empresas del Parque. Posteriormente, el Consejero y el Delegado entregaron un reconocimiento a las empresas que desarrollan actividades en el PTV hace más de diez años, como A Novo Ibérica, ABT Ingeniería y Consultoría Medioambiental, ACCIT Integradores de Sistemas, Centro Catalán de la Calidad, etc.

ÉXITO DE LOS "DILLUNS DEL PARC"

De entre las iniciativas puestas en marcha a primeros de año en el PTV destacan, por su buena acogida entre los empresarios y trabajadores del parque, los "Dilluns del Parc", una iniciativa que prevé acercar a empresarios y trabajadores la realidad del mundo empresa-

rial desde varios ámbitos y que se vienen celebrando todos los meses con gran afluencia de público. La protección jurídica de las marcas en Internet, las deducciones para actividades en I+D+I o el e-learning, han sido algunos de los temas tratados hasta ahora.



Parque Tecnológico de la Universidad de Cádiz.

PREVISTOS 275.000 M² PARA LA PRIMERA FASE DEL PARQUE CIENTÍFICO DE LA UNIVERSIDAD DE

CÁDIZ

 **UCA** Universidad de Cádiz

La primera fase del Parque Científico de Cádiz ocupará una extensión de 275.000 m², repartidos entre los sectores naval, aeronáutico, construcción, transporte, automoción, agroalimentario, electrónico, informático, formación, medioambiente y sanitario.

Esta primera fase contará con un Centro Integrado de Tecnología de la Información, un Centro Andaluz de Investigación Vitivinícola, un Centro Andaluz de Ciencia y Tecnología Marina, Unidades de Investigación de los Hospitales Universitarios, el Consorcio Tecnológico de

Cádiz, una Incubadora de Empresas, una Biblioteca de Ciencia y Tecnología, un Centro Superior de Lenguas Modernas, Servicios Centrales de Ciencia y Tecnología y una Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación para Gestión de patentes.

www.ikerlan.es
www.mik.es
www.pologaraia.es

IKERLAN, Centro de Investigaciones Tecnológicas, impulsor del Polo de Innovación Garaia, junto con Mondragón Unibertsitatea y Mondragón Corporación Cooperativa, está participando de manera activa en las iniciativas de creación y desarrollo de tres centros de investigación:



para la investigación en Microsistemas, fruto de la alianza estratégica establecida con el Centro Tecnológico CEIT, de San Sebastián, y Mondragón Corporación Cooperativa.

CIDAE,

Instituto Universitario de Investigación, orientado a las áreas de la Distribución Activa y Electrotecnologías, promovido conjuntamente con Mondragón Unibertsitatea y el Centro Tecnológico Labelin, además de las Agrupaciones de Ingeniería y Consultoría, y de Sistemas y Servicios de MCC, Cegasa y el Grupo Ormazabal.



para la investigación en gestión o "management", creado junto con Mondragón Unibertsitatea, LKS Consultores, Agrupación de Ingeniería y Consultoría y Mondragón Corporación Cooperativa.



GARAIA

POLO DE INNOVACIÓN
BERRIKUNTZA GUNEA

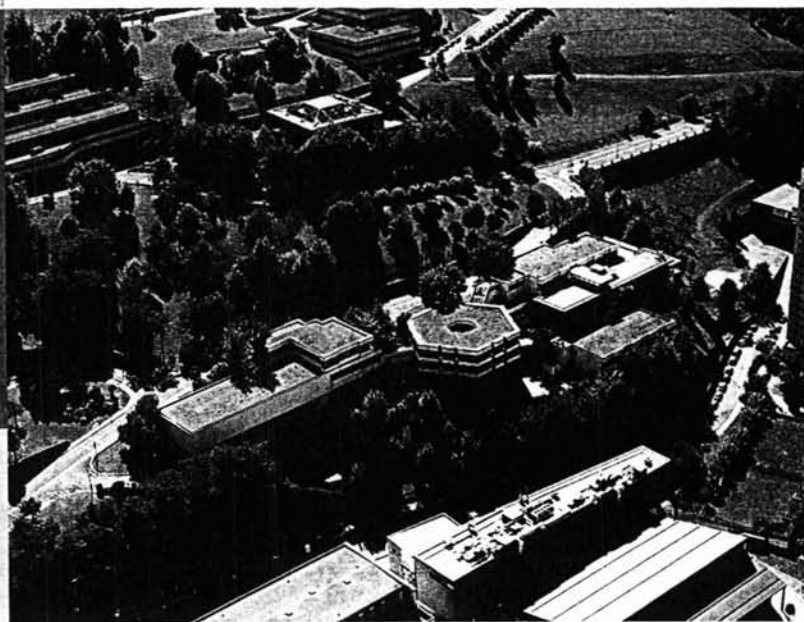
IKERLAN EN EL POLO

GARAIA

Además, IKERLAN, que tiene una trayectoria de muchos años de estrecha y permanente colaboración con numerosas empresas ha establecido recientemente sendos convenios de colaboración con Orona eic, Centro de Investigación en Elevación, y Fagor Ederlan, fabricante de componentes de automoción. Actualmente, cuenta con una plantilla de personal de más de 180 investigadores y técnicos, además de 41 becarios y ha ampliado y remodelado su infraestructura investigadora en sus instalaciones de Arrasate-Mondragón. Las nuevas instalaciones fueron inauguradas el pasado día 19 de febrero en un acto presidido por el Lehendakari del País Vasco, Juan José Ibarretxe.

torio de Microtecnologías; un laboratorio de ensayos con dos cámaras semianecoicas, para ensayos acústicos y de compatibilidad electromagnética; un sistema espectrofotométrico; un equipo de radiofrecuencia, y una máquina de prototipado rápido con tecnología FDM.

Para su financiación se ha contado con el apoyo del FEDER-Fondo Europeo de Desarrollo Regional, a través de los recursos asignados al Ministerio de Ciencia y Tecnología en el Programa de Investigación, Desarrollo e Innovación; y también con la ayuda del Gobierno Vasco; de Caja Laboral, a través del Fondo de Educación y



Polo de Innovación Garaia.

La ampliación inaugurada de 2.114 m² está distribuida en tres plantas, y eleva a 9.000 m² la superficie total cubierta de que dispone IKERLAN, en Arrasate, y en el Parque Tecnológico de Álava, en Miñano. La inversión de las nuevas instalaciones y equipos ha ascendido a 5,2 millones de euros, de los que 2,5 millones corresponden a la ampliación de edificios, 2,1 millones a equipamiento, y 0,6 a remodelación de antiguos edificios.

El nuevo equipamiento instalado comprende una Sala Blanca, como labora-

Promoción Intercooperativa (FEPI), y de la Diputación Foral de Gipuzkoa. Las nuevas instalaciones obedecen al impulso investigador que se desea dar a las áreas de Microsistemas, Comunicaciones, Electrónica, Sensores, Electrónica de Potencia e Ingeniería Mecánica, con el fin de promover el desarrollo integral de productos mecatrónicos, actividad en la que destaca IKERLAN, con una dilatada experiencia y un gran número de realizaciones en la innovación de productos y mejora de procesos productivos, en estrecha colaboración con las empresas-cliente.

EL PARQUE DE CASTILLA Y LEÓN,

EN CONTINUO CRECIMIENTO

Varias empresas duplican la superficie de sus instalaciones y otras nuevas se incorporan al Parque

El crecimiento que el Parque Tecnológico de Castilla y León, como empresa pública de la Consejería de Industria, Comercio y Turismo, ha experimentado desde su creación, continúa siendo un hecho constatado en la actualidad (ha pasado de tener 9 empresas en 1993 a las 88 con las que cuenta hoy en día). A la incorporación de nuevas empresas en el recinto hay que sumar también la ampliación de instalaciones realizada por las entidades ya situadas en el Parque. Éste es el caso de Thales Information Systems, que duplica su superficie

en el Parque debido, principalmente, al crecimiento que la empresa ha experimentado a lo largo del año 2002, según explican sus propios responsables. Esta empresa de ingeniería y desarrollo de aplicaciones software para telecomunicaciones ofrece asistencia técnica a Telefónica I+D, también instalada en el Parque Tecnológico. Además de Thales Information Systems, la empresa Acotel también ha duplicado la superficie de sus instalaciones. Acotel, cuya labor se centra en actividades de consultoría y telecomunicaciones, lleva presente en el Parque Tecnológico de Castilla y León desde el año 2001, fecha en la que se ubicó en el edificio Centro para pasar un año más tarde al edificio Galileo.

Además de la ampliación de instalaciones, en las últimas semanas tres nuevas empresas o entidades han establecido su sede en el Edificio Galileo. Se trata de AENOR, Áttico (asociación empresarial sin ánimo de lucro cuya finalidad es mejorar la competitividad de las empresas mediante el desarrollo de actividades

de investigación, desarrollo tecnológico e innovación) y Aries Estructuras Aeroespaciales, ARESA. Esta última empresa ha establecido su base de operaciones en Boecillo para desarrollar su actividad: la fabricación de componentes estructurales en materiales compuestos para la industria aeronáutica.

También la empresa Conertec ha adquirido en el recinto 2 una parcela con una superficie de más de 5.000 metros. Conertec, fundada en 1997 y con sede en Madrid, creará un Centro Tecnológico Criogénico, proyecto con el que pretende culminar el desarrollo de la empresa en la tecnología de tratamiento criogénico de gases y en la ingeniería-consultoría de aplicaciones de la energía y asesoría general de tecnología industrial.

El Parque Tecnológico de Castilla y León cuenta ya con un tercer recinto de 58 hectáreas más de terreno para dar cabida a nuevos proyectos empresariales de alto contenido tecnológico.

El Edificio Galileo ha sido diseñado y concebido para empresas tecnológicas y departamentos de investigación que quieran establecer su sede en régimen de alquiler a precios altamente competitivos.



PROYECTOS PUNTEROS PARA EL DESARROLLO REGIONAL

El Parque Tecnológico de Castilla y León, empresa pública de la Consejería de Industria, Comercio y Turismo, alberga en su recinto 91 empresas avanzadas tecnológicamente cuyos procesos se encuentran en constante innovación y continuo desarrollo. Algunos de los proyectos que se realizan en el seno del Parque, son los que a continuación comentamos y que han recibido el apoyo y soporte de la consejería de Industria, Comercio y Turismo.



Edificio de CIDAUT.

CIDAUT COLABORARÁ CON ARIES ESTRUCTURAS AEROESPACIALES EN LA REALIZACIÓN DE PIEZAS PARA EL AIRBUS A380

ARIES Estructuras Aeroespaciales, ARESA, dedicada como ya se ha explicado a la fabricación de componentes estructurales en materiales compuestos para la industria aeronáutica, se ha incorporado recientemente al Parque Tecnológico de Castilla y León, y ha adquirido una parcela de 29.000 metros cuadrados sobre la que construirá un edificio en el que fabricará los elementos estructurales de los timones de dirección y de profundidad del AIRBUS A380. El programa A380 constituye uno de los más ambiciosos de AIRBUS y para su adecuado desarrollo se requiere a los proveedores que compartan los más altos estándares de calidad, exigiéndoles una gran fiabilidad en las piezas que se fabriquen. En este sentido, ARIES apuesta por la introducción de nuevas tecnologías en su proceso de fabricación, que a su vez le permitan situarse a la vanguardia del sector aerodinámico español. CIDAUT, Centro para la Investigación y desarrollo en Automoción, con sede en el Parque Tecnológico de Boecillo, Valladolid, colaborará con ARIES en la investigación y estudios de viabilidad técnica de muchas de estas tecnologías, aportando sus conocimientos en materiales y su procesado.

TECDIS, PANTALLAS LÍQUIDAS A TODO COLOR

TECDIS, empresa líder en la fabricación y diseño de visualizadores de cristal líquido, está haciendo realidad un ambicioso proyecto que verá la luz en próximas fechas. Aunque ya cuenta con displays con escalas de grises, está trabajando en la elaboración de visualizadores a color cuyos primeros prototipos contarán con 4096 colores. En el futuro, TECDIS pretende diseñar pantallas líquidas que cuenten con 64.000/128.000 colores. Las aplicaciones de estos visualizadores son de lo más diversas, desde



telefonía hasta ascensores, autobuses urbanos, taxis, etc. De forma paralela, trabajan en displays para la industria del automóvil, colocando sus displays en algunos de los coches más vendidos en España y en Europa.

Por último conviene señalar la intervención de Tecdis Displays Ibérica en varios proyectos de I+D, tanto a nivel nacional como internacional, participando en la realización de los mismos con universidades e importantes empresas europeas.

COLLOSA REUTILIZA ARENAS DE FUNDICIÓN PARA CARRETERAS

En los laboratorios de Collosa, situados también en Boecillo, se están llevando a cabo varios proyectos con un denominador común, el cuidado del entorno medioambiental.

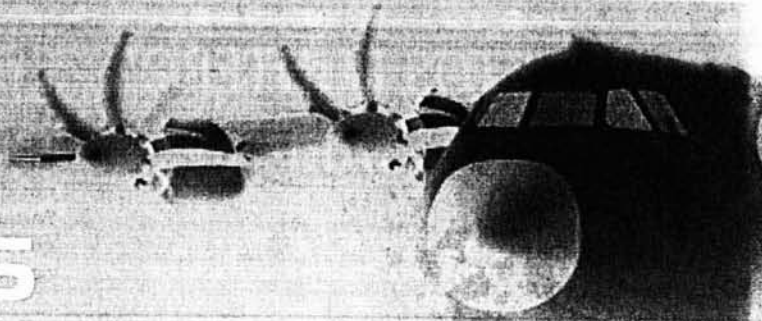
Collosa ha creado una mezcla que reutiliza las arenas procedentes de los residuos de fundición de la empresa Lingotes Especiales y los ha empleado como material alternativo para la construcción de carreteras. Collosa, que también lleva a cabo obras correspondien-

tes a gasoductos, ha decidido reutilizar estas arenas de residuos de fundiciones para rellenar las zanjas, esta vez sin mezcla de ningún tipo. Con ello consigue ahorrar recursos naturales, ya que evita usar arena virgen, y logra una ventaja añadida en escenarios un tanto delicados, ya que al tratarse de un material con un color peculiar, aquellas zanjas que discurren por áreas agrícolas son perfectamente identificables para los trabajadores que operan en ellas y pueden evitarse así posibles percances.

Desde el Parque Tecnológico de Castilla y León, Acotel, S.A. presta una serie de servicios enfocados a Internet, destinados a elevar la competitividad de la PYME. Si alguna vez se ha preguntado: ¿Cómo puedo facturar eficientemente mi prestación de servicios de voz y datos? TARIFICACIÓN ONLINE lo hará. ¿Cómo saber cuál es el perfil de mis clientes y sus gustos sin incómodas encuestas? GESTIÓN DE SERVICIOS DE PORTAL le ayudará. ¿Cómo puedo guardar una relación estrecha con mis clientes aunque no les conozca, acoplándome en todo momento a sus necesidades? E-CRM le ayudará. ¿Dónde puedo albergar la máquina con la que presto mis servicios a través de Internet, dando un servicio de calidad, rápido y continuado? HOUSING lo hará. ¿Tengo que contratar a 5 personas para mantener funcionando mis sistemas 24 horas al día? MONITORIZACIÓN lo evitará.

LA INDUSTRIA AERONAUTICA
ANDALUZA DESPEGA DESDE

AERÓPOLIS



El Parque Tecnológico Aeroespacial de Andalucía es una de las grandes apuestas de la Junta de Andalucía en su política de fomento del desarrollo tecnológico regional. Desde Aerópolis, el Gobierno andaluz espera que la industria aeronáutica andaluza despegue y se eleve hasta convertir a Sevilla en el tercer centro aeronáutico de Europa, tras Toulouse y Hamburgo. Un objetivo ambicioso pero posible y en el que el Parque, será una pieza fundamental.

Concebida como una moderna ideópolis o ciudad del conocimiento dedicada en exclusiva a las industrias del sector aeroespacial y tecnológico, Aerópolis nace por iniciativa conjunta de la Consejería de Empleo y Desarrollo Tecnológico y el Ayuntamiento de La Rinconada, con la intención de reunir en un único espacio a la industria auxiliar y sus empresas tractoras e impulsar así el desarrollo del sector. El convenio entre ambas instituciones se fraguó en 1999, al calor de las expectativas que despertó que EADS, fabricante aeronáutico líder del sector en Europa, escogiera Sevilla para el montaje, entrega y revisiones del nuevo avión de transporte militar pesado A-400M, así como la fabricación de componentes importantes del nuevo avión de transporte civil A-380.

La ubicación de Aerópolis responde a criterios estratégicos. Su cercanía al Aeropuerto Internacional de San Pablo, en la autovía Sevilla-Madrid, y su conexión directa con el Puerto de Sevilla mediante la futura circunvalación SE-40 hacen particularmente valiosa la situación geográfica de este espacio. Una ventaja nada desdeñable para las empresas que se instalen en el Parque, pero desde luego no la única. Las firmas que allí se establezcan contarán con una infraestructura de máxima calidad. Sus 580.000 metros cuadrados de superficie total se reparten entre 140.000 metros cuadrados de sistemas generales y viarios, 120.000 metros cuadrados de áreas

verdes y equipamientos sociales y deportivos, 20.000 metros cuadrados destinados a edificios comerciales y de oficinas, y 300.000 metros cuadrados de parcelas industriales. La dimensión de las parcelas está concebida, además, para adaptarse a cualquier tipo de empresa aeronáutica y tecnológicas, existiendo incluso la posibilidad de hacer agrupaciones para usar parcelas de mayor tamaño. Éstas podrán ser de uso industrial modular, en parcelas de unos 1.100 metros cuadrados, o aislado, en parcelas de unos 6.000 metros cuadrados.

Uno de los valores que Aerópolis, sociedad gestora del Parque, está promoviendo para atraer las inversiones foráneas es la calidad de vida que tanto el propio Parque como su entorno —la ciudad de Sevilla— permitirá a todos los trabajadores.

Aerópolis presenta, además, como ventaja competitiva frente a otros emplazamientos, la posibilidad de

instalarse en un entorno confortable, estético, respetuoso con el medioambiente, idóneo en suma para el establecimiento de una empresa aeronáutica o tecnológica moderna. El atractivo de Sevilla, con su amplio patrimonio cultural, su clima y su particular idiosincrasia, también puede favorecer la inversión de empresas que pretenden encontrar la perfecta combinación entre la calidad de vida y el adecuado entorno empresarial.

Además de aportar el marco físico y tecnológico más avanzado, Aerópolis desempeñará una importante labor gestora y administrativa, poniendo a disposición de las empresas aeronáuticas servicios que les darán solidez y potenciarán la cohesión y respuesta de la industria aeronáutica. Entre otros, las empresas se beneficiarán de servicios comunes avanzados, como una red telemática, un centro distribuido en red, que conectará a las empresas con la RAITEC (Red Andaluza de Innovación y Tecnología), una incubadora de empresas, un centro de excelencia, un observatorio aeronáutico y un portal de Internet.

Por si fueran pocas estas ventajas, la Consejería de Empleo y Desarrollo Tecnológico, debido al carácter estratégico del sector, ha establecido ayudas para la localización de empresas en el Parque que pueden llegar hasta el 50% de las inversiones o el 65% en el caso de las pymes. Asimismo, ha promovido importantes acciones de formación profesional para responder a las demandas de empleo de los proyectos que se avecinan.

Todo ello para que Aerópolis sienta las bases y se convierta en un instrumento esencial en el desarrollo del sector aeronáutico andaluz, constituyéndose en referencia obligada de la industria aeroespacial europea. Este desarrollo tiene una incidencia básica en el esfuerzo de la Segunda Modernización propuesta por la Junta de Andalucía.

AERODINAMIA, FORO DE ENCUENTRO

Una de las actividades desarrolladas por Aerópolis ha sido la constitución de Aerodinamia, un foro de encuentro de la administración, las empresas y, en general, todos los agentes implicados en el desarrollo del sector aeronáutico, para debatir estrategias, informar de iniciativas públicas, líneas de financiación y ayudas económicas, formular propuestas en materia de formación, y en suma, reflexionar sobre todo lo que concierne al progreso de la industria aeronáutica andaluza. El foro se reúne semestralmente (ya ha celebrado dos sesiones) y recoge las conclusiones del Foro Aeronáutico de Andalucía que, con periodicidad mensual, se celebra en la Escuela Superior de Ingenieros de Sevilla.

JORNADA DE PUERTAS ABIERTAS EN LOS

PARQUES VASCOS

La Red de Parques Tecnológicos de Euskadi ha abierto sus puertas un año más con el objetivo de acercar y dar a conocer a la sociedad su actividad y la de las empresas instaladas en cada Parque. Año tras año, descubrir *in situ* la realidad de estos espacios dedicados a la ciencia y la tecnología suscita el interés

de un mayor número de personas y, en esta edición, se han reunido más de 10.500 visitantes. Durante esta Jornada de Puertas Abiertas, además de las instalaciones propias de los Parques, se pueden visitar algunas empresas que también participan en la iniciativa. El acto se coordina de tal forma que cada cual dis-

fruta de las diferentes actividades según su edad. El reto es que mayores y pequeños aprovechen este día para conocer de cerca la realidad cotidiana de los Parques Tecnológicos, que cada año se esfuerzan más en conseguir unos resultados óptimos para esta jornada científico-lúdica.



BIZKAIA

A pesar de que amaneció con bastante frío, a medida que pasaban las horas el ambiente del Parque Tecnológico de Bizkaia cogía más calor. Cerca de 7.000 personas acudieron al recinto empresarial para conocer las empresas ubicadas en el Parque Tecnológico de Bizkaia, sus productos o la tecnología empleada.

El público que se desplazó al Parque pudo visitar las empresas Gai-ker, Robotiker, Sarenet, Web Activa Idiomas o ZIV. Además, la entrada del Edificio 101 acogió una exposición del centenar de empresas que se hallan en el Parque Tecnológico de Bizkaia.

Por su parte, los más pequeños disfrutaron en la Sala Mendiko del taller de "Ciencia Divertida", donde se mostraron distintos experimentos para acercar a los niños los entresijos de la ciencia, y en la Sala Txorierrí pudieron conectarse a Internet. Asimismo, se instaló un parque infantil que, además de hinchables, incluía juegos rurales vascos y karts.

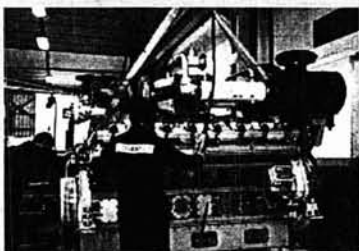
Durante toda la mañana se proyectó en el Auditorio el video de presentación del Parque Tecnológico, mientras que por el exterior un tren txu-txu recorrió el recinto y explicó la actividad de algunas de las empresas. El tren se detuvo en aquellas entidades que tomaron parte en la Jornada, como Sarenet y Web Activa Idiomas (en el Edificio 103), y en Ingelectric Team. Fue posible conocer los Centros Tecnológicos y las nuevas tecnologías del mundo agrícola y subirse al autobús de la Sociedad para la Promoción y Reconversión Industrial (SPRI), en el que hubo una docena de ordenadores con conexión a Internet. Durante esta edición, se presentó como novedad la zona agrovasca, donde el visitante pudo degustar productos típicos vascos y recibir técnicas de cata de txakoli, todo ello al ritmo de dulzaineros y trikitixa.



ÁLAVA

El Parque Tecnológico de Álava es veterano en la celebración de la Jornada de Puertas Abiertas y durante sus cinco ediciones ha logrado acercar a más de 10.000 personas al Parque Tecnológico. En esta quinta edición, alrededor de 1.500 visitantes disfrutaron del evento organizado por el Parque en colaboración con sus socios (SPRI, Diputación Foral de Álava, Ayuntamiento de Vitoria-Gasteiz y otras entidades, como Caja Vital), con el patrocinio de Euskaltel y Rima. Una de las actividades de mayor éxito fue el Aula de "Ciencia Divertida", donde los más pequeños gozaron con las sorpresas de la tecnología.

Como novedad de esta Jornada, el Parque organizó dos concursos: uno de fotografía digital y otro de diseño de páginas web. El público que se desplazó al Parque tuvo también la oportunidad de visitar los Centros Tecnológicos y de



subirse al autobús de la Diputación Foral de Álava, equipado con una docena de ordenadores con conexión a Internet. Además, los visitantes pudieron disfrutar, entre otras, de las siguientes actividades: exposición de empresas, proyección de audiovisuales y charlas informativas, como la ofrecida por el director del Centro de Tecnologías Aeronáuticas (CTA), Juan Pedro Vela.

SAN SEBASTIÁN

El Parque Tecnológico de San Sebastián dio la oportunidad a las más de 2.000 personas que se reunieron en sus instalaciones de asistir a demostraciones de Televisión Digital Terrestre, jugar partidas simultáneas de ajedrez inalámbrico, realizar visitas guiadas por el robot MIRELa, a salas PCs con juegos y a un aula de "Tecnología Divertida" para niños, y conocer el centro de investigación INASMET. Los beneficios de la tecnología se presentaron de manera amena y apta para todos los públicos. Asimismo, fue posible conectarse a Internet mediante ordenadores portátiles, sin cables y comprobar cómo funcionan los juguetes con energía solar. El Consejo de Inuestida, Josu Jon Imaz, y su familia fueron algunos de los visitantes que se acercaron a las instalaciones del Parque, en una de las cuales, concretamente en el hall del Edificio Central, se ubicaron stands con empresas y centros de investigación del Parque Tecnológico y paneles explicativos de su actividad. En el Auditorio del Edificio Central se realizaron demostraciones tecnológicas de última generación, como una visita guiada por el robot MIRELa que cada año aprende cosas nuevas de la Inteligencia Artificial, pasando a una visita virtual al Estadio de Anoeta o a una demostración de la tecnología de vídeo de tres dimensiones. También se realizó una demostración de la tecnología de la televisión digital, mostrando cómo funciona y cómo se puede utilizar. Además, se ofreció una charla informativa sobre la tecnología de la televisión digital, explicando los beneficios que ofrece a los usuarios. La jornada concluyó con una actuación musical en el patio del Edificio Central, donde un grupo de músicos tocó canciones populares vascas. El evento fue muy exitoso y recibió la participación de un gran número de visitantes, especialmente familias con niños.



EL PARQUE CIENTÍFICO DE MADRID

YA TIENE SEDE EN LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA

Cuenta con más de una docena de actividades y proyectos en marcha.

INCUBADORA DE EMPRESAS

Desde marzo de 2002, el Parque Científico de Madrid tiene ya sus oficinas en el Pabellón C de la Universidad Autónoma. En su nueva ubicación, el Parque dispone de aulas y un auditorio, lo que permite llevar a cabo sesiones informativas y divulgativas, y ha comenzado a ejecutar la Fase I de la Incubadora de Empresas. En esta primera fase, a las *spin-off* surgidas en el entorno de las entidades promotoras del PCM se les suministran despachos amueblados y equipados para labores de oficina. En una segunda fase, se proporcionarán laboratorios y facilidades experimentales en el edificio SCAI, cuyas obras se iniciarán pronto. La incubadora alberga en el momento actual a las siguientes empresas:

- > Phylum: Servicio de Investigación biomarina.
 - > Genetrix: Inmunología y oncología molecular.
 - > Actea: Servicios de gestión medioambientales.
 - > Nanoter: Electrónica, Nanotecnología y producción de microscopios de efecto túnel.
 - > Címera: Desarrollo de proyectos medioambientales.
 - > Inatsys: Desarrollo de Software y aplicaciones de Internet.
 - > Integromics: Tecnología de la información para Ciencias experimentales.
- Las actividades de estas empresas han generado hasta el momento actual más de 40 puestos de trabajo para licenciados y doctores.

REUNIONES THINK-TANK

Durante 2003, se realizarán Cumbres de dos días para cada área del PCM. En cada una de ellas participarán los líderes de opinión científica y empresarial de esa área. Ya están previstas las de Nanotecnología, Microanálisis de Materiales y Genómica.

PROYECTOS EN LOS PRÓXIMOS 6 MESES:

- > Incorporación de la red europea PHANTOMS al PCM.
- > Iniciación de las obras del edificio del SCAI e Incubadora de Empresas.
- > Iniciación de las obras del edificio Instituto de Nanotecnología y Diseño Molecular.
- > Ampliación del número de empresas de la Incubadora.
- > Creación de Incubadora de *spin-off* en red.

52

RECURSOS HUMANOS Y GESTIÓN PROPIA

Desde el mes de junio, el PCM ha asumido su gestión de forma directa, con el alta en el IAE y en la Seguridad Social, por lo que ha incrementado el personal de administración. El personal investigador ha aumentado con la incorporación del Círculo Tecnológico de Agroalimentación, y la contratación de técnicos, becarios y doctores para los servicios científicos en vigor y los de próxima inauguración. Desde octubre, Bonifacio Vega es Director de Desarrollo Empresarial del Parque.

CONSEJO EMPRESARIAL

Se está creando un Consejo en el que se integrarán unas 50 empresas, al menos 4 de cada área de interés del PCM, que aporten cada una 9.000 euros al año. El Consejo se reunirá una vez al año en su conjunto para elaborar programas de desarrollo científico empresarial por cada sector.

PATRONATO

Recientemente se ha incorporado al Patronato del PCM el Presidente de la Cámara de Comercio e Industria de Madrid, Fernando Fernández Tapias.

FONDO DE CAPITAL-RIESGO

Se está creando un fondo que estará operativo a lo largo del 2003, para ayudar a las *spin-off* del PCM.

SOCIOS TECNOLÓGICOS

Son unas 10 empresas que aportarán 18.000 euros al año y tendrán una relación especial con el PCM. Serán

proveedores preferenciales de tecnología y clientes prioritarios de las innovaciones que partan del PCM.



PROGRAMA DE FORMACIÓN DE EMPRENDEDORES

Está pensado para ayudar a los emprendedores, por ejemplo, a redactar el plan de negocio, a hacer estudios de mercado, ofrece información sobre requisitos administrativos y asesoría, etc. Para comenzar sus actividades, el Programa dispone de despachos en la sede del Parque. En estos momentos, en el PCM hay ya más de diez ideas emprende-

doras de base tecnológica, entre las que destacan:

- > **Neurotec:** Terapias moleculares para enfermedades neurodegenerativas.
- > **Interaxn:** Desarrollo de biochips para proteómica.
- > **Abios:** Bioremediación de suelos y aguas.
- > **Technology & Cristals:** nuevos materiales.

INSTALACIÓN DE LOS SERVICIOS CENTRALES EN RED DE GENÓMICA (SECUENCIACIÓN Y CHIPS DE DNA), PROTEÓMICA Y BIOLOGÍA COMPUTACIONAL

El PCM ha adquirido equipos por valor de 3.2 millones de euros y ha contratado personal para su puesta en marcha, por lo que a partir del mes de abril estos servicios científicos estarán operativos y a disposición de centros de investigación públicos y privados.

ÁNGELES GIL, NUEVA DIRECTORA GENERAL DE

CARTUJA 93

El Consejo de Administración de Cartuja 93 nombró el pasado día 24 de febrero a Ángeles Gil como nueva directora general de Cartuja 93, tras la marcha de Francisco Mencía al Instituto de Fomento de Andalucía (IFA). Ángeles Gil, licenciada en Derecho y con una dilatada experiencia en materia financiera y de gestión, ha desempeñado últimamente su actividad como directora-gerente de la Sociedad Sevilla Siglo XXI. Igualmente, entre otros cargos, ha sido presidenta y consejera delegada de la sociedad de capital riesgo Sevilla Seed Capital, S.A, Consejera Delegada de Sevilla Activa, S.A., Directora del Área de Cooperación de la Diputación Provincial de Sevilla, Directora de Proyectos del Centro de Empresas EUROCEI y gerente del Centro de Empresas Riotinto (Huelva).

El nombramiento de Ángeles Gil tuvo lugar tras los contactos que el presidente de Cartuja 93 y consejero de Empleo y Desarrollo Tecnológico, José Antonio

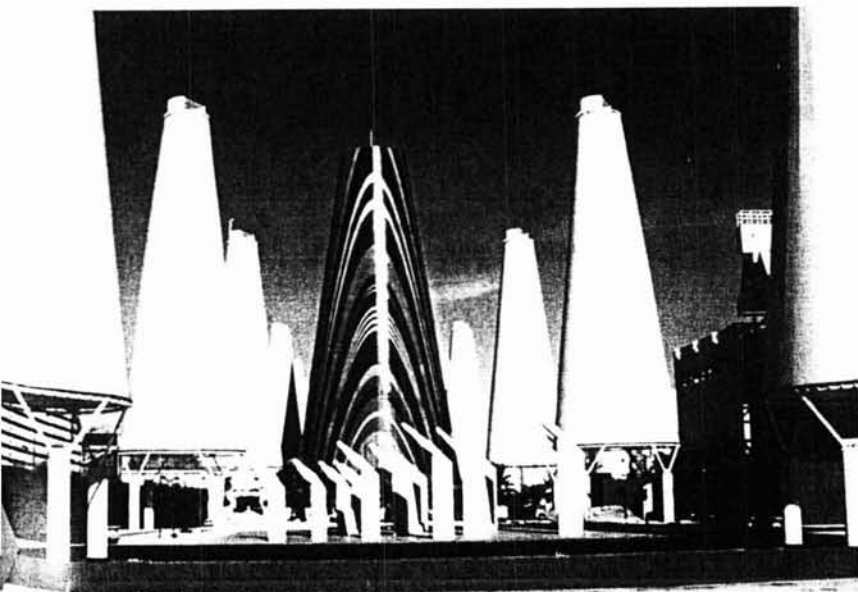
Viera, mantuvo con los diferentes accionistas de la Sociedad, en la que están representadas la Junta de Andalucía (51%), la Administración General del Estado (con el 34%), el Ayuntamiento de Sevilla (con el 10%) y la Diputación Provincial de Sevilla (con el 5%)

El reto de Ángeles Gil ya no será tanto atraer grandes empresas al parque, pues los espacios de Cartuja 93 están prácticamente colmatados, aunque es cierto que será ella, probablemente, de todos los directores que han pasado por Cartuja, la que más empresas reciba en los espacios contenedores y centros de empresas que se están construyendo en la actualidad. Su principal reto es convertir Cartuja 93 en un espacio de "sinergias" para mejorar las relaciones y el conocimiento entre las empresas instaladas en el parque, para que empresarios y científicos dialoguen, para que quienes desarrollan o tienen patentes contacten con quienes están interesa-



dos en ellas, etc. Para Ángeles Gil, "el objetivo del parque en los próximos meses será también facilitar escenarios de comunicación entre la tecnópolis sevillana y otros parques científicos y tecnoparques andaluces, así como con los polígonos industriales en general. Su idea, por tanto, es "crear redes de contacto sólidas tanto dentro como fuera del parque".

La mayor aspiración de la nueva directora general de Cartuja 93 es lograr que los empresarios de la isla se sientan a gusto en ese recinto y que las instituciones y empresas instaladas en el parque consigan grandes dosis de valor añadido. De hecho, ya ha anunciado su voluntad de reunirse con todos aquellos empresarios que lo soliciten. Está convencida de que muy pronto será un privilegio instalarse en el Parque Científico y Tecnológico de Sevilla, formando parte de la comunidad de Cartuja 93. Para Ángeles Gil, "el Parque tiene que convertirse en un gran "centro del conocimiento", en el que empresas, centros de I+D y universidades puedan generar un nuevo tipo de espacio económico que contribuya a la modernización del tejido productivo de Andalucía y favorecer los procesos de prospectiva y transferencia tecnológica, de investigación y formación".





Por Miguel Ángel Pérez Pérez

Vicepresidente - Consejero Delegado del Parque Tecnológico de Galicia

LA TELEFORMACIÓN COMO OPORTUNIDAD DE FUTURO

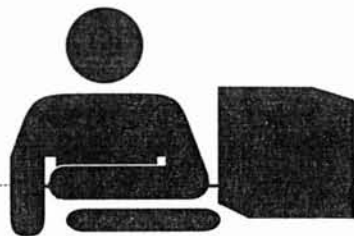
Más cómoda, más rápida, más eficaz... No se trata de un eslogan publicitario sino de una realidad que cada día se hace patente cuando encendemos nuestro ordenador. Si Internet nos ha traído la revolución de las comunicaciones, una de sus consecuencias ha sido la "e-educación" a la que actualmente estamos asistiendo: se estima que en 2005 el 60% de las medianas y grandes empresas serán usuarias de este método de formación a distancia que, en la actualidad, es utilizado por el 5% de las empresas.

Este despunte tiene su razón de ser en las grandes ventajas que ofrece la educación a distancia, cuyas raíces están en la potencia, facilidades y posibilidades pedagógicas que ponen a nuestra disposición las nuevas tecnologías. Según refleja el informe sobre el estado de la Teleeducación en España, publicado por la Asociación de Usuarios de Internet y la Universidad Carlos III, estas ventajas se basan en una personalización del aprendizaje, atendiendo a las distintas capacidades, conocimientos e intereses de cada alumno, y en el hecho de que la teleformación permite el acceso a la información de personas aisladas geográficamente o con dificultades físicas. Esto proporciona la creación de un mercado global en el que las instituciones tradicionales, incluso de regiones periféricas, competirán con las nuevas iniciativas públicas y privadas.

De esta forma, el uso de las nuevas tecnologías no sólo permite que la enseñanza no esté anclada en una determinada localización geográfica, sino que además permite trascender este hecho. Los cursos de teleformación ofrecen la posibilidad de ser realizados en cualquier período de tiempo, pudiendo comenzar un mismo curso en cualquier momento del año, sin olvidar que los contenidos y materiales docentes se pueden actualizar

constantemente, atendiendo a los cambios en la materia impartida, las necesidades de los alumnos, etc. Asimismo, la realidad virtual permite la creación de interfaces atractivas para el alumno y la posibilidad de simular experiencias que de otro modo resultarían caras o poco accesibles para el estudiante.

Teniendo en cuenta estas reflexiones, y partiendo del principio de promover iniciativas que favorezcan el fomento de la actividad innovadora, diversos parques tecnológicos han sido pioneros en la impartición de cursos de formación



basados en la teleeducación, centrando su oferta formativa en aquellos campos de las nuevas tecnologías cuya resultante es eminentemente práctica para el alumno. A las ya habituales disciplinas relacionadas con las aplicaciones informática se unen las de Teleformación, Periodismo Electrónico, Televigilancia y Teleasistencia, entre otras, que complementan la formación en estas nuevas disciplinas de negocio, demandadas por la sociedad actual.

Sin duda, el futuro de la teleformación exhibe una visión muy prometedora, donde las oportunidades de negocio serán ciertamente interesantes. Un dato sustenta mi optimismo al respecto: la teleeducación en España es un sector joven, que está experimentando un importante proceso de expansión; aunque también es cierto que, como conse-

cuencia de esta juventud y de la falta de tradición, el lugar que la teleformación va a ocupar en el panorama educativo español no está, todavía, claramente definido.

Para ello es necesario desarrollar campañas informativas y divulgativas que acerquen a la sociedad las excelencias de la "Nueva Educación", y también implementar infraestructuras de comunicación y herramientas de teleformación más eficaces y prácticas. Las herramientas teleeducativas más poderosas son aquellas que permiten al alumno abstraerse del hecho de que existe una distancia física entre él y sus compañeros y profesor; y las que mejor logran este propósito son aquellas que requieren de una enorme cantidad de recursos, en concreto, velocidad en las conexiones entre los participantes, para poder funcionar de forma correcta.

En definitiva, yo apuesto por la teleformación como una herramienta de futuro en el ámbito de la educación. No basta, por supuesto, con elogiar la panacea de Internet, puesto que aún queda un largo trecho por recorrer hasta alcanzar los niveles de calidad óptimos para que el aprendizaje sea un fluir interactivo de conocimientos. Con las mejoras en la Red vendrán las mejoras en las herramientas teleeducativas, y con ella aumentará el número de alumnos interesados en los nuevos métodos. Consecuentemente, se incrementará la oferta de centros, instituciones y organismos dispuestos a destinar mayores partidas a esta disciplina, y poco a poco nos iremos instalando en una cultura del conocimiento que llegará a adaptarse a nuestras necesidades. Y la "educación a la carta" ya no será la utopía de unos cuantos románticos de Internet; será, sin ir más lejos, la consecuencia de una búsqueda constante por disponer de una mejor calidad de vida.



Se estima que en 2005 el 60% de las medianas y grandes empresas serán usuarias de este método de formación a distancia que, en la actualidad, es utilizado por el 5% de las empresas.

55



Con las mejoras en la Red vendrán las mejoras en las herramientas teleeducativas, y con ella aumentará el número de alumnos interesados en los nuevos métodos.



EMPRESA INVITADA

GRUPO NOVASOFT, NACIMIENTO Y CONSOLIDACIÓN DE UN GRUPO LIGADO AL PTA

El nacimiento de Novasoft va ligado a la historia del Parque Tecnológico de Andalucía, donde surgió esta empresa hace ahora diez años, que son también los que cumplió el parque malagueño el pasado mes de diciembre.

Esta empresa, con un capital 100% andaluz, factura alrededor de doce millones de euros al año y es un referente andaluz en el mercado internacional de la TICs.

Nació Novasoft en un parque que aspiraba a convertirse en un núcleo de dinamización para Andalucía, en un espacio en el que se generasen conocimientos científicos y tecnológicos, donde se implantasen actividades industriales y de servicio de alta calidad y donde se establecieran unas estructuras de formación orientadas hacia las empresas e instituciones. A la vuelta de los años, Novasoft se ha convertido en un claro exponente del éxito de esta filosofía que acuñó el nacimiento del parque de Campanillas.

Los datos económicos y de mercado así lo indican. Esta empresa, con un capital 100% andaluz, factura alrededor de doce millones de euros al año y es un referente andaluz en el mercado internacional de la TICs, en el que ofrece soluciones globales e integradas en tecnologías de la información, diseño de aplicaciones, consultoría tecnológica, de calidad y medioam-

biental. Las claves para el éxito de esta empresa las tiene su presidente, Francisco Barrionuevo Novo, un joven emprendedor que ha buscado desde los orígenes del grupo diversificar los servicios.

Desde Málaga a la conquista de mercados internacionales

Actualmente, el Grupo Novasoft está formado por las empresas Novasoft Ingeniería, Novasoft Formación, Novasoft Sanidad y Novasoft Consulting, aunque la actividad inicial fue en el campo de la medicina, en concreto, un trabajo para el Servicio Andaluz de Salud que consistía en un programa de historias clínicas con el que ganaron prestigio. El posterior desarrollo de la herramienta de gestión sanitaria NovaHIS les abrió las puertas del mercado en Sistemas de Información Hospitalarios, Atención Primaria y Socio-Sanitarios (aten-

56

NOVASOFT EN DATOS

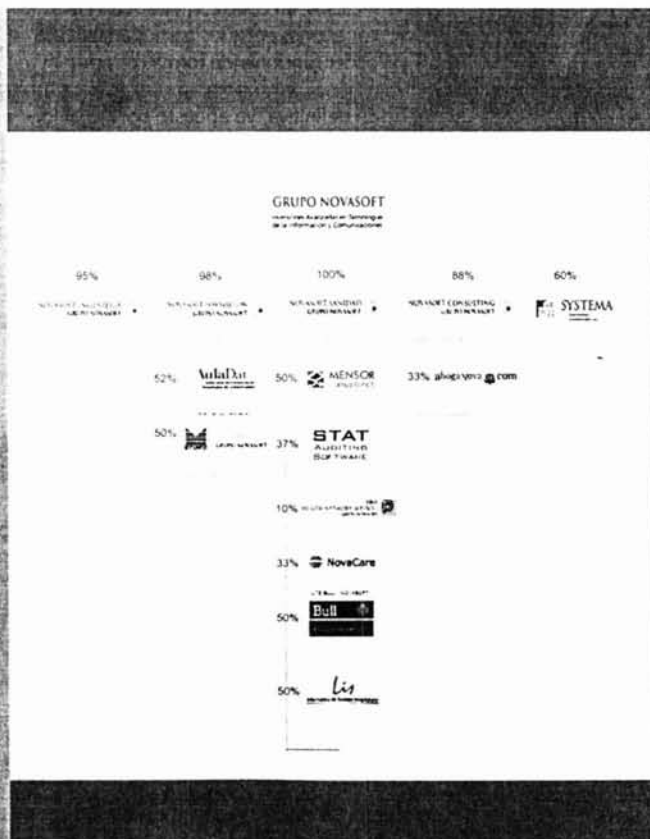
> Novasoft invirtió en 2002 aproximadamente un 12% del volumen de negocio en proyectos de I+D+i (1.500.000 euros).

> Novasoft cuenta en la actualidad con unos 200 empleados.

> En colaboración con la Consejería de Empleo y Desarrollo Tecnológico de la Junta de Andalucía, Novasoft desarrolla un Plan de inserción laboral para jóvenes talentos universitarios andaluces, denominado Proyecto "Cantera" que ha servido de fórmula para captar nuevos ingenieros y su posterior incorporación a proyectos de I+D.

> El Proyecto INQBA implantado por Novasoft Consulting para el PTA es un programa de apoyo para la implantación de sistemas de gestión de calidad y excelencia empresarial en las pymes andaluzas.

> A las actividades de sanidad, consultoría, tecnología e Ingeniería, Novasoft ha añadido la formación, a través de Auladat una iniciativa para potenciar la formación y certificación de alto nivel en Tecnologías de la Información y en Consultoría Tecnológica, que dispone de 10 aulas interactivas entre Madrid y Barcelona.



FRANCISCO BARRIONUEVO CANTO. RADIOGRAFÍA DE UN EMPRENDEDOR



Su presidente es un ejemplo del empresario con sólida formación y amplio currículum: licenciado en Administración de Empresas por la American World University, diplomado en Alta Dirección por el Instituto Internacional San Telmo, máster en Dirección de Marketing y Comercial por ESIC, escuela que lo galardonó con el premio ASTER al mejor emprendedor, y MBA por la Escuela Superior de Empresas (ESESA) son algunas de las titulaciones de este malagueño que en 1993 decidió aventurarse en el mundo empresarial y formar una empresa que desarrollaba software sanitario. Actual-

mente, a su amplio repertorio de premios empresariales, une Barrionuevo su militancia activa en el sector de las TICs, pues fue presidente de la Asociación de Empresarios de Tecnologías de la Información y Comunicación de Andalucía (Eticom) y participante en la constitución del Centro Andaluz de Innovación y Tecnologías de la Información y Comunicaciones (CITIC), fundación privada sin ánimo de lucro formada por 30 empresas e instituciones públicas y privadas para potenciar las capacidades tecnológicas de las empresas TIC andaluzas.

ción a ancianos) y con esta base la expansión de la empresa no era más que una consecuencia lógica, "asistiendo a ferias y congresos descubrimos que existían oportunidades para nuestros productos y que podían competir, luego vinieron los contactos con empresas que tenían su base de operaciones en diferentes países extranjeros", asegura Barrionuevo, cuya presencia en el mercado internacional se rubrica con proyectos implantados en centros sanitarios de Portugal y Andorra, proyectos en el mercado latinoamericano (Chile, México, Argentina) y Estados Unidos, donde Novasoft trabaja como socio de la compañía Stat Auditing Software en Miami y ofrece servicio a más de 60 hospitales.



Novasoft invirtió en 2002 aproximadamente un 12% del volumen de negocios en proyectos de I+D+i (1.500.000 euros).

Expansión del negocio

El año 2000, Novasoft comenzó una expansión del negocio a través de la compra de otras compañías, con el deseo de "evolucionar hacia la integración de nuevas áreas tecnológicas". El grupo se hizo con empresas como Tecno Global y Health Network Services y adquirió el 50% del accionariado de la firma canaria Sistema Servicios Informáticos. En 2002 se haría con el 52% de la empresa catalana Auladat, dedicada a la formación, y compraba la firma Lis Informática. La trayectoria ha sido fulgurante y las previsiones de futuro para el grupo nos hablan de conseguir una cifra de negocio agregada de 60 millones de euros en un plazo no

superior a cinco años. Hoy el Grupo predica a los cuatro vientos que es posible convertirse en una empresa modelo de los new economy business con capital humano andaluz y ha decidido volver al PTA, a aquel espacio de excelencia que lo vio nacer. Lo harán con un edificio propio que comenzará a construirse en los próximos meses, en una parcela de 2.500 m² cuyo proyecto arquitectónico contempla la construcción de un centro de dos plantas, con más de 1.000 m² útiles, para centralizar todos los servicios del grupo. Parque y empresa cierran así un ciclo exitoso que ha durado diez años.

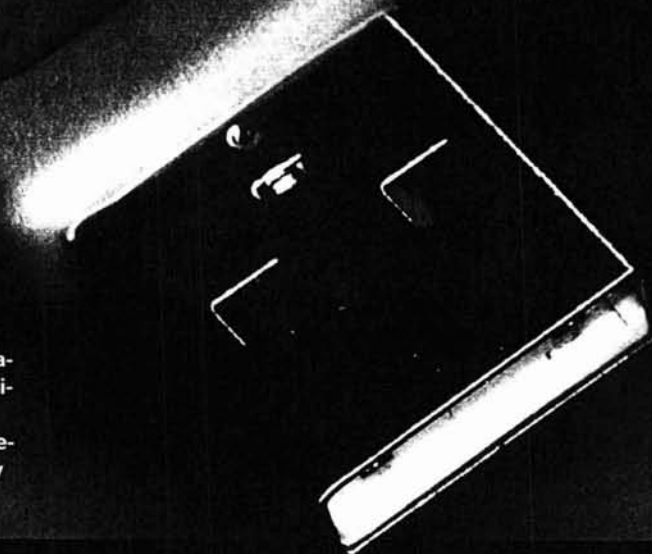
La empresa está desarrollando en colaboración con el Instituto de Innovación Empresarial de Baleares el Proyecto Quasar para la implantación en ocho empresas desarrolladoras de software de las normas ISO 9000 de excelencia empresarial y el modelo ISO 15504 (modelo Spice).



TECNOLOGÍA

Por Francisco Rubiales

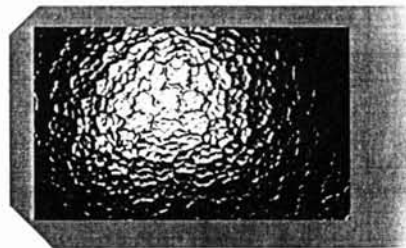
El capital riesgo cae a mínimos de hace dos décadas. El capital riesgo está en crisis y ha caído en picado como consecuencia del estallido de la burbuja tecnológica. Las cifras del año 2002 en Estados Unidos (1.770 millones de euros) son similares a las del año 1981, cuando superaron ligeramente los 1.600 millones de euros. En Europa y Asia, el descenso también es notable y sorprendente.



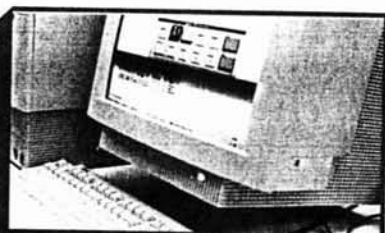
España invierte poco en tecnologías. La cifra es escandalosa: España invierte en tecnologías de la información proporcionalmente menos que países considerados del Tercer Mundo, como Vietnam o Colombia, según un informe del Foro Económico Mundial (Foro de Davos) en el que España figura en el puesto 61 de un total de 82 países analizados. Sin embargo, España se sitúa en el puesto 24 de la clasificación general de desarrollo tecnológico, por detrás de Estonia y Corea, sólo un puesto por detrás del que ocupaba el pasado año en el mismo informe.

Enorme pérdida de confianza. Acontecimientos como los atentados del 11 de septiembre, los avances de la enfermedad del SIDA, el escándalo de la empresa Enron y otras anomalías contables detectadas, la oleada de escándalos sexuales en la Iglesia Católica, y la explosión de la burbuja tecnológica con la consiguiente caída de las bolsas de todo el mundo, son hechos que han provocado una fuerte pérdida de confianza en los seres humanos. En opinión de los sociólogos y antropólogos, la desconfianza creciente no es un fenómeno pasajero, sino un fuerte rasgo cultural que dejará una huella creciente en la personalidad de los humanos a lo largo de este siglo y que tendrá efectos importantes sobre la economía, la publicidad, la comunicación, el desarrollo de las tecnologías y hasta la forma de vivir. Los expertos están sorprendidos y no ven la salida al problema, sobre todo porque la confianza en los medios de comunicación se ha deteriorado de manera notable, al igual que la fe del ciudadano en los gobiernos, en las empresas y en las organizaciones religiosas y filantrópicas.

Árboles sintéticos. Es una idea del científico doctor Klaus Lackner y consiste en una instalación capaz de producir fotosíntesis a gran escala, lo mismo que hacen los cada día más escasos árboles: absorción de Dióxido de Carbono (CO_2), retención de carbono y producción de oxígeno. Lackner afirma que fabricados masivamente, estos árboles artificiales podrían limpiar eficientemente la atmósfera de la Tierra del peligroso CO_2 , principal culpable del calentamiento global. El mayor problema del árbol sintético es su alto precio actual, pero Lackner asegura que los costos bajarán muy pronto.

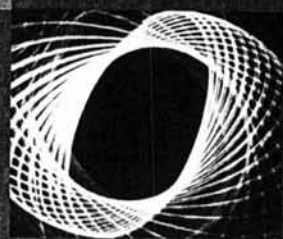


Robot con rostro humano. Científicos de Estados Unidos han construido una cabeza robótica que es capaz de reproducir 28 gestos humanos. Se llama K-bot y puede expresar alegría, ternura, dolor, asco, ira y otras emociones propias del ser humano. El robot esconde otra característica humanoide: detrás de sus ojos funcionan dos cámaras capaces de captar la expresión facial del interlocutor y de ordenar expresiones de respuesta en el rostro del robot. El creador del invento, David Hanson, un ingeniero que inició su carrera diseñando muñecos robóticos para los parques temáticos del grupo Disney, afirma que K-bot es apenas el primer paso de lo que él denomina "robótica social", un camino fascinante que cuando se aplique a ordenadores y máquinas contribuirá a mejorar notablemente la relación entre el hombre y las máquinas y utensilios.



España padece la crisis de las telecom.

El año 2002 ha sido un mal año para las telecom en España y para las tecnologías de la información (TI) en general. Las empresas invirtieron un 25 por ciento menos que el año 2001, que ya fue malo. La inversión en el 2001 fue de 4.716,8 millones de euros, mientras que en el 2002 fue de 3.487,7 millones de euros. La crisis ha tenido efectos nocivos sobre todo el ámbito de la sociedad de la información y ha hecho que nuestro país pierda puestos de trabajo y retroceda en los rankings mundiales. Ni que decir tiene que la crisis del sector en España está muy relacionada con los avatares de la empresa telefónica.



Cuidado con los ordenadores

desechados. Técnicos del Instituto Tecnológico de Massachussets (MIT) han demostrado que se puede extraer información valiosa de ordenadores desechados, incluso si como medida de precaución han sido borrados y formateados sus discos duros. De 158 ordenadores desechados analizados, sólo 12 habían sido borrados correctamente. La conclusión es evidente: hay que tomar precauciones con los ordenadores que se abandonan por obsoletos por que pueden conservar información de gran valor.

Miedo a la libertad. Manuel Castells, profesor de sociología de la Universidad de Berkeley (California), ha afirmado que "a todos los gobiernos del mundo, sin excepción, les da miedo la libertad". Estas tesis de Castells, pronunciadas en febrero de 2003 con motivo de un congreso sobre la Sociedad de la Información celebrado en Bilbao, han generado un gran revuelo entre los especialistas e incide en una vieja polémica filosófica, viva desde Alexis de Tocqueville y otros autores del siglo XVIII, según la cual los gobiernos son los peores enemigos de la sociedad civil y de las libertades ciudadanas en general, precisamente por su tendencia a controlar la información. Castells afirma que la mayor obsesión de los gobiernos actuales, incluidos los democráticos, es conseguir controlar la información libre que circula por internet. "Siempre buscan pretextos como la pornografía infantil, el terrorismo, etc., pero en realidad lo que más les importa es cómo llegar a controlar la red", afirma el sociólogo español.

Éxito de las bitácoras. Las bitácoras (nombre español del blog) están teniendo un éxito arrollador en el universo de Internet. Es tan grande el éxito que los expertos creen que habrá unos diez millones de bitácoras funcionando en Internet antes del año 2005, lo que obliga a analizarlas como gran fenómeno de comunicación libre y como fuente futura de negocios. Por lo pronto, los grandes periodistas están abriendo sus bitácoras y se transforman en bloggers (bitacoreros). Un ejemplo es el de Dave Barry, del *Miami Herald*, ganador de un Pulitzer. Pero también las grandes empresas están comprando las mejores bitácoras, como ha hecho Amazon.com. Una bitácora es básicamente un sitio de información y discusión libres, que se dividen en temáticas, verticales, de nicho, especializadas, etc. Suelen ser útiles porque aportan servicios, pero también son iconoclastas, originales, muy libres y frescas.

El "gratis total" en Internet ha muerto. La red de Internet es ya una estructura descomunal, muy diferente a lo que era hace tan solo seis años. Antes era un recurso de prestigio en el que había que estar, pero hoy también es ya un mercado en sí mismo y un negocio puro. Antes resultaba posible que la publicidad pagara los gastos, pero hoy eso ya no es posible. La consecuencia es que el antiguo "gratis total" está en agonía y los expertos se atreven ya a certificar la muerte de aquella vía y el inicio de una nueva filosofía que consiste en "cobrar por los contenidos", especialmente por aquellos que agregan más valor. El diario económico *The Wall Street Journal*, con sus cientos de miles de suscriptores de pago, es un modelo del nuevo camino. Claro que los suscriptores, además de la información diaria, reciben servicios exclusivos como acceso a 30.000 fichas de empresas y a números atrasados de las ediciones de EE.UU., Asia y Europa.

EN LA RED

Por Esteban Rubiales

EL CLUB DE LOS ERUDITOS

Mensa fue fundada en 1946 en Inglaterra por Roland Berrill, abogado, y el doctor Lance Ware, científico y abogado. Ambos compartían la idea de crear una sociedad ajena a la política y libre de toda distinción racial o religiosa, cuyo único requisito para ser miembro fuera un alto cociente intelectual. Actualmente, Mensa acoge a más de 110.000 miembros de todos los ámbitos y países cuyo C.I. se sitúa en el 2% superior de la población, con

el fin de disfrutar de la compañía de los demás y participar en un amplio abanico de actividades sociales y culturales. Para formar parte de este selecto

club, basta con realizar el test on-line que propone la web, para posteriormente solicitar un test supervisado.

INNOVACIÓN Y TECNOLOGÍA EN ANDALUCÍA

Innovatec, el foro andaluz de innovación y tecnología por excelencia, viene apostando por la difusión de la cultura de la innovación desde 2001. Múltiples personalidades del campo político, empresarial y científico, con gran influencia en el desarrollo tecnológico de Andalucía y España, han pasado ya por su tribuna. Innovatec estrenó recientemente su sucursal en la red, lo que supone un nuevo esfuerzo por impulsar la cultura de la innovación en Andalucía. La web consta de una sección institucional, un apartado que recoge la programación de conferencias e interesantes foros on-line sobre temas de actualidad científico-técnica.



www.foroinnovatec.com



www.mensa.es

SE TE VA A CAER EL PELO

Si éste es tu problema, ésta es tu web. La caída del cabello afecta a prácticamente la mitad de los varones de entre 20 y 64 años, aunque sólo el 53% de éstos está realmente preocupado por el tema. A esta población va dirigida Perderpelo.com, la primera página web en español con información sobre la caída del pelo y sus tratamientos elaborada por especialistas en problemas relacionados con el cabello. Desde este sitio podemos localizar dermatólogos especializados o contactar con expertos colaboradores, contar nuestra experiencia, acceder a información sobre tratamientos o leer las últimas noticias sobre la investigación de la alopecia. ¿Quién sabe? quizás algún lector se salve "por los pelos" gracias a esta dirección.

BIBLIOTECA SIN ESTANTERÍAS

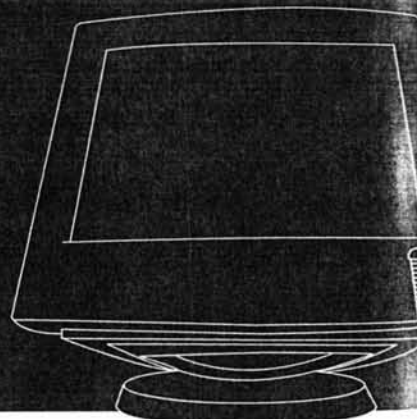
E-libro es el canal en español de los servicios e-librarian de e-library, y proveedor de un extenso servicio de distribución de contenidos en distintos formatos tanto digitales como impresos bajo demanda. Este sistema pone al servicio de todas las bibliotecas del mundo los más importantes contenidos académicos, apuntes de cátedra, investigaciones, textos, etc., a precios que permiten no sólo el control de los derechos de autor sino que abaratan los costos de las bibliotecas y alumnos. Más de 100 editoriales de gran prestigio internacional y prensas universitarias líderes proporcionan contenidos



www.monumentalia.net

UNA WEB MONUMENTAL

España es uno de los países más ricos en monumentos. Así queda reflejado en este portal especializado. En Monumentalia.net podemos encontrar desde la actualidad concierne a actuaciones sobre el patrimonio histórico, hasta la proposición de rutas de turismo cultural a lo largo y ancho de nuestro territorio nacional, pasando por los foros on-line, el servicio de postales virtuales, etc... Pero el corazón de la web lo constituye, sin lugar a dudas, la base de datos sobre monumentos, minuciosamente catalogados y documentados con textos, fotografías, vistas panorámicas de 360° y enlaces a sus páginas oficiales o a cualquier otra relacionada con los mismos.



actualizados al día a esta librería virtual. Descargando el visualizador, cualquier usuario puede acceder al catálogo y visualizar los textos de libre distribución.



www.e-libro.com



CEMENTERIO VIRTUAL

Traemos a nuestras páginas esta interesante iniciativa de una empresa peruana de servicios funerarios. Se trata de un cementerio virtual accesible desde cualquier ordenador del mundo con conexión a internet, desde el cual los cibernautas pueden visitar y recordar a sus amigos o familiares a pesar de la distancia. Una vez adquirido un espacio para un difunto, que ronda los 120\$, los visitantes podrán acceder a su lápida de forma libre o restringida, a elección del contratante. Desde allí podrán ver una fotografía del finado, leer la inscripción de su lápida, dedicarle una oración, acceder a su biografía, dejar un mensaje en el libro de visitas o chatear con otros parientes o conocidos para honrar su memoria.

www.ventanadelreuerdo.com

En nuestro anterior número proporcionábamos un índice de emisoras de radio via internet. World Wide Internet TV va más allá. Esta web en inglés ha elaborado un directorio mundial de emisoras de televisión que retransmiten en la red de redes. Así, si disponemos de una conexión de banda ancha, no sólo podremos ver en vivo las famosas cadenas internacionales CNN, BBC, Bloomberg o Al Jazeera Qat, sino también algunas nacionales y territoriales, como Antena3, Canal Sur, Antena Aragón, Canal 29 Valladolid... Para visualizar los canales es necesario instalar Realplayer, proporcionado en la misma web, y muy recomendable disponer de una conexión de banda ancha.



www.witv.com

LA RED EN EL BOLSILLO

AvantGo se ha convertido en el navegador estándar para pequeños dispositivos móviles con acceso a internet. Gracias a su distribución gratuita y al libre acceso a los canales de suscripción, este software ocupa un importante lugar en la memoria de los dispositivos Palm OS o Pocket PC de todo el mundo. Ésto es posible ya que el proyecto se



www.my.avantgo.com

financia con los fondos obtenidos de banners publicitarios y de los propietarios de los canales de suscripción off-line. Entre éstos se encuentran importantes medios nacionales (El Mundo, El País, Cinco Días, Euro-News, La Caixa, Los 40, RACE, etc.) e internacionales (CNN, BBC, The Wall Street Journal, The New York Times, USA Today, MS NBC, Reuters, etc.).

SONRÍE CUANDO MIRES AL CIELO

En 1999, fue puesto en órbita IKONOS, el primer satélite comercial provisto de sensores ópticos con una resolución espacial de 1 metro. Superaba así a su más próximo competidor, el IRS India, capaz de distinguir sólo objetos de 6 metros de diámetro. Space Imaging gestiona este satélite y puede proporcionarnos imágenes de alta resolución de una zona a nuestra elección, en blanco y negro, color o en espectro infrarrojo. Basta con rellenar el formulario de pedidos on-line especificando las coordenadas y extensión de la zona de interés. Eso sí, el pedido mínimo es de 3.000 dólares americanos. Los menos pudientes, siempre podemos hacernos con las impresionantes muestras gratuitas o bajarnos de su tienda on-line una de las imágenes de las principales capitales del mundo a un precio mucho más asequible.



www.spaceimaging.com

Por José Miguel Rey
arsys.es Hosting y registro de dominios

arsys.es

¿Qué expectativas existen en el mercado de registro de Dominios español?

El nuevo Plan de Nombres de Dominio de Internet debería aprobarse durante las próximas semanas, y se prevé que incorpore una notable agilización en los procesos de registro del dominio ".es". Uno de los aspectos más novedosos es la aparición de registros de dominios de tercer nivel. Es decir, progresivamente aparecerán los dominios ".com.es" para fines comerciales, ".nom.es" estará destinado a páginas personales, ".org.es" para entidades sin ánimo de lucro, ".gob.es" para el sector público, ".edu.es" para instituciones educativas.



Se ha hablado mucho de la seguridad en Internet tras el 11 de Septiembre, ¿se han tomado medidas de seguridad excepcionales en los Data Center?

Con independencia de lo sucedido el 11 de Septiembre, periódicamente la Red recibe ataques organizados de crackers. El último fue el 23 de enero por la mañana, cuando se realizó el bombardeo de peticiones de datos sobre los servidores 'SQL' de Microsoft para lanzar ataques de denegación de servicio (DoS) realizadas por el virus "Slammer", el gusano más rápido en cuanto a su propagación de la historia de Internet. Aunque en este último caso no se provocó ningún daño a la Red, los servidores raíz que asocian las IP a los nombres de dominio, debieran dejar de ser el punto débil de la Red.

En lo que respecta a la seguridad, los Internet Data Center avanzados, como el de arsys.es, disponen de medidas de seguridad a tres niveles: Seguridad física de los equipos, con sensores y sistema redundante de aire acondicionado para control de temperatura y humedad ambiental, además del sistema de detección de incendios automatizado, y la seguridad perimetral con accesos restringidos y

sistema de alarmas y televigilancia. Seguridad en suministro eléctrico, utilizando tanto SAI, como red de baterías y grupo electrógeno propio. Seguridad informática en cuanto a sistemas de detección de intrusos (IDS) y firewalls de última generación.

¿Vivimos una etapa de declive para el Marketing On line?

Lo que parece que estamos viviendo es una etapa de racionalización del marketing. Los consumidores están expuestos a una saturación de impactos publicitarios que reciben desde múltiples medios. Evidentemente para un anunciante tradicional de medios masivos, estar presente en todos ellos supone ineficacia y costes elevados, por lo que cada vez más se tiende a seleccionar más los medios y los soportes adecuados, más allá de análisis basados en perfiles socio-demográficos.

Esta selección realizada por anunciantes no ha frenado el desarrollo de Redes y Programas de Afiliación como herramienta útil de marketing on line, ni la publicidad ya tradicional en base a banners, microsites, y otros elementos.

¿Cuáles son las posibilidades reales futuras que ofrece el comercio electrónico?

El comercio electrónico es un canal de ventas más que funciona de forma relativamente efectiva dependiendo de las características del producto comercializado y sobre todo, del modelo de negocio, ya que requiere su compatibilidad con los otros canales de ventas utilizados, así como con la estrategia y posicionamiento de la empresa en el mercado.

En la actualidad, el comercio electrónico basado en pasarelas de pago puede ser más seguro que muchas fórmulas de comercio tradicional, ya que los mecanismos de control y encriptación de la información transferida están muy des-

arrollados. La clave del futuro de este canal es la confianza entre vendedor, comprador, y medio de pago a utilizar.

Como evolución de las actuales pasarelas de pagos, ¿qué posibilidades se abren con el m-commerce? Es probable que dentro de pocos años muchos de los pagos se realicen a través del móvil en sustitución de los actuales medios de pago. Esto será especialmente útil para realizar micropagos, pero también será común que las transacciones en comercios a pie de calle se paguen con una clave escrita en nuestro móvil. Además, el desarrollo de las tecnologías wireless hace que los dispositivos móviles puedan ya realizar las mismas transacciones que un ordenador convencional, lo que hará del m-commerce una prolongación del e-commerce.

¿Afecta la Ley de Servicios de la Sociedad de la Información y del Comercio Electrónico al desarrollo de los proyectos en Internet? Sin duda. Tanto la Ley de Protección de Datos como la reciente LSSI afectan directamente a los proyectos a desarrollar en Internet, ya que utilizan conceptos amplios en su regulación, de forma que tanto la contratación de bienes y servicios por la Red, como el suministro de información electrónica, o los suministros de servicios asociados: acceso a la Red, transmisión de datos, realización de copias temporales de páginas, alojamiento, aplicaciones servidas a terceros, y otros, son objeto de regulación por la LSSI, siempre y cuando supongan establecimiento permanente en España. Estas leyes intentan aportar más transparencia a la Red imponiendo la obligatoriedad de facilitar los datos identificativos reales de un sitio web, la identificación expresa de las comunicaciones comerciales, y prohíben su envío por correo electrónico salvo que el destinatario haya prescrito su consentimiento.



QUIÉN ES QUIÉN

Empresas TIC en los Parques Científicos y Tecnológicos Españoles

Empresa
Dirección
CP Localidad (Provincia)
teléfono F (fax)
e-mail / web
Contacto
Sector
Actividad
Parque Tecnológico
E (edificio)
S (servicios)
P (productos)

Sector

Información, informática
y telecomunicaciones

Quality Objects S.L.
Módulo Rojo 101, 47151
Boecillo (Valladolid)
914066890 F 914066891
jorge@qualityobjects.com
Jorge Fernández
Aplicaciones Software para
telecomunicaciones
Parque Tecnológico de Cas-
tilla y León E. Galileo

IBER2NET
Paseo Mikeletegi,
20009 San Sebastián
P.T. de San Sebastián

**Sistemas de gestión de
Balears**
Ctra. Palma-Valldemossa
Km 7,4,
07120 Palma de Mallorca
902221223 F 902193549
info@sistemasdegestion.com
www.sistemasdegestion.com
Parque Balear de Innova-
ción Tecnológica E 17

OPS
Paseo Mikeletegi,
20009 San Sebastián
Parque Tecnológico de San
Sebastián

**Dome Consulting & Solu-
tions, S.L.**
Edificio Son Espanyol, Ctra.
Palma-Valldemossa Km 7,4,
07120 Palma de Mallorca
971435042 F 971435070
proser@dome-consulting.com
www.dome-consulting.com
Parque Balear de Innova-
ción Tecnológica E Son
Espanyol

Viajesweb Digital, S.A.
C/ Albert Einstein, 40, Ctra.
N. 240 - Km 9, 01510
Miñano (Álava)
945010990 F 945010994
Parque Tecnológico de
Álava E Atlas

MIRAMON DIGITAL
Paseo Mikeletegi
20009 San Sebastián
Parque Tecnológico de San
Sebastián

Araba Empresa Digital
C/ Albert Einstein, 44, Ctra.
N. 240 - Km 9,
01510 Miñano (Álava)
945298282 F 945298710
Parque Tecnológico de
Álava E 6

TEDIAL
C/ Severo Ochoa, 10,
29590 Málaga
951012600 F 951012602
informacion@tedial.com

www.tedial.com
José Mesas
Desarrollo de software mul-
timedia
Parque Tecnológico de
Andalucía E Hidratel

Información, informática
y telecomunicaciones /
Multimedia

C.T.I.
C/ Severo Ochoa, 4-1ª planta
29590 Málaga
952132929 F 952132922
ct@uma.es
www.uma.es
Antonio de las Nieves
Centro Tecnología Imagen
Parque Tecnológico de
Andalucía E Institutos Uni-
versitarios

**Sistemas Interact. Multi-
media, S.L.**
Avd Juan López Peñalver, 21
29590 Málaga
951010569 F 951010526
sim@bic.es
www.bic.es/sim
José Moreno Muñoz
Desarrollo Producciones
Multimedia
Parque Tecnológico de
Andalucía E Bic - Euronova

**Arquitectura, Supercom-
putación y Diseño VLSI**
C/ Severo Ochoa, 4-2ª planta
29590 Málaga
952028269 F 952020306
adm@andaluciadigital.es
www.uma.es

Vicente Garrido
Investigación y desarrollo
multimedia
Parque Tecnológico de
Andalucía E Institutos Uni-
versitarios

Información, informática
y telecomunicaciones /
Audiovisual

**Asociación Provincial de
Radio y Televisión**
33428 Llanera (Asturias)
985980098 F 985265740
Próspero Morán López
Formación y difusión de
nuevas tecnologías
Parque Tecnológico de
Asturias E CEEI

Información, informática
y telecomunicaciones /
Comunicación

Al Andalus Media, S.A.
Inca Garcilaso, s/n
954488322 F 954488312
edevasa@amedios.com
Parque Científico - Tecnoló-
gico de Sevilla

**Ars Nova, Sistemas de
Información, S.A.**
Módulos 102, 104, 106
47151 Boecillo (Valladolid)
983548084 F 983548084
arsnova@ars-nova.net
www.ars-nova.es
Victor García
Sistemas de información
Parque Tecnológico de Cas-
tilla y León E Centro

Unicaja
C/ Severo Ochoa, 5
29590 Málaga
952020283 F 952020311
ngasangi@unicaja.es
www.unicaja.es
Natalia Gaspar
En instalación
Parque Tecnológico de
Andalucía

ABC (Prensa Española, S.A.)
Albert Einstein, s/n
954488600 F 954627106
abcsevilla@abc.es
www.abc.es
Parque Científico - Tecnoló-
gico de Sevilla

**Andalucía Digital Multi-
media**
C/ Severo Ochoa, 4-2ª planta
29590 Málaga
952028516 F 952020306
adm@andaluciadigital.es
www.andaluciadigital.es
Ildefonso González
Canales temáticos
Parque Tecnológico de
Andalucía E Institutos Uni-
versitarios

Información, informática
y telecomunicaciones /
Comunicaciones

**Espiral Microsistemas,
S.L.L.**
C/ Cabueñes s/n, Ofic. Nº 5 - 6
33203 Gijón
958099215 F 958099370
info@espiralms.com
Mª Isabel Lombardía
Ingeniería informática
Parque Científico - Tecnoló-
gico de Gijón S I+D

**Netlan, Redes y Comuni-
caciones, S.L.**
Módulo 1.17, 47151 Boeci-
llo (Valladolid)
983548888 F 983548889
primi@netlan.es
Primitivo Canterá
Proyectos de Ingeniería Té-
cnica de Comunicaciones
Parque Tecnológico de Cas-
tilla y León E CEEI

**Organismo Autónomo de
Correos**
Parcela nº 51.1, 33428 Lla-
nera (Asturias)
985980989 F 985214180
Jesus Ángel Flores Pardo
Centro de Tratamiento Postal
Parque Tecnológico de
Asturias
S Servicio público de envíos
postales

Onda Cero (Unipres, S.A.)
Américo Vespucio, s/n
954461111 F 954460444
sevilla@ondacero.es
www.ondacero.es
Parque Científico - Tecnoló-
gico de Sevilla

Información, informática
y telecomunicaciones /
Informática

Inforinvest
Oficina 14, 47151 Boecillo
(Valladolid)
983554465 F 983554217
inforinvest@inforinvest.net
Pablo García Cabezedo
Parque Tecnológico de Cas-
tilla y León

NEXTEL, S.A.
Pg Parque Tecnológico, 207
48170 Zamudio (Vizcaya)
944318610 F 944318497
info@nextel.es
www.nextel.es
Jose Ramon Bazo
INFORMÁTICA
Parque Tecnológico de
Zamudio E 207

Netglobal S.L.
Calle Colón, 6 - 3º A - B
36201 Vigo-Pontevedra
986441646 F 986441647
info@netaccde.com
www.netaccde.com
Marcelino Otero
Grupo empresarial que des-
arrolla ideas avanzadas de
negocio.
Parque Tecnológico de Galicia

Alaweb
Avda. Juan López Peñalver 21
29590 Málaga
951010500 F 951010526
info@alaweb.com
www.alaweb.com
Estela Plasencia Rodríguez
Desarrollo de software
empresarial
Parque Tecnológico de
Andalucía E Bic - Euronova

Coritel, S.A.
C/ Marie Curie 1
29590 Málaga
952047800 F 952047850
rodolfo.tessier@coritel.com
www.coritel.es
Rodolfo Tessier Gálvez
Producción y mantenimien-
to de software
Parque Tecnológico de
Andalucía E Conjunto Pre-
mier

D.I.S.A., S.L.
Avd Juan López Peñalver,
21, 29590 Málaga
952020152 F 951010526
disa@activanet.es
www.dsainformatica.com
Ricardo Roca
Desar. Aplic. Informat. Médi-
ca, electromedicina
Parque Tecnológico de
Andalucía E 11
S I+D

**SIVSA, Soluciones Infor-
máticas, S.A.**
San Ciprián de Viñas-E
32091 Ourense
988368178 F 988368101
sivsa@sivsa.com
www.sivsa.com
Valentin Otero Ruibal
Parque Tecnológico de Galicia

Animum Studios, S.L.
Avda. Juan López Peñalver,
21, 29590 Málaga
951010541 F 951010526
dplaza@animum3d.com
David Plaza
Modelización 3D de entor-
nos virtuales para red
Parque Tecnológico de
Andalucía E Bic - Euronova

**Sistemas de Gestión de
Andalucía**
Avd Juan López Peñalver,
21, 29590 Málaga
951010550 F 951010526
andalucia@systemandgestion.com
www.systemandgestion.com
Gabriel Barragán
Servicios informáticos y for-
mación

**Parque Tecnológico de
Andalucía E Bic - Euronova**

BDI DATA, S.L.
Avd Juan López Peñalver, 8,
29590 Málaga
952020140 F 952020148
bdata@bdata.es
www.bdata.es
Manuel Ruiz
Servicios de información
financiera
Parque Tecnológico de
Andalucía E C.T.I.A.

Innova Auria S.L.
C/ San Ciprián de Viñas,
3290 Ourense -
988368177
correo@innova-auria.com
www.innova-auria.com
Manuel Blanco Ramos
Parque Tecnológico de
Andalucía

Asturnet, S.L.
33428 Llanera (Asturias)
985264051 F 985265740
info@asturnet.es
www.asturnet.es
Joaquín Morán López
Servicios informáticos y edi-
torial
Parque Tecnológico de
Asturias E CEEI

**S Diseño y gestión editorial
de publicaciones, creación y
diseño de publicaciones
electrónicas, gestión y bús-
queda de información en
internet, creación, gestión y
mantenimiento de servido-
res Web, BBS y bancos de
datos.**

Procedimientos Uno, S.L.
Avd Juan López Peñalver, 8,
29590 Málaga
952020165 F 952020157
procuno@procuno.com
www.procuno.com
José A. Salas
Software Arquitectura
Parque Tecnológico de
Andalucía E C.T.I.A.

**Galería Industrial de Pro-
ducción S.L.**
C/ Cabueñes s/n 33203
Gijón
985099312 F 985091213
info@galeriaindustrial.com
Fatima Ferreiro Galguera
Parque Científico - Tecnoló-
gico de Gijón E Principal

Hispasec Sistemas, S.L.
Avd Juan López Peñalver,
21, 29590 Málaga
951010548 F 951010526
hispasec@hispasec.com
www.hispasec.com
Antonio Javier Román
Seguridad informática
Parque Tecnológico de
Andalucía E Bic Euronova

Entersoftware
Avda. Juan López Peñalver,
21, 29590 Málaga
951010591 F 951010526
entersoftware@bic.es
Juan García Roldán
Soluciones integrales de
gestión de la información
en Internet para el sector
inmobiliario
Parque Tecnológico de
Andalucía E Bic - Euronova

Properly Soft, S.L.
Avd Juan López Peñalver,

17, 29590 Málaga
952020200 F 951010535
info@properly.es
www.properly.es
Francisco Márquez
Desarrollo de Software de
Gestión
Parque Tecnológico de
Andalucía E NIDO

**E-Qulture Nuevas Tecno-
logías, S.L.**
Inca Garcilaso, s/n
954488242 F 954488243
egomez@equulture.com
www.equulture.com
Parque Científico - Tecnoló-
gico de Sevilla

IENET, S.L.
Parque Tecnológico, s/n,
48170 Zamudio (Vizcaya)
Parque Tecnológico de
Zamudio

**RED DE LA PROVISION
DE SISTEMAS, S.A.**
Parque Tecnológico, 103,
48170 Zamudio (Vizcaya)
913849190 F 917210264
Parque Tecnológico de
Zamudio E 205

**Hewlett Packard España-
la, S.L.**
Inca Garcilaso, s/n
954468300 F 954468317
carmen.resa@hp.com
www.hp.es
Parque Científico - Tecnoló-
gico de Sevilla

**Convex Supercomputer,
S.A.E.**
Américo Vespucio, s/n
954467190 F 954460022
comercial@convexsatec.es
www.satec.es
Parque Científico - Tecnoló-
gico de Sevilla

Partner Tecnológico S.L.L.
C/ Cabueñes s/n, Ofic. Nº
2, 33203 Gijón
985099216 F 985091213
partner@partnertecnologico.com
Iván Montes Acebal
Servicios informáticos
Parque Científico - Tecnoló-
gico de Gijón E Principal
S Análisis técnico y progra-
mación de aplicaciones
para ordenador, basadas
mayoritariamente en tec-
nología Lotus Notes, Java y
Web (tecnologías Inter-
net). Desarrollo y comer-
cialización de software
propio.

AGROMARE
Parque Tecnológico, 103,
48170 Zamudio (Vizcaya)
902444034 F 944317104
oscar.villaverde@arliquide.com
www.agromare.com
Juan Antonio Álvarez
Consultoría e Informática
Parque Tecnológico de
Zamudio E 103

CADVISION, S.L.
Pg Parque Tecnológico 103,
48170 Zamudio (Vizcaya)
944209745 F 944209748
begop@cadvisionsl.com
www.cadvisionsl.com
Fernando Pérez Mentaika
SERVICIOS
INFORMÁTICOS
Parque Tecnológico de
Zamudio E 103

E.S.I. (INST. EUROP. SOFT-WARE)
Pg Parque Tecnológico, 204
48170 Zamudio (Vizcaya)
944209519 F 944209420
info@esi.es / www.esi.es
Manuel Prego Larreina
DESARROLLO METODO-
LOGIA SOFTWARE
Parque Tecnológico de
Zamudio E 204

EKILAN
Ps Errotaburu, 1 - 7º A
48170 Zamudio (Vizcaya)
944209472 F 944209473
zamudio.comercial@ekilan.es
www.ekilan.es
Nikolas Mtz. De Ilardua
INFORMÁTICA
Parque Tecnológico de
Zamudio E 206

**INFORMÁTICA DE EUS-
KADI, S.L.**
Pg Parque Tecnológico, 207
48170 Zamudio (Vizcaya)
946019400 F 944310410
ie@euskadi.com
www.euskadi.com
Jesus Jusue Lafuente
INFORMÁTICA
Parque Tecnológico de
Zamudio E 207

**INTENTIA CONSULTING,
S.A.**
Cl Muelle De Barcelona, S/n
- E Norte 2º
48170 Zamudio (Vizcaya)
944317019 F 944317058
Jordi Salvador Clota
DESARROLLO DE SOFTWARE
Parque Tecnológico de
Zamudio E 103

**PRODUCTOS Y COMPO-
NENTES INFORM., S.L.**
Parque Tecnológico, 802,
48170 Zamudio (Vizcaya)
944317732 F 944317103
pci@pci.es / www.pci.es
Gorka Diaz Peña
INFORMÁTICA
Parque Tecnológico de
Zamudio s/n

**Informática El Corte
Ingles, S.A.**
Sala 1, 47151 Boecillo
(Valladolid)
983398822 F 9833202181
i_gonzalez@ieci.es
www.ieci.es
Ignacio González
Consultoría e integración
de aplicaciones informáticas
Parque Tecnológico de Casti-
lla y León E De usos comunes

SISTEPLANT, S.A.
Pg Parque Tecnológico, 100
48170 Zamudio (Vizcaya)
946021200 F 946021202
sisteplant@redestb.es
www.sisteplant.com
Javier Borda Elejabarrieta
INGENIERÍA
INFORMÁTICA
Parque Tecnológico de
Zamudio E 100

**Centro de Actividades
Informáticas y Servicios,
S.L. (CAI)**
Módulos 201,203
Boecillo (Valladolid)
983548090 F 983548042
mymorales@caiservicios.com
www.caiservicios.com
Luis Enrique Alonso
Integradores de sistemas
informáticos y desarrollo de
aplicaciones
Parque Tecnológico de Cas-
tilla y León E Centro

Novotec
Avda. Américo Vespucio, s/n
Parque Científico - Tecnoló-
gico de Sevilla

**VANENBURG BUSINESS
SYSTEM ESPAÑA, S.A.**

**Parque Tecnológico, 105,
48170 Zamudio (Vizcaya)**
944318048 F 944209773
imestratua@vanenburg.com
www.vanenburg-vbs.es
Bernar De La Hera
INFORMÁTICA
Parque Tecnológico de
Zamudio E 105

AICA
San Ciprián de Viñas-E,
32091 Ourense
988368128 F 988368129
aica@aica.net / www.aica.net
Guillermo González
Empresa especializada en el
desarrollo y diseño de ima-
gen corporativa utilizando
las nuevas tecnologías de la
información
Parque Tecnológico de Galicia
S Diseño y mantenimiento
de las páginas web, ase-
samiento a las empresas
clientes en materia de siste-
mas de información y acce-
so con dirección propia a la
autopista de la información
y la instalación de redes de
área local.

Ibermática, S.A.
C/ Hermanos Lumiere, nº 1,
Ctra. N. 240, Km9, 01510
Miñano (Álava)
945165100 F 945298293
Parque Tecnológico de
Álava

**Alcantara Sistemas de
Información, S.L.**
Isaac Newton, s/n
954468225 F 954467076
cperez@alcantara-si.es
www.alcantara-si.es
Parque Científico - Tecnoló-
gico de Sevilla

**BRIME TECHNOLOGIES
ESPAÑA**
Parque Tecnológico s/n, 207
48170 Zamudio (Vizcaya)
944318023 F 944209884
Parque Tecnológico de
Zamudio E 207

IBERMATICA
Paseo Mikeletegi, 5
20009 Donostia-San sebas-
tían
943413500943454338
www.ibermatica.es
Informática
Parque Tecnológico de San
Sebastián

MICROFUSIÓN
Paseo Mikeletegi, 56-1ª planta
20009 Donostia-San sebas-
tían
943309124 F 943308311
usachse@microfusion.es
www.microfusion.es
Software
Parque Tecnológico de San
Sebastián

S.P. Innova Media
Avd Juan López Peñalver, 17
29590 Málaga
952020102 F 952020076
innova@innovamedia.es
www.innovamedia.es
Pedro Calvo
Desarrollo de software jurí-
dico
Parque Tecnológico de
Andalucía E NIDO

Escador Riverland
Avda. Juan López Peñalver, 21
29590 Málaga
952028115 F 952028115
miguelgonzalez@escador.es
www.escador.es
Alejo González
Parque Tecnológico de
Andalucía E Bic Euronova

Recar Travel Soft
Ctra. Palma-Validemossa
Km 7.4
07120 Palma de Mallorca

971439829
recarinfo@regamallorca.com
www.regamallorca.com
Parque Balear de Innova-
ción Tecnológica E 17

Limit-CECOMASA
Camino de Can Manuel s/n,
07120, Palma de Mallorca
971439706
Limit@limit.es / www.limit.es
Lorenzo Mestre
Informática y telecomunica-
ciones
Parque Balear de Innova-
ción Tecnológica E 17
S Consultoría, ensamblaje y
fabricación
P Software

Abdgg Design
Ctra. Palma-Validemossa
Km 7.4
07120 Palma de Mallorca
971439710
hola@abdggdesign.com
Parque Balear de Innova-
ción Tecnológica E 17

SATEC
Av Europa, 34 - A
48170 Zamudio (Vizcaya)
944318308 F 944209843
izaskun@satec.es
www.satec.es
Jose Lorenzo Gurruchaga
INFORMÁTICA
Parque Tecnológico de
Zamudio E 103

Servicios Domóticos
33428 Lanera (Asturias)
985980098 F 985265740
Instalaciones y sistemas
Parque Tecnológico de
Asturias E CEEI

WATERMARK
Parque Tecnológico s/n, 105
48170 Zamudio (Vizcaya)
944318048 F 944209773
Parque Tecnológico de
Zamudio E 105

Webark* Studio
C/ María Curie, 8. Edif. B,
29590 Málaga
951231772 F 951231731
manuel@webarkstudio.com
Manuelo Cebrían
Desarrollo de aplicaciones
interactivas para redes
informáticas
Parque Tecnológico de
Andalucía E CADE

Puga Digital
San Ciprián de Viñas
32901 Ourense
988229588
shura@pugadigital.com
www.pugadigital.com
José Luis Salgado Álvarez
Parque Tecnológico de Galicia

Ainel S.L.
San Ciprián de Viñas-E
32091 Ourense
988368158 F 988368166
jpheiro@control.es
www.ainel.com
José Manuel Vázquez Mar-
tínez
Empresa de automática,
informática y electrónica
que ofrece servicios de
Internet para empresas.
Parque Tecnológico de Galicia

Grupo Corensa
C/ Marie Curie, 9-11
29590 Málaga
952028120 F 952028120
irodriguez@datacontrol.es
Isabel Rodríguez
En instalación
Parque Tecnológico de
Andalucía E 10
S I+D

SHS - Polar
Parcela 133
47151 Boecillo (Valladolid)
983549660 F 983548951

lanibarro@polar.es
Luis Anibarro Marbán
Ingeniería y desarrollo de
aplicaciones software para
telecomunicaciones
Parque Tecnológico de Cas-
tilla y León

Asuralia e-business
C/ María Curie, 8. Edif. B
29590 Málaga
951231767 F 951231731
jame@asuralia.com
www.asuralia.com
Francisco Ramirez
Desarrollo de aplicaciones
en entornos IP
Parque Tecnológico de
Andalucía E CADE

CIDAT S.A.
Parque Tecnológico, 205,
48170 Zamudio (Vizcaya)
943003900 F 944034450
info@cidat.com
www.cidat.com
Parque Tecnológico de
Zamudio E 205

Intelcom
Avda. Juan López Peñalver,
17, 29590 Málaga
José Luis Jiménez
Parque Tecnológico de
Andalucía

Gesline
Avda. Juan López Peñalver, 17
29590 Málaga
951231003 F 951231002
info@gesline.com
www.gesline.com
Francisco Castillo
Internet y software
Parque Tecnológico de
Andalucía E NIDO

Cideweb
Avda. Juan López Peñalver, 17
29590 Málaga
951160441
cideweb@cideweb.com
www.cideweb.com
Christian Casado
Servicio Internet
Parque Tecnológico de
Andalucía E NIDO

Atlantic
Avda. Juan López Peñalver, 17
29590 Málaga
Ignacio de la Oliva
Servicios informáticos
Parque Tecnológico de
Andalucía E NIDO

**Alhambra Soluciones y
Servicios, S.A.**
Avda. Juan López Peñalver, 21
29590 Málaga
952060463 F 952061029
jmvassallo@alhambra-
sys.com
www.alhambra-sys.com
José María Vassallo
Desarrollo Software
Parque Tecnológico de
Andalucía E Bic Euronova

Abacom
Avda. Juan López Peñalver, 17
29590 Málaga
952020053 F 951160101
info@abacom.com
www.abacom.com
Javier García
Soluciones informáticas
integrales
Parque Tecnológico de
Andalucía E NIDO

José Miguel Illescas
C/ María Curie, 8. Edif. B
29590 Málaga
951231765 F 951231731
José Miguel Illescas
Proyectos de telecomunica-
ciones
Parque Tecnológico de
Andalucía E CADE

**SATEC (Sistemas Avanza-
dos de Tecnología, S.A.)**
Avda. Américo Vespucio, s/n

954467190 F 954460022
miguel@satec.es
www.satec.es
Parque Científico - Tecnoló-
gico de Sevilla

**Técnicas microinformáti-
cas**
Hermanos Lumiere, 1
Ctra. N. 240 - Km 9
01510 Miñano (Álava)
945296942 F 945297007
Servicios informáticos y des-
arrollo de aplicaciones a
medida, en las áreas de ofi-
mática y gestión, en entor-
nos distribuidos y sistemas
abiertos.
Parque Tecnológico de
Álava

**Sentido Común Informá-
tica S.L.**
C/ Cabueñes s/n
33203 Gijón
985099213 F 985091213
ruben@sentidocomun.es
Rubén Rubio Meana
Parque Científico - Tecnoló-
gico de Gijón E Principal

GRID SYSTEMS
Camí de Can Manuel
s/n Local 9
07120 Palm F a
971135085971435082
info@gridsystems.com
www.gridsystems.com
Cristina Reus
Supercomputación
Parque Balear de Innova-
ción Tecnológica E 17
S Consultoría

Novasoft, S.A.
C/ María Curie, 14, 29590
Málaga
951066500 F 951066510
grupo@novasoft.es
www.gruponovasoft.es
Francisco Barrionuevo
Parque Tecnológico de
Andalucía

Sun Microsystems
Inca Garcilaso, s/n
954488478 F 954488440
juando@sunsevilla.com
www.sun.es
Parque Científico - Tecnoló-
gico de Sevilla

**South Europe Software
Applications, S.L.**
C/ María Curie, 1, 29590
Málaga
952020260 F 952020261
Carlan Constant
Parque Tecnológico de
Andalucía E CADE

Bida Multimedia, S.L.
C/ María Curie 9-11, 29590
(Málaga)
952028175 F 952028176
info@bida.es
www.bida.es
Tomas Pérez Benz
Desarrollo de Internet
Parque Tecnológico de
Andalucía E 10 S I+D

Avalon Informática
Inca Garcilaso, s/n
954488438 F 954488411
esm@avalon5g.com
http://avalon5g.com
Parque Científico - Tecnoló-
gico de Sevilla

**Microelectrónica Informá-
tica (Minfo)**
C/ Severo Ochoa, 4-5ª planta
29590 Málaga
952134180 F 952134179
www.uma.es
Alfonso Gago Bohoquez
Investigación y desarrollo
Parque Tecnológico de
Andalucía
Institutos Universitarios

**SADIEL, S.A., Tecnologías
de la Información, Tele-**

**comunicaciones e Infor-
mática**
Isaac Newton, s/n - Pabe-
llón de Portugal
955043600 F 955043601
sadiel@sadiel.es
www.sadiel.es
Parque Científico - Tecnoló-
gico de Sevilla

Implanta
Avda. Juan López Peñalver, 21
29590 Málaga
952028383 F 952028057
implanta@implanta-
gvd.net
www.gvd.net
Antonio Diaz
Parque Tecnológico de
Andalucía E Bic - Euronova

Holte Innovation S.L.
Avd Juan López Peñalver, 21
29590 Málaga
951010549 F 951010526
info@holtegroup.com
www.holtegroup.com
Are Strom
Parque Tecnológico de
Andalucía E Bic - Euronova

Softsolver S.L.
Avd Juan López Peñalver, 21
29590 Málaga
951010549 F 951010526
info@softsolver.com
www.softsolver.com
Mark Woolley
Parque Tecnológico de
Andalucía E Bic - Euronova

**L&R Gestión Técnica de
Redes S.L.**
C/ San Ciprián de Viñas
32901 Ourense
José Antonio Losas Devesa
Domótica
Parque Tecnológico de Galicia

Area Interactiva
C/ Albert Einstein nº 40,
Ctra. N. 240, Km9
01510 Miñano (Álava)
945010995 F 945010996
rpalen@guay.pt-álava.es
www.areaspe.com
Rubén Palenzuela
Comercio electrónico y
material informático
Parque Tecnológico de
Álava E Atlas

Prodigios Interactivos
Ctra. Palma-Validemossa
Km 7.4
07120 Palma de Mallorca
971435121
canas@aol.es
Parque Balear de Innova-
ción Tecnológica E Nono
Espanyol

Pentia Ingenieros, S.A.
Parcela 43
33428 Lanera (Asturias)
985266800 F 985980364
adolfo@pentia.com
Adolfo Piza
Proyectos de ingeniería
civil, industrial y de arquitectura.
Parque Tecnológico de
Asturias
S Cartografía y
topografía (cartografía digi-
tal), expedientes de expropi-
ación y levantamientos
topográficos, ingeniería
civil, urbanismo y arquitectu-
ra, cálculo de estructuras
(convencionales, reticulares
y especiales)

Dispal Astur, S.A.
Parcela nº13b
33420 Lanera (Asturias)
985276162 F 985273452
Ensamblaje de ordenadores
y desarrollo y diseño de
software
Parque Tecnológico de
Asturias

ISOTELCO
33428 Lanera

985980098 F 985265740
Parque Tecnológico de
Asturias E CEEI

CSV, S.L.
San Ciprián de Viñas-E
32091 Ourense
988510160 F 988213029
tecnico@softmatica.net
www.softmatica.net
Domingo García Cañía
Parque Tecnológico de Gali-
cia

**Innovaciones Virtuales
S.L.**
Avda. Juan López Peñalver,
21
29590 Málaga
951010526 F 951010526
Miguel Martínez Alahija
Desarrollo de ediciones digi-
tales
Parque Tecnológico de
Andalucía E Bic - Euronova

Naoset Sistemas
Avda. Juan López Peñalver,
21
29590 Málaga
951010521 F 951010523
info@naoset.com
www.naoset.com
Esteban Morales Corpas
Creación y desarrollo de
productos software
Parque Tecnológico de
Andalucía E Bic - Euronova

**Ejje - Centro de Gestión
KZC@**
C/ Albert Einstein, 15, N.
240, Km 8
01510 Miñano (Álava)
94501095 F 945010954
Sociedad informática del
Gobierno Vasco
Parque Tecnológico de
Álava E CEIA

OMYCRON RED
33428 Llanera
985980061 F 985265740
Parque Tecnológico de
Asturias E CEEI

Data 3 Electrónica, S.A.
San Ciprián de Viñas-E
32091 Ourense
988368190 F 988368144
data-3@data-3.com
www.data-3.com
Margarita Feo
Parque Tecnológico de Gali-
cia

Lantek Automatización
C/Albert Einstein, 27, Ctra.
N. 240, Km9
01510 Miñano (Álava)
945298705 F 945298714
lantek01@sarenet.es
www.lantek.es
Juan Luis Larrañaga
Desarrollo y venta de Soft-
ware CAD/CAM para
entornos de chapa
Parque Tecnológico de
Álava E E4

**Recursos Digitales Avan-
zados REDIA, S.A.**
Avda. Juan López Peñalver,
21
29590 Málaga
951010500 F 951010526
Miguel A. García Schopohl
Creación, diseño y comer-
cialización de páginas
web
Parque Tecnológico de
Andalucía E Bic - Euronova

**Tripholio Producciones,
S.L.**
Avda. Juan López Peñalver,
21
29590 Málaga
951010511 F 951010526
info@tripholio.com
www.tripholio.com
Miguel Carballo
Software de realización en
3D y realidad virtual

Parque Tecnológico de And-
alucía E Bic - Euronova

CROMION IT
Parque Tecnológico, s/n,
48170 Zamudio (Vizcaya)
Parque Tecnológico de
Zamudio

**Solunica Tecnologías de
la Información Técnicas
Microinformáticas**
Albert Einstein, 27, Ctra. N.
240 - Km 9, 01510 Miñano
(Álava)
945296915 F 945296916
Empresa de servicios infor-
máticos, dedicada al diseño
y desarrollo de aplicaciones
a medida, principalmente
en las áreas de informática y
gestión, en entornos distri-
buídos y sistemas abiertos.
Parque Tecnológico de
Álava E E4

**Asac Comunicaciones,
S.L. (ASAC)**
33420 Llanera (Asturias)
985265040 F 985265268
asac@asaccomunicaciones.com
www.asaccomunicaciones.com
Maximo Fernández
Informática CAD CAM
Parque Tecnológico de
Asturias E CEEI
S. Productos CAD CAM para
el trabajo en diseño 2D y
3D con superficies comple-
jas y sólidos paramétricos;
generación e implantación
de postprocesadores para
enlaces con máquina herra-
mienda, desarrollo de pro-
gramas y personalización de
aplicaciones CAD CAM.

Bettercome
C/Hermanos Lumière, 1,
Ctra. N. 240, Km9
01510 Miñano (Álava)
945297203 F 945297022
bettercome@sea.es
www.bettercome.com
Arturo Ibarrondo
Asistencia informática a
domicilio dirigida a particu-
lares y pequeñas empresas
Parque Tecnológico de
Álava

Ingenia, S.A.
C/ Marie Curie, 9-11,
29590 Málaga
952029300 F 952029309
info@ingenia.es
www.ingenia.es
José Blanco Arjona
Servicios de informática y
comunicaciones
Parque Tecnológico de
Andalucía E 10
S I+D

Buhodra Ingeniería, S.A.
Parcela nº 08
33420 Llanera (Asturias)
985272721 F 985270150
ispol@spol.net
www.spol.net
Desarrollo de Software
Parque Tecnológico de
Asturias

**Información, informática
y telecomunicaciones /
Información**
L. R. Informática, S.L.
C/ Marie Curie, 16, 29590
Málaga
952060270 F 952061149
admon@informatica.es
www.informatica.es
Ricardo Díaz
Parque Tecnológico de
Andalucía E Possibilia 2005

**Radio Nacional de España,
S.A. (RNE)**
Parque del Alamillo
954482300 F 954482476

director@rtve.es
Parque Científico - Tecnol-
ógico de Sevilla

**Nexo Tecnología de la
Información, S.L.**
Avda. Isaac Newton, s/n
954468225 F 954467417
alcantara@alcantara-s.es
www.nexo-ti.com
Parque Científico - Tecnol-
ógico de Sevilla

**GRUPO CORREO MEDIA
TRADER, S.A.**
Pg Parque Tecnológico 105
1º, 48170 Zamudio (Vizcaya)
944317033 F 944317045
landreu@diario-elcorreo.es
Luis Andreu
PERIODISMO EN INTERNET
Parque Tecnológico de
Zamudio E 105

**RTVA (Dirección General
de Radio Televisión And-
alucía) y Canal Sur Radio**
José de Gálvez, s/n
955056288 F 955056293
bmcastro@rtva.es
www.canalsur.es
Parque Científico - Tecnol-
ógico de Sevilla

**Grupo de investigación
en Lingüística Computa-
cional (GILC)**
C/ Baldin Reixac 10-12,
08028 Barcelona
934029060 F 934029063
administracio@pcb.ub.es
www.pcb.ub.es
Ramón Cerdà
Parc Científic de Barcelona
E Florensa

**BESANA PORTAL AGRA-
RIO, S.A.**
Avda. Isaac Newton, s/n
954081141 F 954080643
info@portalbesana.es
www.portalbesana.es
Parque Científico - Tecnol-
ógico de Sevilla

Interpés Europa
Avda. Juan López Peñalver,
8, 29590 Málaga
952020140 F 952020148
Manuel Rosa Ruiz
Servicios de información
financiera
Parque Tecnológico de
Andalucía E C.T.I.A.

Información, informática
y telecomunicaciones /
Información / Grupo de
investigación

**Centro Universitario de
Sociolingüística y Comu-
nicación (CUSC)**
C/ Baldin Reixac 10-12,
08028 Barcelona
934029060 F 934029063
administracio@pcb.ub.es
www.pcb.ub.es
Parc Científic de Barcelona
E Florensa

Grupo de Climatología
C/ Baldin Reixac 10-12,
08028 Barcelona
934029060 F 934029063
administracio@pcb.ub.es
www.pcb.ub.es
Martin Vide
Parc Científic de Barcelona
E Florensa

Global Teleworking, S.L.
Avda. Juan López Peñalver,
21, 29590 Málaga
951010580 F 951010526
lgonzalo@globaltelework-
ing.es
www.globalteleworking.es
Luis Gonzalo Cañas
Información, informática y
telecomunicaciones / Infor-
mática
Desar. software a medida

en entorno Windows
Parque Tecnológico de
Andalucía E NIDO
Información, informática
y telecomunicaciones /
informática y consultoría

IBERMÁTICA S.A.
Parque Tecnológico s/n, 205
48170 Zamudio (Vizcaya)
944310200 F 944310202
información, informática y
telecomunicaciones / Infor-
mática y consultoría
Parque Tecnológico de
Zamudio E 205

Información, informática
y telecomunicaciones /
informática y telecomu-
nicaciones

**Thales Information
Systems S.A.**
Modulo Rojo, oficina 203,
47151 Boecillo (Valladolid)
983546565 F 983546558
cceruelo@sysca.es
Carlos Ceruelo
Parque Tecnológico de Cas-
tilla y León E De usos comu-
nes

**Algor Consultoría y Siste-
mas, S.L.**
Ofc. 11, Parc. 130, 131,
47151 Boecillo (Valladolid)
983548168 F 983546606
gerardo.pastor@algor.es
www.apex.es
Gerardo Pastor
Ingeniería y desarrollo de
aplicaciones software para
telecomunicaciones
Parque Tecnológico de Cas-
tilla y León E De usos comu-
nes

**Experiencia Ingeniería y
Servicios, S.L.**
Oficina 3
47151 Boecillo (Valladolid)
917434077 F 917421702
msanchez@experiencia.com
Manuel Sánchez
Parque Tecnológico de Cas-
tilla y León E Usos Comunes

Cable & Wireless
Inca Garcilaso, s/n
954467060 F 954467060
cw@cw.es
www.cw.com/es
Parque Científico - Tecnol-
ógico de Sevilla

Grupo IT-Deusto
Modulo 3 10, 47151 Boeci-
llo (Valladolid)
983549729 F 983548200
valladolid@ideusto.com
José Carlos Llorente
Investigación y desarrollo en
telecomunicaciones
Parque Tecnológico de Cas-
tilla y León

Comunitel Global, S.A.
Oficina 9
47151 Boecillo (Valladolid)
912963213 F 913843222
rbardudo@comunitel.es
Rafael Barbudo
Desarrollo de plataformas
biomédicas para el
análisis e interpretación de
datos moleculares y biomé-
dicos para la industria far-
macéutica, biotecnológica
y los centros de investiga-
ción.
Parque Tecnológico de Cas-
tilla y León

Altran SdB
Modulo 1 11
47151 Boecillo (Valladolid)
983548883 F 983548009
amartin@altrandsb.com
www.altrandsb.com
Fernando Doral
Consultoría en Altas Tecno-
logías
Parque Tecnológico de Cas-
tilla y León E CEEI

Tecsidel, S.A.
Parcela 114
47151 Boecillo (Valladolid)
983546603 F 983546604
jacinto.canales@tecsidel.es
www.tecsidel.es
Jacinto Canales
Ingeniería y desarrollo de
aplicaciones software para
telecomunicaciones
Parque Tecnológico de Cas-
tilla y León E Centro

**Inzamac Asistencias Tec-
nicas, S.A.**
Parc. 207, 47151 Boecillo
(Valladolid)
983140600 F 983140601
valladolid@inzateco.net
www.inzateco.net
Diego Rodríguez
Asistencias Técnicas
Parque Tecnológico de Cas-
tilla y León

Elvex Sistemas
Modulo 1.03
47151 Boecillo (Valladolid)
983549634 F 983549639
elvex@elvex.es
Jorge Fernández
Parque Tecnológico de Cas-
tilla y León

Información, informática
y telecomunicaciones /
Informática / Software

PolyphonicHMI, S.L.
Artesans, 10
08290, Cerdanyola del
Valles (Barcelona)
627480817
mike@polyphonichmi.com
www.polyphonichmi.com
Mike McCready
Desarrollo de sistemas de
recomendación de música
basada en inteligencia arti-
ficial.
Parc Tecnològic del Vallès

**APE Software Compo-
nents, S.L.**
Centre d'Empreses de
Noves Tecnologies
08290, Cerdanyola del
Valles (Barcelona)
935820258 F 935801354
ape@apesoft.com
www.apesoft.com
Jordi Iborr / Jaume Juan
Diseño, producción y
comercialización de herra-
mientas y programas infor-
máticos basados en la in-
geniería de software aorien-
tada a objetos. Prestación de
servicios de formación
específicos en este campo
Parc Tecnològic del Vallès

e-Biointel
Biocompass UAB, Masia
Can Fatjó del Moli, 08290,
Cerdanyola del Valles (Bar-
celona)
935812730
ebiointel@ebiointel.com
www.ebiointel.com
Cristina Santa
Desarrollo de plataformas
biomédicas para el
análisis e interpretación de
datos moleculares y biomé-
dicos para la industria far-
macéutica, biotecnológica
y los centros de investiga-
ción.
Parc Tecnològic del Vallès

Edi Informática bb, S.A.
Centre d'Empreses de
Noves Tecnologies
08290, Cerdanyola del
Valles (Barcelona)
935824441 F 935801354
edispain@edi.fr
www.edi.fr
Xavier Bartolomé
Comercialización, custome-
rización, implantación y
puesta en marcha de apli-
caciones informáticas para

el tratamiento de bases de
datos (fidelización de clien-
tes, data mining, data
warehousing, data entry,
geomarketing, ...) Presta-
ción de servicios de soporte.
Parc Tecnològic del Vallès

**New Generation Softwa-
re, S.A.**
Carrer dels Argenters, 2,
08290, Cerdanyola del
Valles (Barcelona)
935820222 F 935824308
newgen@newgen.es
www.newgen.es
Eduard Puig
Desarrollo, producción y
comercialización de apli-
caciones informáticas en los
sistemas operativos UNIX y
WINDOWS con lenguajes
de cuarta generación, len-
guaje orientado a objetos y
bases de datos relacionales.
Asesoría, análisis de pro-
yectos.
Parc Tecnològic del Vallès

**Software Tècnic Tecno-
cím, S.L.**
Centre d'Empreses de
Noves Tecnologies
08290, Cerdanyola del
Valles (Barcelona)
935824520 F 935801354
tecnocim@tecnocim.com
www.tecnocim.com
Héctor Soler
Prestación de servicios de
ingeniería, asesoría y for-
mación en CAD/CAM.
Parc Tecnològic del Vallès

ENORNET, S.L.
C/ Cabueñes s/n
33203 GIJÓN
985-099214 F 985-091213
pjarias@enor.net
Patricio José Arias Alvarez
Instalación de redes de
telecomunicaciones, siste-
mas de cableado, domotica
y telemática, sistemas alter-
nativos de telecomunica-
ciones.
Parque Científico Tecnol-
ógico de Gijón

**ITRESA INGENIERIA
ASTURIANA DE
INFORMÁTICA INDUS-
TRIAL, S.L.**
C/ Cabueñes s/n
33203 GIJÓN
985-099225 F 985-099226
itresa@itresa.com
Ana María Alvarez
Control y supervisión de
procesos industriales, des-
arrollo de software, auto-
matización de viviendas y
edificios, formación.
Parque Científico Tecnol-
ógico de Gijón

**CENTRO DE INTELIGEN-
CIA ARTIFICIAL**
C/ Cabueñes s/n
33203 GIJÓN
985-099313 F 985-091213
aic-pct@aic.uniovi.es
Oscar Luaces
Institución de la Universi-
dad de Oviedo dedicada a
la investigación aplicada en
el ámbito de la Inteligencia
Artificial
Parque Científico Tecnol-
ógico de Gijón

TELECA, S.A.
C/ Luis Moya s/n
33203 GIJÓN
985-099227 F 985091213
valley@teleca.es
Jose Angel Vallejo
Consultoría en telecomuni-
caciones. Soluciones infor-
máticas relacionadas con
Internet y Telefonía Móvil.
Parque Científico Tecnol-
ógico de Gijón E Edificio I + D

Cultura *biotec*

Boletín bimestral de actualidad
sobre biotecnología

Número 4

marzo/abril 2003

Sumario

- 1 Autorizadas cinco nuevas variedades de maíz modificado genéticamente en España
- 2 La Secretaría General de Agricultura hace pública la autorización de cinco variedades de maíz genéticamente modificado
- 3 Científicos y agricultores dan la bienvenida a las nuevas variedades
- 3 Preguntas básicas sobre el maíz Bt
- 4 Entrevista a Pedro Barato
- 5 Noticias Antama
- 6 Entrevista a José Ignacio Cubero
- 7 El genoma del arroz
- 8 Agenda
- 8 Publicaciones

Autorizadas cinco nuevas variedades de maíz modificado genéticamente en España

El Ministerio de Agricultura autorizó el pasado mes de febrero cinco nuevas variedades de maíz modificado genéticamente resistente a la plaga del taladro que comercializarán las empresas Syngenta, Pioneer, Monsanto, Nickerson y Limagrain. Estas variedades contienen modificaciones genéticas que fueron aprobadas por la Unión Europea a lo largo de 1997 y 1998 y estaban a la espera de su inscripción en el Registro de Variedades Vegetales.



Entrevista

Pedro Barato, presidente de ASAJA

"Creemos que las autorizaciones son un paso hacia delante. Hay una demanda en el campo a la que hay que dar respuesta. Si se puede importar maíz transgénico, ¿por qué no podemos producirlo aquí en España?"



antama

FUNDACIÓN PARA LA APLICACIÓN DE
NUEVAS TECNOLOGÍAS EN LA AGRICULTURA,
EL MEDIO AMBIENTE Y LA ALIMENTACIÓN

La Secretaría General de Agricultura hace pública la autorización de cinco variedades de maíz genéticamente modificado

El Ministerio de Agricultura ha autorizado cinco nuevas variedades de maíz modificado genéticamente resistente a la plaga del taladro que comercializarán las empresas Syngenta, Pioneer, Monsanto, Nickerson y Limagrain. Estas variedades contienen modificaciones genéticas que fueron aprobadas por la Unión Europea a lo largo de 1997 y 1998 y estaban a la espera de su inscripción en el Registro de Variedades Vegetales. La Secretaría General de Agricultura, Ilma. Sra. D^a Isabel García Tejerina, hizo pública la decisión del Ministerio de ampliar gradualmente las variedades autorizadas en el acto de clausura de Biospain, unas jornadas técnico-empresariales organizadas por la Asociación Española de Bioempresas (Asebio)

El Ministerio de Agricultura ha autorizado en el B.O.E. del 11/03/2003 la comercialización de cinco variedades de maíz Bt genéticamente modificado resistente a la plaga del taladro que serán comercializadas por las empresas productoras de semillas Syngenta, Pioneer, Monsanto, Nickerson y Limagrain. Estas variedades proceden de los eventos Bt 176 y Mon 810, que fueron aprobados por la Unión Europea en 1997 y 1998 respectivamente.

En la actualidad Syngenta Seeds es la única compañía que comercializaba una variedad de maíz Bt, denominado Compa CB, desde 1998. Durante la pasada campaña se cultivaron unas 20.000 hectáreas en zonas donde la plaga del taladro es más persistente. Estas 20.000 hectáreas suponen un 5% de la superficie total de maíz sembrado en España, que asciende a 485.000 hectáreas.

El anuncio de las autorizaciones fue realizado por Isabel García Tejerina, Secretaria General de Agricultura, durante Biospain, un ciclo de conferencias técnicas organizadas por la Asociación Española de Bioempresas (Asebio), quien explicó con todo detalle qué razones habían motivado estas autorizaciones.

Durante su intervención, García Tejerina basó la premisa de la aprobación de estas variedades "en los cinco años de exitosa convivencia del maíz Bt con los cultivos convencionales, se ha demostrado que la coexistencia es posible para beneficio de los agricultores. También se ha contado con unos planes de seguimiento impecables que no han detectado ningún efecto perjudicial, y por último hay que tener en cuenta el clima europeo de mayor apertura hacia el desarrollo de esta tecnología".

García Tejerina añadió que la firma de estas variedades "no por ser un paso pequeño es menos importante para mover un proceso que llevaba años estancado", destacando el papel relevante que ha tomado España "en una realidad que se impone".

También comentó que estas nuevas variedades darán la oportunidad a los agricultores españoles de competir en los mercados europeos y mundiales en un momento especialmente difícil como es la reforma de la PAC y que impulsarán el desarrollo de las zonas rurales más desfavorecidas.



Por último, dijo que el seguimiento de estas nuevas variedades será exhaustivo, para garantizar su calidad, su seguridad, y el respeto a la biodiversidad que caracteriza a un país como es España.

Características del maíz Bt

El maíz Bt tiene la propiedad de ser resistente a las orugas de la plaga del taladro, un insecto que puede producir hasta un 15% de pérdidas en las cosechas en ciertas zonas en las que es muy persistente, como el Valle del Ebro. Para conseguir ser inmune frente a esta plaga, el maíz Bt expresa una proteína natural procedente de un bacilo del suelo, llamada *Bacillus Thuringiensis*, que sin embargo es inocua para el resto de insectos beneficiosos.

En zonas de plaga de taladro, el maíz Bt puede ser hasta 150 euros por hectárea más rentable para el agricultor, y ahorrarle una media de 20 euros por hectárea en productos fitosanitarios. Estos datos se desprenden del informe elaborado por la consultora independiente Brookes West y presentado el pasado mes de septiembre en Lleida.

Preguntas básicas sobre el maíz Bt

1) ¿Qué es el maíz Bt?

El maíz Bt es una variedad de maíz que ha sido modificado genéticamente para protegerlo contra unas plagas conocidas como taladros (*Ostrinia nubilalis* y *Sesamia nonagroides*), gracias a una proteína procedente de una bacteria natural del suelo llamada *Bacillus thuringiensis*. El maíz Bt es inocuo para el resto de insectos auxiliares, así como para el resto de flora y fauna y para el ser humano.

2) ¿Por qué resulta tan difícil controlar la plaga del taladro?

La mayoría de los insecticidas convencionales actúan por contacto y su actividad residual es limitada, por lo que tienen un acceso casi nulo a las larvas de taladro, que se introducen nada más nacer en el tallo de la planta donde quedan protegidas. Además, normalmente aparecen dos o tres generaciones de taladros por temporada, algo que complica y encarece un control efectivo sobre la plaga.



3) ¿Es rentable para los agricultores invertir en el maíz Bt?

En caso de infestaciones de taladro, el descenso de productividad puede rondar un 10% de la cosechas, es decir, en torno a 1.200 kilos por hectárea. Suponiendo que el agricultor vendiera el maíz a un precio medio de 0,15 euros/kilo la pérdida total rondaría los 180 euros por hectárea.

4) ¿Qué controles pasan las variedades de maíz Bt antes de su comercialización?

1. El procedimiento común de evaluación de riesgo para el medio ambiente, que se basa en el principio de precaución.
2. La inclusión de los posibles efectos directos, indirectos, inmediatos y diferidos.
3. El Plan de Seguimiento de los cultivos.

La autorización de comercialización de un cultivo modificado genéticamente en la Unión Europea debe ser aprobada por los quince Estados miembros por mayoría cualificada a propuesta de los organismos nacionales competentes.

Una vez que una modificación genética específica está autorizada en la UE las nuevas variedades de semilla que contengan estas modificaciones genéticas sólo pueden cultivarse en aquellos países en los que sean autorizadas por los organismos competentes.

Científicos y agricultores dan la bienvenida a las nuevas variedades

Esteban Andrés, secretario general de Asaja Aragón

El sector esperaba desde hace años que la biotecnología fuera una herramienta competitiva al servicio de la agricultura. En Aragón ya tenemos experiencia con una variedad de maíz Bt que se ha cultivado durante cinco años. Por ello sabemos que estas variedades aportan competitividad al sector gracias a una mayor productividad. La incorporación de este tipo de cultivos supone también una ventaja medioambiental al restringir los tratamientos fitosanitarios.

Ramón Tamames, economista

La decisión del Ministerio me parece bien. Es un avance significativo frente al quietismo observado hasta el momento. En mi opinión, estas variedades tendrán consecuencias positivas. Serán necesarios menos insecticidas, y eso mejorará el medio ambiente, sobre todo para la avifauna. Estas autorizaciones son un paso para el fin de la moratoria de la UE, que está orientándose -y sobre todo Francia- hacia una línea más abierta y de mayor aceptación de los OGMs.

José Ignacio Cubero, catedrático de Genética y Mejora Vegetal de la Universidad de Córdoba

Esta autorización da optimismo a todos los investigadores. Había dudas sobre si los proyectos de investigación basados en biotecnología iban a tener éxito o no. Ahora los investigadores confiarán más en que su trabajo tendrá eficacia práctica y no se quedará en investigación académica. Desde el punto de vista agrícola, las nuevas variedades constituyen una oferta más. La sociedad debe estar tranquila porque las autoridades han comprobado que estos productos no tienen ningún efecto negativo y sí efectos positivos.

Pere Puigdomenech, director del Instituto de Biología Molecular de Barcelona (CSIC)

Hasta ahora las variedades utilizadas han demostrado traer beneficios sobre todo a los agricultores, algo que desde luego debemos celebrar. Si no se dieran estos beneficios las variedades no se emplearían. La autorización es un reconocimiento al trabajo de análisis de las variedades llevado a cabo por los comités científicos español y europeo.

Andreu Palou, catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de las Islas Baleares

La autorización en España de nuevas variedades de maíz-Bt, genéticamente protegidas contra insectos es una buena noticia, que se corresponde con el camino en la normalización en Europa del empleo de la biotecnología en agroalimentación.

Noticias Antama

Periodistas y científicos coinciden en la necesidad de informar con rigor sobre los transgénicos

Científicos y empresas de Biotecnología han mejorado en la comunicación sobre los organismos modificados genéticamente (OMGs) en los últimos dos o tres años, según afirmó el vicepresidente de la Asociación de Periodistas de Información Ambiental (APIA), Antonio Calvo Roy. Periodistas y expertos reivindican la importancia de que los medios se hagan eco de los progresos científicos como parte esencial de la cultura.

Es necesario mejorar la comunicación entre científicos y periodistas para ofrecer una información de calidad sobre los transgénicos y el conjunto de los avances científicos en los medios de comunicación. Ésta ha sido la conclusión más importante de las jornadas sobre "Los medios de comunicación en el debate público sobre los transgénicos", organizadas por la Facultad de Ciencias de la Información de la Universidad Complutense y la Fundación ANTAMA y celebradas los días 2 y 3 de abril.

Estas sesiones han sentado en la misma mesa a periodistas y científicos con el fin de intercambiar opiniones sobre la información que ofrecen los medios de comunicación de los organismos modificados genéticamente (OMGs). La opinión general es que en los últimos tres años se aprecia que los medios dan más espacio a las informaciones sobre los aspectos positivos de los transgénicos. El vicepresidente de APIA, Antonio Calvo Roy, atribuye esta evolución a que científicos y empresas de biotecnología han mejorado su labor de comunicación. En este sentido, la directora de comunicación de la organización de consumidores CE-ACCU, Yolanda Quintana, destacó que se está rompiendo la "espiral de silencio" que rodeaba a las opiniones favorables a los transgénicos, que hasta hace poco no encontraban sitio en los medios por ser minoritarias.

Por su parte, Emilio Muñoz, científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) destacó los datos del último Eurobarómetro sobre Biotecnología, según el cual ha crecido el optimismo de los europeos respecto de esta tecnología: un 43% de la población comunitaria es optimista frente a un 17% de pesimistas, datos que invierten la tendencia observada en los últimos años.

Estas jornadas han contado con la participación de Malén Ruiz de Elvira (EL PAÍS), Coral Larrosa (Tele 5), Miguel Villarejo (LA GACETA DE LOS NEGOCIOS), Mercedes Salas (EFEAGRO), M^a García de la Fuente (Europa Press), Pere Estopinyà (Programa Redes de TVE) y otros muchos profesionales de la información. Como representantes de la comunidad científica acudieron José Luis García y Emilio Muñoz (CSIC), Carmen Fenoll (Universidad de Castilla-La Mancha), Montaña Cámara (Universidad Complutense) y Daniel Ramón (Universidad de Valencia). Estos investigadores pidieron a los periodistas que consulten a los expertos para elaborar las noticias y apelaron a su "responsabilidad" y "profesionalidad" para redactar informaciones serias.



La sociedad demanda más información fiable sobre los transgénicos

Miles de personas visitaron el stand de la Fundación ANTAMA en la IV Feria Madrid por la Ciencia para conocer mejor qué son los organismos modificados genéticamente (OMGs) y cuáles son sus aplicaciones en la agricultura, el medio ambiente y la alimentación. La encuesta realizada entre ellos revela que falta información sobre el tema.

Las personas que acudieron a esta cuarta edición de Madrid por la Ciencia, celebrada del 13 al 16 de febrero en el recinto ferial Juan Carlos I de Madrid, mostraron una gran curiosidad por los OMGs. Además de recoger documentación y preguntar por las fotos, plantas y datos que aparecían en el stand, cerca de 200 personas participaron en nuestra encuesta de opinión sobre los transgénicos.

La conclusión más importante es que la mayoría de los encuestados (un 83%) quieren tener información contrastada sobre estos productos, frente a un 17% que asegura que sí recibe información suficiente. Aunque la mayoría de los encuestados (un 80% en total) tiene alguna o bastante información sobre los transgénicos, muchos de ellos se quejan en sus comentarios de que el principal problema para

formarse una opinión sobre este tema es la confusión y las opiniones extremas (a favor y en contra) de los OMGs.

Además del medio de información preferido para recibir más datos sobre los OMGs, quisimos saber cuáles de las fuentes de información tienen más credibilidad en la sociedad. A juicio de los encuestados, los científicos son los que merecen más confianza, con más de un 53% de opiniones favorables. Le siguen a cierta distancia las organizaciones ecologistas y las organizaciones de consumidores (26 y 21%, respectivamente). En este apartado, llama especialmente la atención la escasa credibilidad que merecen los medios de comunicación y las administraciones públicas (ambas rondan el 5%).

A la pregunta de si cree que son seguros para la salud humana y el medio ambiente, la mayoría de las personas (casi el 59%) que contestaron a la encuesta cree que sí son seguros. De ellos, casi el 42% creen que son seguros pero albergan dudas al respecto. Mientras, algo más del 17% está convencido de que son seguros. Por el contrario, más del 40% considera que no son seguros y de éstos, de este porcentaje, casi el 21% cree que no son seguros pero tiene dudas, mientras que el 20% está convencido de que no son seguros.

La pregunta relativa a la decisión de compra de alimentos transgénicos ha dado resultados muy curiosos, ya que los encuestados parecen dar más importancia a los beneficios medioambientales que a los nutricionales. Así, un 48% de los encuestados asegura que compraría alimentos transgénicos si fueran beneficiosos para el medio ambiente, pero sólo un 21% los adquiriría si fueran más nutritivos.



“Cada variedad modificada genéticamente aprobada lleva detrás un trabajo inmenso no sólo de obtención sino de control”

José Ignacio Cubero, catedrático de Genética de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Córdoba acaba de publicar la segunda edición actualizada de su obra *Introducción a la mejora genética vegetal*, que pretende ser un compendio básico, aunque muy completo, de todas las herramientas actuales de mejora vegetal, así como de la legislación que las enmarca.

Pregunta: ¿Qué novedades introduce esta segunda edición de *Introducción a la Mejora Genética Vegetal* respecto a la primera edición?

Muchas, de hecho, el libro pasa de 365 a 567 páginas. Todos los capítulos han sido ampliados, sobre todo los destinados a ingeniería genética y a conservación, registro y protección de semillas, que se han actualizado hasta la fecha de edición. Hay cuatro capítulos nuevos, entre ellos uno dedicado a marcadores y mapas genéticos, una herramienta absolutamente necesaria para el mejorador de hoy, y otro a especies forestales, tan olvidadas en los textos de mejora.

P: También es curioso ver que la portada está llena de rosas, ya que sabemos que usted es un gran experto en estas flores. ¿Las consideraría un símbolo de las variadas posibilidades que ofrece la mejora genética vegetal?

Desde luego, y en muchos sentidos. La portada de la 1ª edición tenía una serie de maíces, desde el silvestre hasta un híbrido moderno, para mostrar lo que se puede hacer en mejora, pero me quedaba dentro de una misma especie, el maíz. La rosa actual tiene genes de por lo menos diez especies distintas, con constituciones cromosómicas diversas y orígenes geográficos que van desde el Lejano Oriente hasta América del Norte, pasando por Persia, Oriente Próximo y Europa. Ha sido un trabajo lento y paciente de auténtica biotecnología que viene desde tiempos muy antiguos. Es algo, además, en lo que todavía cabe el trabajo del aficionado junto al del profesional. Y, por no alargarme en explicaciones, he querido indicar que las especies ornamentales también caen dentro de la competencia de la Mejora Vegetal, ya que han sido olvidadas tradicionalmente en los textos clásicos, como si existieran dos mundos diferenciados.

“Nos falta una política agraria que dirija a largo plazo, que defina prioridades en función de la agricultura que se desea para el futuro”

P: ¿Qué protagonismo considera usted que le corresponde a la mejora genética vegetal a la hora de hacer frente al constante aumento de población, que tiene que alimentarse con la misma tierra que siempre?

Cada época de crisis alimentaria, que sucede cuando o aumenta la población en conjunto o, normalmente, cuando se masifica en ciertos lugares llamados ciudades, ha necesitado una nueva agricultura y, por lo tanto, una nueva mejora, es decir, nuevas técnicas. Digo “por lo tanto” porque no es posible pensar en nueva agricultura sin nuevas variedades. También, por supuesto, nuevas técnicas agronómicas, cuyo avance debe ser no sólo paralelo sino coordinado con el de las nuevas variedades. Aquellas y éstas han de ir de la mano. Es tan absurdo darle a un buen agricultor una

variedad primitiva como darle a uno malo la mejor de las variedades. Es algo lógico pero que se olvida con demasiada frecuencia.

P: ¿Podría describirnos cómo está el panorama actual en España en lo que a investigación de mejora genética vegetal se refiere en comparación a otros países europeos y al resto del mundo?



El nivel es muy bueno, tan bueno como en otro país cualquiera. Incluso en lo más complejo. Nos falta una política agraria que dirija a largo o por lo menos a medio plazo, que defina prioridades en función de la agricultura que se desea para el futuro. No es lo mismo obtener variedades para invernadero que para campiñas, o que para agricultura sostenible. Cuando se piensa en grandes cultivos que le han proporcionado al país no pocos ingresos y que están vírgenes en cuanto a la labor de mejora sobre ellos, no puede uno dejar de caer una lagrimita. Seguimos yendo por cosas a otros países cuando pueden conseguirse aquí con un esfuerzo, eso sí, continuo y en equipo. Faltan incentivos, y el más importante es la estabilidad en el trabajo para la gente joven.

P: ¿Cree usted que la reciente inscripción en el Registro de Variedades de nuevos maíces Bt modificados genéticamente supondrá un impulso para el desarrollo de la Biotecnología agrícola en España?

Desde luego que sí, aunque todavía no sé, si bien lo sospecho, por qué se ha tardado tanto. Es hora de que se sepa que cada una de esas variedades lleva detrás un trabajo inmenso no sólo de obtención, sino de control para asegurar su inocuidad en el ambiente, en la agricultura y en los humanos. Cuando se sepa que son productos excelentes y, en otros sentidos, tan normales como los demás, espero que se potencien las nuevas técnicas. Está siendo una espera demasiado larga sin justificación científica.

El genoma del arroz

Si hemos de creer lo que dicen quienes han comentado el resultado, el genoma del arroz va a ser el proyecto genoma más importante después del humano. Dejando el obvio entusiasmo por el resultado obtenido, y los intereses ligados al proyecto, no hay duda que se trata de un conjunto de datos de una enorme importancia. El arroz es la base de la alimentación para una parte muy importante de la humanidad y los cereales: trigo, cebada, maíz, sorgo, etc., son la base esencial de la alimentación de la humanidad y lo serán durante mucho tiempo. Y ya sabemos que la comida va antes que muchas otras cosas.

De hecho lo que se ha publicado a principios del 2002 es un resultado preliminar. Publicar los resultados a distintos niveles de refinamiento de los resultados es algo que se está haciendo en muchos casos en los proyectos genoma. El trabajo es grande y se estira en varias publicaciones. A principios de este año se publicaron dos borradores relativamente primitivos del genoma del arroz. Uno de ellos fue realizado por la empresa Syngenta y otro por un Instituto de la República Popular China. Hay que decir que el genoma del arroz ha sido también secuenciado por otra empresa, Monsanto, y que desde hace años un consorcio público en el que participan distintos países como Japón, Estados Unidos, Francia, y distintos países del Asia del Sudeste, está abordando el tema. Puede parecer sorprendente que un proyecto difícil y costoso como éste se lleve a cabo por varios grupos a la vez. Esto responde por una parte al interés de las empresas en llegar lo antes posible a genes de interés que puedan incorporar a su cartera de propiedad intelectual. Mientras tanto hay proyectos públicos que, quizá más lentamente, se proponen poner este conocimiento al alcance de toda la comunidad científica, pública y privada. Finalmente hay iniciativas de gobiernos que pretenden demostrar que llevan la delantera en proyectos de una importancia tan fundamental, es el caso de China.

En el caso de las publicaciones de este año el trabajo está lejos de estar terminado y los datos del genoma del arroz que están disponibles tienen todavía muchas lagunas. Sí se puede comenzar a decir alguna cosa, por ejemplo, parece que el número de genes es superior al del otro genoma de plantas disponible, el de *Arabidopsis thaliana*, quizá algo así como entre 40 y 60 mil genes, con lo que sería incluso superior al del genoma humano. Habrá que analizar qué nivel de duplicación de genes, un fenómeno que parece muy general en los genomas de plantas, existe en el arroz. Y el trabajo posterior nos deberá permitir conocer el significado de estos números.

En cualquier caso el arroz es el punto de partida para conocer mejor el funcionamiento de genes que sean importantes para

la agricultura. Comparando este genoma con el de *Arabidopsis* ya está indicando elementos esenciales entre los distintos tipos de plantas y los que distinguen especies que son tan diferentes entre ellas. Se están también desarrollando sistemas para el análisis de la función de los genes en el arroz que claramente está más cerca de las que interesan a la agricultura que *Arabidopsis*. La comparación de genomas de plantas indica que habrá que analizar en cada especie para conocer para qué sirve cada gen en concreto. Ya aparece que la extrapolación de datos genéticos de una a otra especie no será tan obvia como parecía. Por esto, si bien los sistemas modelo son esenciales para entender meca-



nismos básicos del funcionamiento de los genes, los datos que estamos obteniendo indican que cada especie utiliza muchos de los genes importantes de una forma propia y que, en el caso de las plantas, en las que se utiliza una variedad de especies muy distintas, habrá que realizar un esfuerzo de comparar y analizar entre ellos genomas de distintas especies. Por ello se está abordando el genoma del maíz, (que es cinco veces mayor que el del arroz) y por ello el tener el primer genoma de una planta económicamente importante como el arroz es una gran noticia. Lo es incluso tener más de un genoma de la misma especie porque la comparación entre variedades distintas nos revelará la base de la variabilidad genética que es de donde extraemos los elementos que necesitamos para tener una agricultura más adaptada a nuestras necesidades.

Pere Puigdomènech
Profesor de Investigación del CSIC.
Instituto de Biología Molecular
de Barcelona.



Agenda

RAMÓN TAMAMES PRESENTA EL LIBRO *LOS TRANSGÉNICOS: CONÓZCALOS A FONDO*

El próximo 27 de abril a las 13:00 horas en el salón de actos del Museo Nacional de Ciencias Naturales (c/ José Gutiérrez Abascal nº 2), tendrá lugar la presentación del libro *Los transgénicos: conózclos a fondo*.

Este libro ha sido escrito por Ramón Tamames, catedrático de Estructura Económica de la Universidad Autónoma de Madrid, catedrático Jean Monnet de la Unión Europea e ingeniero de Montes de Honor en colaboración con el Instituto de Cuestiones Agrarias y Medioambientales (ICAM) y ha sido editado por Ariel. La Fundación Antama ha colaborado en su publicación.

El informe supone una presentación de carácter general, y con intenciones de difusión a un público muy amplio, no necesariamente especializado en la materia, de una de las cuestiones que actualmente tiene mayor interés para el sistema productivo agrario. En España y en Europa todavía no existe una idea de la magnitud de este tema. Esta y otras razones constituyen la motivación principal de este libro.

Según palabras de Ramón Tamames en la introducción de su libro, "estamos ante desarrollos científicos y nuevas tecnologías que están aquí para quedarse. Negarlo, o argumentar con situaciones no plenamente comprobables o superables un día, es cerrar la senda del progreso científico y de las mejoras económicas".

Más información y confirmación de asistencia:
Fundación Antama
91 571 46 46

Cultura Biotec

Directora: Elena Fernández Guiral

Redacción: María Isabel Cartón

Edita: Fundación Antama

c/ Pensamiento, 27 esc. Izda. 3º puerta 3 • 28020 Madrid

Tfno.: 91 571 46 46 • Fax: 91 571 14 31

www.fundacion-antama.org

antama@fundacion-antama.org

Maquetación e impresión: Conorg, S.A.

Depósito Legal: M-52055-2002

ISSN: 1695-6338

Publicaciones

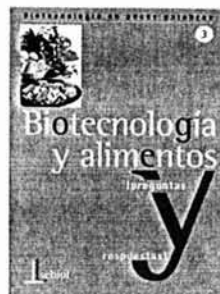
LA SEBIOT PRESENTA EL CUADERNO DIVULGATIVO *BIOTECNOLOGÍA Y ALIMENTOS*

La Sociedad Española de Biotecnología (SEBIOT) y la Fundación Antama presentaron el pasado martes 29 de abril en el salón de actos del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid el cuaderno divulgativo *Biotecnología y alimentos*, perteneciente a la serie *Biotecnología en pocas palabras*.

Esta publicación, en la que han participado más de 20 expertos en Biotecnología procedentes de universidades y centros públicos de investigación, forma parte de una ambiciosa serie de cuadernos que bajo el título *Biotecnología en pocas palabras*, pretende hacer llegar al público no especializado las líneas maestras de esta novedosa tecnología de forma rigurosa y accesible al mismo tiempo. Hasta la fecha se han publicado dos cuadernos divulgativos de la serie: *Plantas transgénicas: preguntas y respuestas* y *Biotecnología y salud*.

En la presentación participaron el director del Museo Nacional de Ciencias Naturales, Alfonso Navas, el presidente de la Sociedad Española de Biotecnología, Francesc Godfà, el Dr. Daniel Ramón, catedrático de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Valencia y el Dr. José Luis García, investigador del Centro de Investigaciones Biológicas y coordinador del cuaderno.

Los interesados en obtener un ejemplar pueden encontrar más información en la página web de Antama www.fundacion-antama.org



LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL EN EL FUTURO DE LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN

Los textos que se presentan en esta publicación son el resultado de la Jornada de Estudio organizada por Foro Agrario en Madrid el pasado 25 de septiembre de 2002 con la colaboración de la Fundación Antama.

Numerosos interrogantes se plantearon y debatieron en esta jornada. Preguntas como ¿Deben Europa y España seguir ignorando el potencial que representa esta tecnología para la nueva agricultura? ¿En qué condiciones se pueden utilizar las variedades transgénicas de manera que no presenten riesgos para la salud de los consumidores ni para el medio ambiente?

Las conclusiones representan, sintéticamente, el estado del conocimiento en la hora presente, la opinión de los expertos que asistieron a la jornada y las recomendaciones para una correcta interpretación de la importancia que la biotecnología vegetal tendrá en el futuro en la agricultura y en la alimentación.

Este libro se puede adquirir a través de la editorial Mundi Prensa: www.mundiprensa.com



MICROBOMBARDEO DE TEJIDOS VEGETALES

SISTEMA BIORAD PDS100/He

Lorenzo

Preparación de los microproyectiles

- 1.- Pesar 60 mg de micropartículas (tungsteno M10, 1 μ m diámetro medio) en un tubo de 1,5 ml.
- 2.- Añadir 1 ml de etanol 70% y agitar en vórtex 5 min.
- 3.- Incubar 15 min a temperatura ambiente.
- 4.- Centrifugar 5'' en microfuga y descartar el sobrenadante (micropipeta).
- 5.- Repetir 3 veces:
 - a) Añadir 1 ml agua estéril y agitar en vórtex 1 min.
 - b) Dejar sedimentar las partículas (1 min).
 - c) Centrifugar 5'' en microfuga y descartar el sobrenadante (micropipeta).
- 6.- Añadir 1 ml glicerol 50% estéril y agitar en vórtex 1 min.
- 7.- Almacenar la suspensión de micropartículas (60 mg/ml) a 4°C (máximo 2 semanas).

Recubrimiento de los microproyectiles con el DNA

Para cada bombardeo:

- 1.- Agitar en vórtex la suspensión de micropartículas (60 mg/ml) 5 min.
- 2.- Pasar 10 μ l de micropartículas (600 μ g) a un tubo de 1,5 ml.
- 3.- Mientras se agita constantemente el tubo en vórtex, añadir:
 - 1 μ l (1 μ g) de DNA (plásmido purificado por Qiaprep o similar). *5 μ l $\approx$ 1-2 μ g*
 - 14 μ l solución de precipitación (10 μ l de CaCl_2 2,5 M y 4 μ l espermidina 0,1M).
- 4.- Continuar agitando en vórtex 5 min.
- 5.- Dejar sedimentar las partículas (1 min).
- 6.- Centrifugar 5'' en microfuga y descartar el sobrenadante (micropipeta).
- 7.- Añadir 100 μ l de etanol 70% sin resuspender las micropartículas.
- 8.- Eliminar el sobrenadante (micropipeta).
- 9.- Añadir 100 μ l de etanol absoluto sin resuspender las micropartículas.
- 10.- Eliminar el sobrenadante (micropipeta).
- 11.- Añadir 6 μ l de etanol absoluto y resuspender las micropartículas con la micropipeta.

Seedlings A thaliana 15 días

Microbombardeo

- 1.- Poner en marcha la cabina de flujo laminar.
 - 2.- Esterilizar con etanol la superficie de la cabina y el interior de la cámara de bombardeo.
 - 3.- Esterilizar sumergiendo brevemente en placas Petri con etanol:
 - soporte metálico para las membranas portadoras.
 - membranas portadoras.
 - rejillas de parada.
 - 4.- Dejar secar las piezas esterilizadas sobre papel secante.
 - 5.- Abrir la bombona de helio y ajustar la presión a 1300 psi.
 - 6.- Depositar las micropartículas recubiertas del DNA (6 μ l) sobre una membrana portadora seca.
 - 7.- Dejar que se evapore el etanol (1 min).
 - 8.- Poner la membrana portadora en el soporte metálico con las micropartículas hacia arriba.
 - 9.- Ajustarla empleando el tapón rojo.
 - 10.- Poner una rejilla de parada en el soporte disparador.
 - 11.- Colocar el soporte con la membrana en el disparador, con las micropartículas hacia la rejilla.
 - 12.- Cerrar el disparador enroscando el cierre metálico.
 - 13.- Esterilizar un disco de ruptura (1100 psi) sumergiéndolo brevemente en etanol.
 - 14.- Poner el disco de ruptura en su soporte y enroscarlo en la parte superior de la cámara.
 - 15.- Poner la plataforma con el disparador montado en el nivel 5 (el nivel 1 es el inferior).
 - 16.- Colocar la plataforma con la muestra a bombardear en el nivel 2.
 - 17.- Cerrar la cámara y poner en marcha la bomba de vacío.
 - 18.- Conectar la cámara de bombardeo y accionar el interruptor del vacío (posición superior).
 - 19.- Cuando la presión de vacío llegue a 27, accionar el interruptor para pararlo (posición inferior).
 - 20.- Inmediatamente, pulsar el interruptor de disparo hasta romper el disco de ruptura.
- NOTA: En este punto se escuchara la ruptura del disco y el manómetro que mide la presión de helio situado en la parte superior de la cámara mostrará la caída de presión desde 1100 a 0.
- 21.- Abrir el vacío (posición intermedia) hasta que la presión alcance el nivel normal.
 - 22.- Sacar la muestra e incubar para permitir la expresión de la construcción introducida.
 - 23.- Descartar el disco de ruptura (debe estar roto), la membrana portadora y la rejilla.
 - 24.- Preparar un nuevo disparo (volver a 6.-).
 - 25.- Una vez acabada la sesión de microbombardeo:
 - Limpiar las piezas utilizadas y el interior de la cámara con etanol.
 - Cerrar la bombona de helio.
 - Hacer el vacío en la cámara hasta que se encienda el botón disparador.
 - Disparar varias veces hasta liberar el helio de los conductos (la presión cae a cero).
 - Romper el vacío y abrir la cámara.

Optimization of Biolistic[®] Transformation Using the Helium-Driven PDS-1000/He System

William Heiser, Ph.D., Research and Development Department,
Genetic Systems Division, Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred
Nobel Drive, Hercules, CA 94547

Summary

We have found that the most important factors which must be optimized in Biolistic transformation are target distance and microparticle size. Changing most other parameters, within a broad range, usually has minimal effect on transformation efficiencies. In this report we describe a strategy for optimizing Biolistic transformation. We use two model systems to show how this strategy can be employed by developing optimal conditions for stable transformation of yeast and transient expression in cauliflower stem sections.

Introduction

The Biolistic process, first reported by Sanford, *et al.* (1987), is a method by which foreign substances are introduced into intact cells and tissues via high-velocity microprojectiles. Transformation of biological material using the Biolistic method has been shown to be a valuable technique for delivering DNA into the cells of plant (Klein, *et al.*, 1988 a, b), animal (Williams, *et al.*, 1991), and microbial species (Shark, *et al.*, 1991), as well as into subcellular organelles (Johnston, *et al.*, 1988; Daniell, *et al.*, 1991). Achieving high rates of DNA expression in each of these cases often requires that time be spent in optimizing some of the parameters involved in transformation. However, this task can be difficult, considering the large number of parameters which can be varied in the system. In addition, there has been a recent modification of the commercially available instrument which now uses a helium-powered acceleration system (Sanford, *et al.*, 1991). This report outlines an approach to optimizing microparticle and particle accelerator parameters with Bio-Rad's PDS-1000/He system using two biological systems, transient expression of the β -glucuronidase (GUS) gene in cauliflower epidermal cortex, and stable expression of a wild-type *URA 3* gene in an auxotrophic mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. The microparticle variables include the size, amount, and type of microparticles; the accelerator parameters include the helium pressure, the distance between the rupture disk and macrocarrier (the gap distance), the distance between the macroprojectile and the stopping screen (the macrocarrier travel distance), and the distance between the stopping screen and the biological target (the target distance). See Figure 1 for a graphic representation of

these variable distances. In order to obtain the maximum number of transformants, it is also necessary to optimize the biological parameters associated with the target tissue. These factors include the state of growth of the target cells, the cell density, the osmolarity of the bombardment medium, the treatment of the cells post-bombardment, and the expression vector being used for transformation (Sanford, *et al.*, 1992).

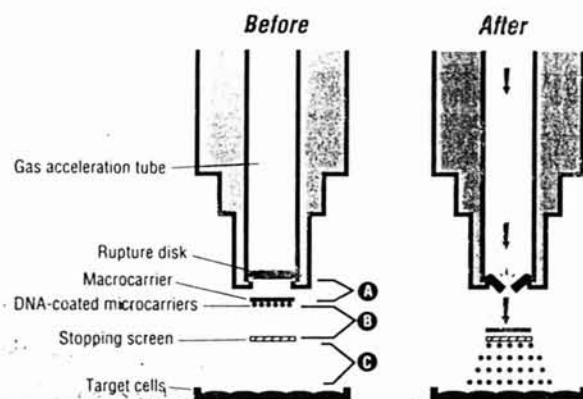


Fig. 1. Schematic representation of the PDS-1000/He system before and after activation (not to scale). A, B, and C are the adjustable distances that influence the velocity with which the microcarriers hit the target cells. A. rupture disk - macrocarrier gap distance. B. macrocarrier travel distance. C. target distance. The arrows indicate the direction of helium flow.

Methods

Preparation of Yeast and Cauliflower

The yeast auxotroph, *S. cerevisiae* st 948 (Armaleo, *et al.*, 1990), contains non-reverting mutations in the *ura 3* and *leu 2* genes, and was used for all experiments with yeast. Yeast were prepared for bombardment as described by Klein, *et al.* (1991). Briefly, cells were grown to early stationary growth phase in YEPD media. Cells were concentrated 100-fold by centrifugation, and 10^8 cells were spread on uracil-deficient agar plates containing 0.75 M sorbitol and 0.75 M mannitol. Seeded plates were kept for 2-4 hours at room temperature before transformation. After bombardment, the cells were incubated for 60 hours at 30 °C, at which time the colonies were counted.

Cauliflower was obtained from a local produce market. The main stems were sectioned into approximately 1 cm squares (2-4 mm thick), and nine longitudinal sections were placed in a 3 x 3 array in the center of 100 mm Petri plates containing 1% agar (Klein, *et al.*, 1991). The agar acted as a support to

help the tissue sections absorb the shock from the bombardment and also kept the tissues moist during overnight incubation. After bombardment of the epidermal cells, the tissue was incubated for 24 hours at 24 °C. The location of GUS-expressing cells was visualized using a histochemical reaction (Jefferson, *et al.*, 1987). Cauliflower sections were transferred to 16 mm wells containing 0.8 ml of GUS assay buffer (0.5 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 0.06% Triton X-100, 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0) and incubated at 37 °C. After 18 hours, the tissue sections were evaluated for their level of GUS expression (see Table 1, footnote c).

Plasmids

Plasmid YEp352 (Hill, *et al.*, 1986), which contains a wild-type *ura 3* gene, was used for transformation of yeast. Cauliflower tissue was bombarded with the plasmid pBI221, which contains the GUS gene expressed from the cauliflower mosaic virus 35S promoter (Jefferson, *et al.*, 1987). Both plasmids were prepared by alkaline lysis (Maniatis, *et al.*, 1982) followed by cesium chloride purification and ethanol precipitation.

Biolistic Transformation

We recommend using conditions previously reported to transform a similar biological system as a starting point for the optimization of Biolistic transformation. For example, Armaleo, *et al.* (1990) report the use of 1.1 μ m tungsten particles (equivalent to M17 tungsten) and a vacuum of 0.03 atmospheres (equivalent to 29 inches Hg) to transform yeast cells with the gunpowder-powered PDS-1000 unit (the precursor to the PDS-1000/He system). These parameters were used as starting conditions for optimizing bombardment of yeast with the helium-driven PDS-1000/He system. Preliminary experiments had indicated that a helium pressure of 1,300 pounds per square inch (psi) would produce large numbers of transformants (R. Arentzen, personal communication). Starting conditions for transformation of cauliflower sections were chosen as 1 μ m diameter gold or M17 tungsten microparticles and a helium pressure of 1,300 psi, based on experiments using other plant systems (T. Klein, pers. comm.).

Unless otherwise noted, the following parameters were kept constant in all of the experiments described here:

Chamber vacuum	28" Hg (0.06 atm)
Gap distance	1/4"
Macrocarrier travel distance	8 mm (stopping screen at middle level)
Microcarriers/bombardment	500 μ g
DNA/bombardment	833 ng

These conditions have proven to be "standard" for Biolistic experiments involving most cell types (J. Sanford, pers. comm.).

Both gold and tungsten microparticles were prepared, and coated with supercoiled plasmid essentially as described by Sanford, *et al.* (1992; see Appendices 1 and 2). Microparticles

were dried onto macrocarriers in individual "desiccators" (Petri dishes containing CaSO_4) immediately upon application, and were used within 2 hours of drying.

Results

Cauliflower

An example of cauliflower sections transformed with the plasmid pBI221 and stained for GUS-expressing cells is shown in Figure 2. Each section in the array was scored separately and given a semi-quantitative score based on the relative number of GUS-positive cells (see Figure 2 and Table 1, footnote c). Results of an experiment to determine the effects of microparticle size, helium pressure, and target distance are shown in Table 1. Several observations were made from the initial experiment (Table 1, Experiment 1): (1) while both M10 (median particle diameter of 0.7 μ m) and ^{1.1 μ m} M17 tungsten microparticles may be used for cauliflower transformation, the latter are consistently more effective; (2) tissue sections bombarded at level 2 (6 cm target distance) are transformed more efficiently than sections bombarded at level 4 (12 cm target distance); and, (3) changing the helium pressure between 1,100 and 1,550 psi has little effect on transformation efficiency. Subsequent results confirmed these conclusions and also indicated that similar transformation efficiencies were achieved with all pressures from 900 to 1,550 psi (Table 1, Experiments 2 and 3). Transformation results using 1.0 μ m and 1.6 μ m gold microparticles to bombard tissue sections at level 2 or 4 also indicated that the highest transformation efficiency was obtained using the larger particles with the shorter target distance. As with the tungsten microparticles, varying the helium pressure between 900 and 1,550 psi had little effect on transformation efficiency.

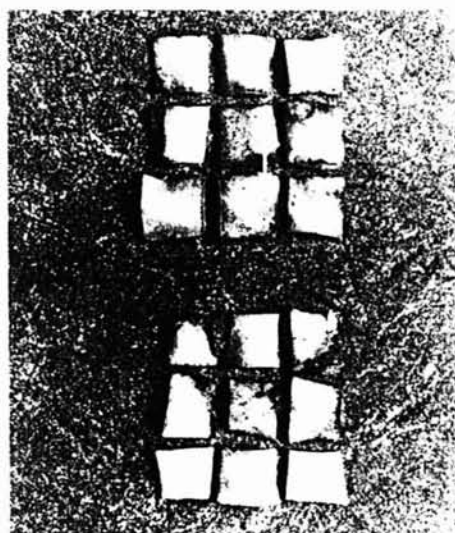


Fig. 2. Example of GUS expression in cauliflower epidermal sections. Cauliflower sections were bombarded with pBI221 coated onto 1.6 μ m gold microparticles and stained with GUS assay buffer as described in the Methods section. Each cauliflower section is placed in its location, but not necessarily its actual orientation, at the time of bombardment. The spot marked by the arrow represents a typical positive response.

Table 1. Effects of microparticle size, helium pressure, and target distance on transformation of cauliflower tissue

Microparticles	Helium Pressure ^a	Target Distance ^b	GUS Score ^c		
			Expt. 1	Expt. 2	Expt. 3
M10 tungsten	1,100	6	+		
	1,300	6	+++		
	1,550	6	+		
	1,100	12	0		
	1,300	12	+		
	1,550	12	0		
M17 tungsten	900	6	++++		
	1,100	6	++++		++++
	1,300	6	++++		++++
	1,550	6			++++
	1,100	12	+++		
	1,300	12	0		
1.0 µm gold	1,550	12	+		
	1,100	6		++	
	1,300	6		+	
	1,550	6		++	
	1,100	12		+	
	1,300	12		+	
1.6 µm gold	1,550	12		+	
	900	6	++++		
	1,100	6	++++		++++
	1,300	6	++++		++++
	1,550	6			+++
	1,100	12	++		
	1,300	12	+++		++
	1,550	12	++++		+++
	1,800	12			++

a Burst pressure of rupture disk in psi.

b Approximate distance (in cm) from the stopping screen to the biological sample. The biological target may be placed at one of four positions, approximately 3 cm (level 1), 6 cm (level 2), 9 cm (level 3), or 12 cm (level 4), below the stopping screen.

c The GUS Score is a semi-quantitative estimation of the level of GUS expression in all nine cauliflower sections in a bombarded plate; each score is the average obtained from three bombardments. Each cauliflower section was given a low (0, +), intermediate (++), or high (+++, +++++, +) value based on the number and density of the blue spots which were visible on the surface of the tissue (see Figure 2). The scores in each column are from separate experiments.

The effect of changing the gap width and macrocarrier travel distance on GUS expression was assayed using optimal conditions determined in the initial experiments (Table 2). At a target distance of 6 cm and bombardment pressures of either 900 or 1,300 psi, changing the gap width or macrocarrier travel distance had very little effect on transient expression. These experiments indicate that for Biolistic transformation of cauliflower sections using the PDS-1000/He system, optimum transient expression is obtained when the sample is placed at level 2 (6 cm target distance) and bombarded at a helium pressure of 900 psi with either M17 tungsten or 1.6 µm gold microparticles.

Stable transformants can not be isolated from cauliflower tissue sections. However, these transient assays may be used as starting conditions for optimizing stable transformation. A rigorous experiment for resolving the optimal conditions for

isolating stable transformants could be determined in a fractional factorial experiment as outlined in Table 4. Such an experiment should be undertaken only if experimental quantitation is relatively simple. A more practical approach would be to vary those parameters which have the greatest effect on transient expression, in this case helium pressure and target level. In optimizing for stable transformation, the most severe Biolistic conditions which are used should be the mildest conditions which produce a high level of transient expression (e.g., helium pressure of 900 psi and target at level 2). Optimization of stable transformation should use lower helium pressures and/or longer target distances than conditions for transient expression. (Also see comments in the Discussion section.) Since similar levels of GUS expression were obtained using M17 tungsten and 1.6 µm gold microparticles, it may be preferable to use gold microparticles for producing stable transformants due to the demonstrated toxicity of tungsten in some plant cells (Russell, *et al.*, 1992b).

Table 2. Effect of gap distance or macrocarrier travel (stopping screen) distance on GUS expression in cauliflower tissue bombarded with pBI221^a

Microparticles	Pressure ^a	Gap Width ^b	Stopping Screen Position ^c	GUS Score ^d
1.6 µm gold	900	1/8"	Middle	+++++
		1/4"	Middle	+++++
		3/8"	Middle	++++
	1,300	1/8"	Middle	++++
		1/4"	Middle	+++++
		3/8"	Middle	+++++
M17 tungsten	900	1/4"	Top	+++
		1/4"	Middle	++++
		1/4"	Bottom	++++
	1,300	1/4"	Top	++++
		1/4"	Middle	+++++
		1/4"	Bottom	++++

a Burst pressure of rupture disk in psi.

b Distance between the rupture disk retaining cap and the macrocarrier cover lid as measured with the PDS-1000/He gap tools.

c Location of the stopping screen support within the fixed nest. Top, Middle, and Bottom refer to the stopping screen support above both spacer rings, between the two spacer rings, and below both spacer rings, respectively. Moving the stopping screen support through the three positions changes the macrocarrier flight distance from approximately 3 mm (Top) to 8 mm (Middle) to 13 mm (Bottom).

d See Table 1, footnote c.

e All bombardments were performed with the tissue samples 6 cm from the stopping screen.

Yeast

The effects of microparticle size, helium pressure, and target distance on transformation of the uracil auxotroph *S. cerevisiae* st 948 with the uracil-containing plasmid YEp352 are shown in Table 3. The initial experiment (Table 3, Experiment 1) shows that both M10 and M17 tungsten microparticles are effective in transforming *S. cerevisiae*, that cells on level 2 are transformed >500-fold more efficiently than cells on level 4, and that changing the helium pressure between 1,100 and 1,550 psi has very

little effect on transformation efficiency. A second experiment (Table 3, Experiment 2) confirmed these conclusions, and also suggested that bombardment with M17 tungsten microparticles consistently produced more transformants than did bombardment with M10 tungsten microparticles. Results with 1.0 μm gold and 1.6 μm gold microparticles indicated that the former were approximately equivalent to M10 tungsten microparticles in transformation efficiency, but that larger gold particles had a 100-fold lower transformation rate than the other three types of microparticles. This suggests that the 1.6 μm gold particles, the largest particles used in this experiment with an average diameter of 1.6 μm , probably destroy the cells upon bombardment.

Table 3. Effects of microparticle size, helium pressure, and target distance on transformation of *S. cerevisiae* with YEp352 DNA

Micro-Particles	Helium Pressure ^a	Target Distance ^b	Colonies Average ^c $\pm$ St. Dev.
Experiment 1			
M10	1,100	6	639 $\pm$ 269
M10	1,300	6	876 $\pm$ 400
M10	1,550	6	952 $\pm$ 346
M17	1,100	6	1,800 $\pm$ 150
M17	1,300	6	1,300 $\pm$ 361
M17	1,550	6	1,307 $\pm$ 190
M10	1,100	12	2 $\pm$ 2
M10	1,300	12	18 $\pm$ 31
M10	1,550	12	1 $\pm$ 1
M17	1,100	12	2 $\pm$ 2
M17	1,300	12	1 $\pm$ 2
M17	1,550	12	2 $\pm$ 3
Experiment 2			
M10	1,100	6	985 $\pm$ 169
M10	1,300	6	720 $\pm$ 284
M10	1,550	6	1,280 $\pm$ 218
M17	1,100	6	1,967 $\pm$ 231
M17	1,300	6	2,193 $\pm$ 170
M17	1,550	6	2,047 $\pm$ 185
1.0 μm Au	1,100	6	1,096 $\pm$ 107
1.0 μm Au	1,300	6	792 $\pm$ 131
1.0 μm Au	1,550	6	878 $\pm$ 72
1.6 μm Au	900	6	5 $\pm$ 6
1.6 μm Au	1,100	6	7 $\pm$ 2
1.6 μm Au	1,300	6	9 $\pm$ 8

a Burst pressure of the rupture disk in psi.

b Approximate distance (in cm) from the stopping screen to the Petri plate containing the yeast.

c The number of transformed colonies are the averages obtained on three or four replicate dishes bombarded at each set of conditions.

Subsequent experiments with *S. cerevisiae* used a fractional factorial design to optimize both gap distance and macrocarrier travel distance as a function of both helium pressure and target distance. In a fractional factorial experiment (Kempthorne, 1983) interactions between several factors are measured at

selected points. A statistical model is then used to predict optimum conditions. An example of this type of experiment, in which the macrocarrier travel distance was varied along with the helium pressure and target distance, is shown in Table 4. Analysis of the three variables indicates that the maximum number of transformants is obtained with the sample at level 2 and the helium pressure between 900 and 1,500 psi. The macrocarrier travel distance had little effect on either increasing or decreasing the transformation efficiency. Similar results were found when the gap width was varied as a function of the helium pressure and target distance; neither increasing nor decreasing the gap width affected the number of transformants produced (results not shown). These results were further verified by changing either the gap width or the macrocarrier travel distance under conditions which were optimal for transformation (M17 tungsten microparticles, target at level 2, and helium pressure of 1,100 psi). Again, there was no significant effect on the number of yeast transformants (results not shown).

Table 4. A fractional factorial experiment designed to optimize helium pressure, target distance, and macrocarrier flight distance for yeast transformation^a

Stopping Screen Position ^a	Helium Pressure ^b	Target Distance ^c	Colonies Average ^d $\pm$ St. Dev.
Middle	900	6	459 $\pm$ 54
Middle	900	12	7 $\pm$ 9
Top	900	9	112 $\pm$ 31
Bottom	900	9	111 $\pm$ 21
Bottom	1,300	12	31 $\pm$ 9
Bottom	1,300	6	354 $\pm$ 37
Top	1,300	12	46 $\pm$ 12
Top	1,300	6	306 $\pm$ 62
Middle	1,300	9	407 $\pm$ 72
Bottom	1,800	9	8 $\pm$ 6
Top	1,800	9	1 $\pm$ 2
Middle	1,800	6	228 $\pm$ 93
Middle	1,800	12	2 $\pm$ 1

a Location of the stopping screen support within the fixed nest (see Table 2, footnote c).

b Burst pressure of the rupture disk in psi.

c Approximate distance (in cm) from the stopping screen to the Petri plate containing the yeast.

d The number of transformed colonies are the averages obtained on three or four replicate dishes bombarded at each set of conditions.

e All bombardments were performed using M17 tungsten microparticles.

Discussion

Transient expression of the GUS gene in cauliflower stem sections and stable transformation of a yeast *ura* auxotroph with the wild type *URA* gene were used as model systems to identify those bombardment parameters which are important for optimization of Biolistic transformation. The parameters and their optimum conditions are summarized in Table 5 for both systems. In both cases, the most important parameter to optimize is target distance; there is a significant decrease in expres-

sion when the target level is changed from the optimum of 6 cm. This is apparent when cauliflower sections are transformed with M17 tungsten microparticles (Table 1) and when yeast are transformed with M10 and M17 tungsten or 1.0 μm gold microparticles (Table 3). This reduced transformation efficiency is most likely due to the lower velocity of the microparticles at longer travel distances.

Table 5. Summary of optimum conditions for stable transformation of *S. cerevisiae* and transient expression in cauliflower stem sections using the PDS-1000/He system

Parameter	Yeast	Cauliflower
Microcarrier	M17 tungsten	M17 or 1.6 μm gold
Rupture disk-macrocarrier gap	1/4"	1/4"
Macrocarrier travel distance	8 mm	8 mm
Chamber vacuum	28 in Hg	28 in Hg
Helium pressure	900 psi	900 psi
Target distance	6 cm	6 cm

Microparticle size also has a significant effect on transformation efficiency, probably for different reasons, however. In the case of cauliflower stem sections, when the optimum particle accelerator parameters were used, the 1.6 μm gold and M17 tungsten (median diameter 1.1 μm) microparticles produced more GUS-expressing cells than did the smaller 1.0 μm gold and M10 tungsten (median diameter 0.7 μm) microparticles. Furthermore, using the 1.6 μm gold microparticles, significant GUS expression was obtained when the cauliflower sections were bombarded at level 4. This may be attributable to the larger size of the 1.6 μm gold microparticles compared to the other microparticles assayed; the velocity of the larger microparticles is less affected by the travel distance. On the other hand, in the case of yeast transformation, using optimum particle accelerator parameters, the M17 tungsten microparticles were slightly better than the 1.0 μm gold and M10 tungsten microparticles in producing *ura*⁺ transformants. However, almost no transformants were found when the 1.6 μm gold microparticles were used. This effect is most likely the result of the larger 1.6 μm gold microparticles causing significant damage to the yeast cells (average diameter 6 μm) upon penetration. Because of the heterologous size distribution of the tungsten microparticles, their biological effect is due to a subset of small diameter microparticles.

The final parameter which should be verified in optimizing Biolistic transformation is the helium pressure. While the fungal and plant experiments reported here show that the range over which optimum transformation occurs is quite broad (there is little difference in transformation efficiency between 900 and 1,550 psi), this is not always the case. In other systems, such as the stable transformation of bacteria (Smith, *et al.*, 1992) or plants (Russell, *et al.*, 1992a), the optimum helium pressure range is narrower. Because microparticle bombardment will result in cell damage, the most gentle conditions which give a high transformation efficiency should be used.

This is particularly true when transient gene assays are performed as preliminary experiments for determining conditions to use in generating stable transformants (see below).

The experimental results obtained here indicate that two of the parameters which can be varied on the PDS-1000/He instrument, the gap distance and the macrocarrier travel distance, may have little effect on the transformation efficiency. Varying either of these parameters and subsequently assaying their effect on yeast transformation (Table 2) or transient expression in cauliflower (Table 4) failed to show a significant effect. Table 6 summarizes the effect of changing the particle accelerator parameters on microparticle velocity and transformation efficiency.

Biolistic transformation of yeast and cauliflower stem sections has not been reported previously using the PDS-1000/He instrument. However, transformation of yeast and other plant tissues has been reported using the gunpowder-driven PDS-1000 unit. Armaleo, *et al.* (1990) described optimized biological parameters for yeast, and recommended using 1.1 μm tungsten microparticles. Starting with the biological conditions reported by this group, we have optimized microparticle accelerator parameters for the helium-powered unit. In the case of transient expression in plants, earlier work with the gunpowder unit (Klein, *et al.*, 1988c) had shown that high levels of transient expression in maize could be achieved using 1.2 μm tungsten microparticles, a target distance of 6 cm, and a chamber vacuum of 28 inches Hg. These conditions formed the basis for the starting conditions used in these assays, and, in fact, are the optimal conditions which we found for transient expression in cauliflower stem sections. We recommend using a similar strategy of starting with previously reported conditions when optimizing parameters for other cell types of interest.

When extrapolating from transient to stable expression, it is important to remember that the optimum transformation conditions may be different in the two cases. For example, Biolistic transformation may damage cells such that they score positive in transient expression assays, but can not divide, and therefore would not produce a stable transformant. As a result, conditions which are found to be optimum for transient expression may be too harsh to produce the maximum number of stable transformants. Therefore, when optimal conditions for transient expression are known, it may be necessary to use more gentle conditions to achieve maximum stable expression. The transformation process may be made less harsh by reducing the velocity of the microcarriers. This may be achieved by reducing the helium pressure, the macrocarrier travel distance, and the size and number of microparticles, and/or by increasing the target distance and the gap distance (Table 6). In addition, using smaller microparticles and reducing the chamber vacuum may result in less tissue damage. Initial starting conditions which may be used for the PDS-1000/He with various types of biological systems are given in Table 7. These conditions, though probably not optimal, may be used in any initial experiments to assess optimal biological parameters (e.g., expression vector, cell type, etc.) prior to optimizing the conditions described here.

Table 6. Particle accelerator parameters which affect transformation with the PDS-1000/He

Parameter	Theoretical Effect on velocity	Observed Effect on transformation
Microparticle size	Inc vel w/ inc size	Major ^a
Target distance	Dec vel w/ inc dist	Major
Vacuum	Inc vel w/ inc vac	Major ^b
Helium pressure	Inc vel w/ inc press	Variable ^c
Gap distance	Dec vel w/ inc dist	Minor
Macro. flight distance	Inc vel w/ inc dist	Minor

a The effect on transformation is probably more dependent on the size of the target cells than on the velocity of the microparticle.

b The smaller the particle, the more pronounced the effect.

c See Discussion section.

Finally, the helium pressures reported here are all based on the rating of the rupture disk which was used in each bombardment. The actual pressures at which the rupture disks burst were monitored using the gauge on the PDS-1000/He in approximately half of the 500+ bombardments performed in the course of these experiments. In all cases, the disks burst within 100 psi of their rated pressure. In order to correctly monitor the pressure at which the rupture disks burst, it is important to set the helium pressure at the regulator valve 200 psi over the pressure rating of the rupture disk being used, and to adjust the helium metering valve so that the helium flow rate into the

gas acceleration tube occurs at a rate such that a 1,550 psi rupture disk will burst in 12 ± 1 seconds. Additionally, in all of the bombardments performed in this study, there was only one rupture disk failure. In order to obtain this low failure rate, it is very important to tighten the rupture disk retaining cap onto the gas acceleration tube as much as possible (the torque on the cap should be between 40 and 50 in-lb).

Conclusions

Stable expression in yeast and transient expression in cauliflower tissue sections have been demonstrated using the PDS-1000/He instrument. Transformation efficiencies can be maximized by optimizing the microparticle size, target distance, and helium pressure. In both systems studied here, the first two parameters are the most important. Little difference in results was found using helium pressures between 900 and 1,550 psi. This report also shows that these conditions may be optimized in one or two experiments; because of shot-to-shot variability, it is important to perform at least three to five replicates for each set of conditions. The optimum parameters found for the yeast and cauliflower systems assayed here are summarized in Table 6. When optimizing other systems, we suggest to begin by using conditions given in Table 7, then examine in order: target distance, microparticle size and type, and helium pressure.

Biolistic is a registered trademark of E. I. du Pont de Nemours & Co. The Biolistic technology is licensed to Bio-Rad Laboratories.

Table 7. Suggested starting conditions for optimizing several types of biological systems using the PDS-1000/He system^a

Biological system	Microcarrier ^b	Vacuum ^c	Helium pressure ^d	Target distance ^e	References
Bacteria	0.8 μ m tungsten	29	1,100	6 cm	Shark, <i>et al.</i> , 1991 Smith, <i>et al.</i> , 1992
Yeast	1.1 μ m tungsten	28	1,100	6 cm	Armaleo, <i>et al.</i> , 1990 This report
Algae	1.2 μ m tungsten	27	900	12 cm	K. Kindle, pers. comm.
Plant cells/tissues	1.2 μ m tungsten	28	1,100	9 cm	Klein, <i>et al.</i> , 1988c Russell, <i>et al.</i> , 1992a
Animal cell cultures	1.0 μ m gold	15	2,000	9 cm	S. McElligott, pers. comm.
Subcellular organelles ^f					
Macrocarrier	1.0 μ m tungsten	28	900	6 cm	Ye, <i>et al.</i> , 1990
Gas entrainment	1.0 μ m tungsten	28	1,500	8 cm	G.-N. Ye, pers. comm.

a In all cases, the rupture disk-macrocarrier gap distance was set at 1/4 inch and the macrocarrier travel distance at 8 mm (one spacer ring above and one below the stopping screen support). To optimize Biolistic transformation, begin with the parameters given in Table 7 and test conditions both above and below those listed in Table 7 and described in the Discussion section. In all cases, the most important parameters to examine are the target distance, the microparticle size, and the helium pressure.

b Mean particle size of the tungsten and gold microcarriers (there is lot-to-lot variation in the size of microcarriers, particularly with tungsten). The M10 and M17 tungsten particles used in this study have a median size of 1.1 and 1.7 μ m, respectively.

c Chamber vacuum in inches Hg. Some cell types are more sensitive to reduced atmospheric pressure. If reduced cell viability from excessive vacuum is suspected, test this in a separate experiment.

d Burst pressure of rupture disk in psi.

e Approximate distance from the stopping screen to the biological sample; the four levels for the sample holder in the PDS-1000/He instrument correspond to distances of approximately 3, 6, 9, and 12 cm.

f Transformation of organelles may be accomplished by launching microparticles from a macrocarrier as described in the PDS-1000/He instrument manual. Ye, *et al.* (1990) have also reported efficient results using gas entrainment.

Appendices

The procedures described in Appendices 1 and 2 were developed by Sanford, *et al.* (1992).

Appendix 1. Microcarrier preparation

For 120 bombardments using 500 μg per bombardment

1. In a 1.5 ml microfuge tube, weigh out 60 mg of microparticles.
2. Add 1 ml of 70% ethanol, freshly prepared.
3. Vortex on a platform vortexer for 3-5 minutes.
4. Incubate for 15 minutes.
5. Pellet the microparticles by spinning for 5 seconds in a microfuge.
6. Remove the liquid and discard.
7. Repeat the following steps three times:
 - a. Add 1 ml of sterile water.
 - b. Vortex for 1 minute.
 - c. Allow the particles to settle for 1 minute.
 - d. Pellet the microparticles by spinning for 2 seconds in a microfuge.
 - e. Remove the liquid and discard.
8. Add sterile 50% glycerol to bring the microparticle concentration to 60 mg/ml (assume no loss during preparation).
9. Store the microparticles at room temperature for up to 2 weeks.
9. Remove the liquid and discard.
10. Add 140 μl of 100% ethanol without disturbing the pellet.
11. Remove the liquid and discard.
12. Add 48 μl of 100% ethanol.
13. Gently resuspend the pellet by tapping the side of the tube several times, and then by vortexing at low speed for 2-3 seconds.
14. Remove six 6 μl aliquots of microcarriers and transfer them to the center of a macrocarrier. An effort is made to remove equal amounts (500 μg) of microcarriers each time and to spread them evenly over the central 1 cm of the macrocarrier using the pipette tip. Desiccate immediately.

Appendix 2. Coating DNA onto microcarriers

The following procedure is sufficient for six bombardments; if fewer bombardments are needed, prepare enough microcarriers for three bombardments by reducing all volumes by one-half. **When removing aliquots of microcarriers, it is important to vortex the tube containing the microcarriers continuously in order to maximize uniform sampling.**

1. Vortex the microcarriers prepared in 50% glycerol (60 mg/ml) for 5 minutes on a platform vortexer to resuspend and disrupt agglomerated particles.
2. Remove 50 μl (3 mg) of microcarriers to a 1.5 ml microfuge tube.
3. While vortexing vigorously, add in order:
 - 5 μl DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
 - 50 μl CaCl_2 (2.5 M)
 - 20 μl spermidine (0.1 M)
4. Continue vortexing for 2-3 minutes.
5. Allow the microcarriers to settle for 1 minute.
6. Pellet the microcarriers by spinning for 2 seconds in a microfuge.
7. Remove the liquid and discard.
8. Add 140 μl of 70% ethanol without disturbing the pellet.

References

- Armaleo, D., Ye, G.-N., Klein, T. M., Shark, K. B., Sanford, J. C. and Johnston, S. A., Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi, *Curr. Genet.*, **17**, 97-103 (1990).
- Daniell, H., Krishnan, M. and McFadden, B. F., Transient expression of β -glucuronidase in different cellular compartments following Biolistic delivery of foreign DNA into wheat leaves and calli, *Plant Cell Rep.*, **9**, 615-619 (1991).
- Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J., and Tzagoloff, A., Yeast/ *E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites, *Yeast*, **2**, 163-167 (1986).
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W., GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *EMBO J.*, **6**, 3901-3907 (1987).
- Johnston, S. A., Anziano, P. Q., Shark, K., Sanford, J. C. and Butow, R. A., Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles, *Science*, **240**, 1538-1541 (1988).
- Kemphorne, O., The Design and Analysis of Experiments, R. E. Krieger Publishing Co., Malabar, Florida (1983).
- Klein, T. M., Fromm, M., Weissinger, A., Tomes, D., Schaaf, S., Sletten, M. and Sanford, J. C., Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4305-4309 (1988a).
- Klein, T. M., Harper, E. C., Svab, Z., Sanford, J. C., Fromm, M. E. and Maliga, P., Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8502-8506 (1988b).
- Klein, T. M., Gradziel, T., Fromm, M. E. and Sanford, J. C., Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles, *Bio/Technol.*, **6**, 559-563 (1988c).
- Klein, T. M., Knowlton, S. and Arentzen, R., *Gene transfer by particle bombardment*, Plant Tissue Culture Manual, pp D1: 1-12 (Lindsey, K., ed.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands (1991).
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982).
- Russell, J. A., Roy, M. K. and Sanford, J. C., Major improvements in Biolistic transformation of suspension cultured tobacco cells, *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, **28P**, 97-105 (1992a).
- Russell, J. A., Roy, M. K. and Sanford, J. C., Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation, *Plant Physiol.*, **98**, 1050-1056 (1992b).
- Sanford, J. C., Klein, T. M., Wolf, E. D. and Allen, N., Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process, *Part. Sci. Technol.*, **5**, 27-37 (1987).
- Sanford, J. C., DeVit, M. J., Russell, J. A., Smith, F. D., Harpending, P. R., Roy, M. K. and Johnston, S. A., An improved, helium-driven Biolistic device, *Technique*, **3**, 3-16 (1991).
- Sanford, J. C., Smith, F. D. and Russell, J. A., Optimizing the Biolistic process for different biological applications, *Meth. Enzymol.*, (in press, 1992).
- Shark, K. B., Smith, F. D., Harpending, P. R., Rasmussen, J. L. and Sanford, J. C., Biolistic transformation of a prokaryote, *Bacillus megaterium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 480-485 (1991).
- Smith, F. D., Harpending, P. R. and Sanford, J. C., Biolistic transformation of prokaryotes: factors that affect biolistic transformation of very small cells, *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 239-248 (1992).
- Williams, R. S., Johnston, S. A., Riedy, M., DeVit, M. J., McElligott, S. G. and Sanford, J. C., Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2726-2730 (1991).
- Ye, G.-N., Daniell, H. and Sanford, J. C., Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts, *Plant Molec. Biol.*, **15**, 809-819 (1990).

BIO-RAD

Life Science Group

2000 Alfred Nobel Drive
Hercules, California 94547
Telephone (510) 741-1000
Fax: (510) 741-1060

Eastern Regional Office, P.O. Box 1229, 85A Marcus Dr., Melville, New York 11747 • Phone (516) 756-2575 • Fax (516) 756-2594
European Headquarters, Bio-Rad Laboratories, Dreve du Senechal, 19, B-1180 Brussels • Phone 02 375 59 70 • Fax 02 374 61 62
Australia, Bio-Rad Laboratories Pty Limited, Unit 11, 112-118 Talavera Rd P.O. Box 371, North Ryde, N.S.W. 2113 • Phone 02-805-5000 • Fax 02-805-1920
Austria, Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H., Auhofstrasse 78D, A-1130 Wien • Phone 0222-87 78 901 • Fax 0222-87 65 629
Belgium, Bio-Rad Laboratories S.A./N.V., Begoniastraat 5, B-9810 Nazareth Eke • Phone 091-85 55 11 • Fax 091-85 65 54
Canada, Bio-Rad Laboratories (Canada) Ltd., 5145 Braddock Boulevard, Mississauga, Ontario L4W 2A6 • Phone (416) 624-0713 • Fax (416) 624-3019
China, Bio-Rad Laboratories, Yanshan Hotel Office Tower, #1317, A138 Haidian Road, Beijing • Phone 2564308 • Fax 2568640
France, Bio-Rad S.A., 94-96 rue Victor Hugo, B.P. 220, 94203 Ivry Sur Seine Cedex • Phone 01-49 60 683 4 • Fax 01-46 71 24 67
Germany, Bio-Rad Laboratories GmbH, Heidemannstraße 164, Postfach 45 01 33, D-8000 München 45 • Phone 089-318 84-0 • Fax 089-318 84 100
Italy, Bio-Rad Laboratories S.r.l., Via Cellini, 18A, I-20090 Segrate Milano • Phone 02-21609 1 • Fax 02-21609-399
Japan, Nippon Bio-Rad Laboratories, K. K., Sumitomo Seimei Kachidoki Bldg 5-3-6 Kachidoki, Chuo-Ku, Tokyo 104 • Phone 03-3534-7515 • Fax 03-3534-8027
The Netherlands, Bio-Rad Laboratories B. V., Fokkerstraat 10, 3505 KV Veenendaal • Phone 08385-40666 • Fax 08385-42216
New Zealand, Bio-Rad Laboratories, Pty Ltd, P.O. Box 100-051, North Shore Mail Centre, Auckland 10 • Phone 09-443 3099 • Fax 09-443 3097
Pacific, Bio-Rad Laboratories, Unit 1111, 11/F., New Kowloon Plaza, 38, Tai Kok Tsui Road, Tai Kok Tsui, Kowloon, Hong Kong • Phone 7893300 • Fax 7891257
Scandinavia, Bio-Rad Laboratories, Kanalvagen 10C, 19461 Upplands Vasby, Sweden • Phone 46 (0) 760-73489 • Fax 46 (0) 760-71781
Spain, Bio-Rad Laboratories, S. A. Avda Valdelaparra 3, Pol. Ind. Alcobendas, E-28100 Alcobendas, Madrid • Phone (91) 661 70 85 • Fax (91) 661 96 98
Switzerland, Bio-Rad Laboratories AG, Kanalstrasse, 17, CH-8152 Glattbrugg • Phone 01-810 16 77 • Fax 01-810 19 33
United Kingdom, Bio-Rad Laboratories Ltd., Bio-Rad House, Maylands Avenue, Hemel Hempstead, Herts HP2 7TD • Phone 0800 181134 • Fax 0442 259118

contra IgG de ratón o conejo (según estuviesen dirigidos frente al anticuerpo anti-DXS1 o anti-DXR respectivamente) acoplados en ambos casos a partículas de oro de 15 nm (*British Biocell*) en dilución 1/2'

5.-Lavados:

-3x5 min con tampón TBS.

-4x5 min con H₂O.

-Finalmente lavar abundantemente con H₂O.

6.-Colocar la rejilla en una placa de Petri con papel secante. Es importante prestar atención a la orientación, procurando que la muestra quede siempre hacia arriba.

SOLUCIÓN de BLOQUEO:

Se prepara resuspendiendo Albúmina de Suero Bovina (BSA) al 1 % en TBS. No autoclavar.

TAMPÓN TBS:

Tris-HCl.....10 mM

NaCl.....150 mM

Ajustar a pH=7,4 con NaOH.

V.4.5.4. Observación de las muestras al microscopio:

Se utilizaron las instalaciones de *Unitat de Tècniques de M.E.T.* de los *Serveis Científico-Tècnics* de la *Universitat de Barcelona*. En cualquier caso, las observaciones se efectuaron en un microscopio electrónico de transmisión *Hitachi* modelo H 800 MT. Las imágenes obtenidas fueron captadas a través de una cámara digital acoplada al microscopio, utilizando la aplicación informática de adquisición de imágenes *Digital Micrograph* versión 3.3. (Gatan Ltd.).

V.4.6. Biolística sobre tejidos de *Arabidopsis thaliana*.

Con el propósito de estudiar la localización subcelular de las proteínas se ha combinado la capacidad de los sistemas de microbombardeo para transformar células vegetales con ADN con las propiedades de la proteína verde fluorescente (GFP) como delator en tejidos vegetales [271]. La visualización al microscopio confocal de la fluorescencia emitida por la GFP refleja la localización de la misma.

Como tejido vegetal se han utilizado hojas de roseta de plantas de *A. thaliana* de 2 a 3 semanas. El protocolo seguido ha sido básicamente el descrito por el proveedor del sistema de biolística, con adaptaciones específicas destinadas al bombardeo de tejidos vegetales.

V.4.6.1. Descripción de las construcciones utilizadas para los experimentos de microbombardeo.

Las construcciones utilizadas para los experimentos de biolística fueron generadas a partir del vector pGFP-MRC [240]. Este vector incorpora una región de policlonaje que permite fusionar traduccionalmente un ADNc concreto a una variante de la GFP (sGFP:S65T) mejorada para multiplicar la señal fluorescente en células vegetales [59]. Las construcciones resultantes codifican para las distintas proteínas quiméricas bajo el

control del promotor 35S-CaMV. Para este trabajo, se diseñaron construcciones en las que la secuencia codificante completa de los genes *DXS1* y *DXR* se fusionaron traduccionalmente con el extremo N-terminal de la proteína verde fluorescente GFP. En el caso de *DXS2*, la construcción era la resultante de la fusión traduccional del dominio correspondiente al hipotético péptido de tránsito del extremo N-terminal, concretamente hasta su posición 45, con la GFP. En todos los casos el clonaje se efectuó mediante reacciones de *PCR* (ver apdo. V.5.4) que amplificaron los fragmentos deseados y en los que los oligonucleótidos utilizados introducían los sitios de restricción necesarios para su integración en el vector de destino pGFP-MRC [240]. La Tabla V.2 muestra los juegos de oligonucleótidos utilizados en cada caso, así como los sitios de restricción empleados en el clonaje. La Figura II.10 incluye una representación esquemática de las construcciones empleadas en los experimentos de microbombardeo.

CONSTRUCCIÓN	OLIGONUCLEÓTIDO		SITIOS DE RESTRICCIÓN	
	5'	3'	5'	3'
DXS1:GFP	DXS.SallA	T7-21	Sall	Sall
DXS2.PT:GFP	DXS2.NcoIGFP	DXS2.Sall3GFP-TP	NcoI	Sall
DXR:GFP	DXR.SallA	T7-21	Sall	Sall

Tabla V.2: Pares de oligonucleótidos empleados en la generación de las construcciones de microbombardeo.

V.4.6.2. Protocolo de microbombardeo:

Material:

- Sistema Biorad PDS100/He-Particle Delivery System.
- Cabina de flujo laminar.
- Vórtex.
- Micropartículas de tungsteno M17, Ø medio=1,1 µm.
- Membranas de ruptura, membranas portadoras y rejillas de parada.
- Etanol absoluto y al 70 %.
- Glicerol 50 %.
- ADN purificado.
- Espermidina 0,1 M.
- CaCl₂ 2,5 M.

Preparación de microproyectiles:

- 1.-Pesar 30 mg de micropartículas de tungsteno en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
- 2.-Añadir 1 ml de etanol al 70 %. Agitar vigorosamente al vórtex durante unos 3-5 minutos.

3.-Incubación 15 min a temperatura ambiente.

4.-Precipitar las micropartículas mediante un pulso de unos 5 seg en la microcentrífuga. Eliminar el sobrenadante con la pipeta.

5.-Adicionar 1 ml de H₂O estéril y agitar con el vórtex 1 min. Dejar incubando las micropartículas 1 min hasta que sedimenten. Finalmente repetir el pulso en la centrífuga y eliminar el sobrenadante con la ayuda de la micropipeta.

6.-Repetir el paso anterior 2 veces más.

7.-Agregar 0,5 ml de glicerol 50 % estéril (concentración final=60 mg/ml). Conservar a -20 °C para prevenir la oxidación.

Precipitación del ADN sobre los microproyectiles:

1.-Mantener las micropartículas preparadas según el paso anterior en una plataforma vórtex. Es conveniente dejarlas el tiempo suficiente (mínimo 5 min) para poder resuspender y romper los aglomerados de micropartículas.

2.-Pasar 10 µl de micropartículas (600 µg) a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.

3.- Manteniendo en agitación el tubo anterior se añaden:

-1-2 µg de ADN plasmídico.

-14 µl de solución de precipitación (10 µl de CaCl₂ 2,5 M: 4 µl espermidina 0,1 M).

4.-Mantener agitando en el vórtex durante unos 5 min más.

5.-Dejar 1 min sedimentando las micropartículas.

6.-Aplicar un pulso de centrífuga de 5 seg y eliminar el sobrenadante cuidadosamente con la ayuda de la micropipeta.

7.-Lavar el precipitado sin levantarlo con etanol 70 %. Rájar el sobrenadante.

8.-Lavar el precipitado sin levantarlo con etanol 100 %. Desechar el sobrenadante.

9.-Resuspender en 8 µl de etanol absoluto valiéndose de la micropipeta.

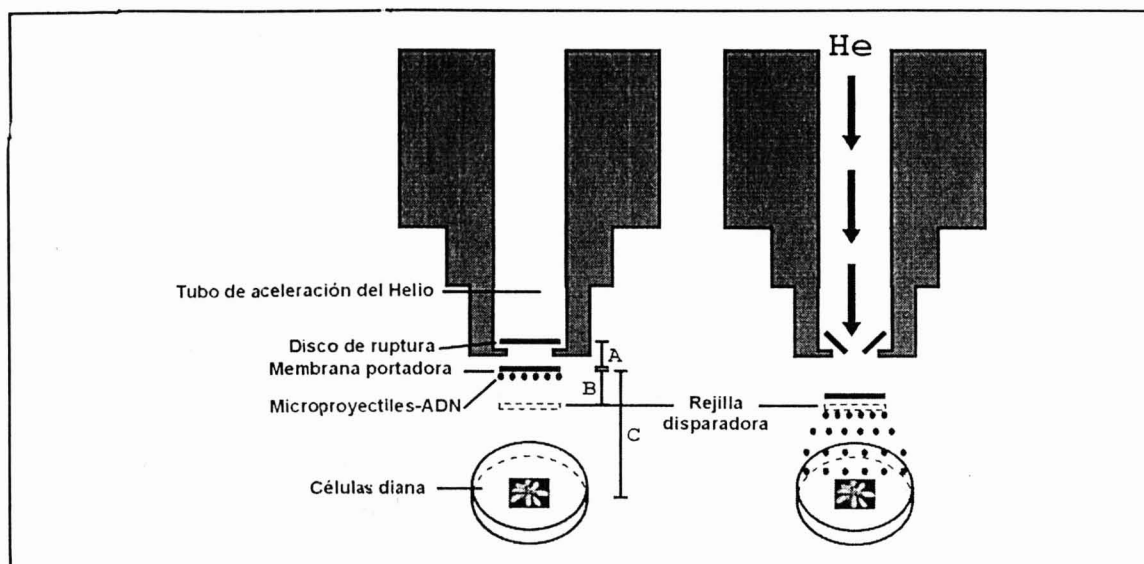
Microbombardeo:

El sistema de bombardeo utiliza la presión del helio suministrado por una bombona (dotada de un manómetro) para acelerar las micropartículas recubiertas de ADN e introducirlas directamente sobre las hojas de Arabidopsis, transformándolas.

Los parámetros del procedimiento de transfección fueron optimizados, y del modo en que se ilustra en la Figura V.2, se refieren a:

- Disco de ruptura (presión de helio a soportar, expresada en psi).
- Distancia disco de ruptura-membrana portadora (A)=4,5 cm.
- Distancia membrana portadora-rejilla de parada (B)=6 mm
- Distancia membrana portadora-muestra a bombardear (C)=12 cm.
- Presión de helio en la bombona de suministro.

Figura V.2: Representación esquemática del sistema de biolística, antes y después de aplicar la presión de



helio.

Asimismo, hay que considerar los parámetros biológicos relacionados con la muestra que se desea bombardear, elección de células diana, etcétera.

Para evitar contaminaciones con las construcciones entre un episodio y otro de bombardeo, conviene esterilizar la zona de trabajo (cabina y cámara de bombardeo) con etanol y lavar con agua. Lo mismo se hizo con el material fungible utilizado en cada bombardeo, manteniendo las membranas de ruptura, membranas portadoras y rejillas de parada en etanol absoluto, y manejándolos siempre con pinzas. También se esterilizaron y lavaron cuidadosamente las piezas metálicas y de plástico que sirven de soporte a aquellos elementos. Una vez secado este material sobre papel de filtro, se procede como sigue:

- 1.-Depositar los 8 μ l de microartículas recubiertas de la muestra de ADN con la que se quiere transformar sobre una membrana portadora ya seca.
- 2.-Mientras se espera a que el etanol se evapore, ajustar el regulador de la bombona de helio a una presión de 1300 psi, unas 200 psi por encima de la soportada por el disco de ruptura.
- 3.-Ajustar la membrana portadora correctamente orientada sobre el soporte metálico con la ayuda de la pieza roja diseñada al efecto.

4.-Colocar una rejilla de parada en la plataforma. A continuación, el soporte metálico con la membrana portadora de modo que las micropartículas estén orientadas hacia la rejilla.

5.-Cerrar firmemente el montaje enroscando el cierre del soporte metálico.

6.-En este momento se esteriliza un disco de ruptura sumergiéndolo brevemente en etanol absoluto. Se dispone rápidamente sobre el soporte correspondiente y se enrosca en el tubo de aceleración del gas en el extremo superior de la cámara de bombardeo.

7.-Acto seguido colocar la plataforma con la membrana en el nivel 5. La cámara posee 6 niveles, lo cual permite adecuar la distancia entre los distintos elementos según conveniencia.

8.-Finalmente, disponer la plataforma con la muestra vegetal depositada en una placa de agar 0,8 % en el nivel 2. Este soporte absorberá el impacto resultante del bombardeo y mantendrá condiciones de humedad para el tejido durante la incubación posterior.

9.-En este momento cerrar la cámara de bombardeo y encender la bomba de vacío.

10.-Conectar la cámara de bombardeo y accionar el interruptor en la posición de vacío (posición superior).

11.-La presión de vacío irá subiendo. En el momento en que llegue a 27-29 mm (0,06 atm) de Hg, pasar el interruptor a la posición inferior, en la que se mantendrá la presión de vacío.

12.-Pulsar rápidamente el interruptor de disparo. La presión de Helio indicada en el manómetro del sistema se irá acumulando sobre el disco de ruptura hasta alcanzar el máximo soportado, momento en que estallará, despidiendo un ruido sordo y bajando bruscamente la presión de Helio desde el máximo alcanzado de 1100 psi hasta 0.

13.-Poner inmediatamente el interruptor en la posición intermedia para permitir la liberación del vacío. Es conveniente realizar los pasos 11 a 13 lo más velozmente posible a fin de reducir los daños que el vacío pueda causar en el tejido vegetal.

14.-Finalmente, recuperar la muestra bombardeada, que debe mostrar unas manchas negras debidas al tungsteno impactado. Se deja incubar 24 horas bajo luz continua a una temperatura de 22-24 °C para que tenga lugar la expresión de la construcción bombardeada.

15.-Descartar el disco de ruptura, que debe estar destrozado, la membrana portadora y la rejilla.

16.-Antes de proceder a un nuevo bombardeo, esterilizar y limpiar de nuevo la zona.

17.-Es conveniente, una vez terminado el experimento:

-Cerrar la manecilla del helio.

-Aplicar el vacío el tiempo suficiente para permitir que se encienda el botón disparador, y disparar cuantas veces sea necesario para liberar el gas retenido en el sistema. Confirmar que, efectivamente,

la manecilla del manómetro cae a 0.

-Liberar finalmente el vacío.

V.4.6.3. Observación de las muestras microbombardeadas.

Las muestras obtenidas tras el proceso de transformación transitoria mediante el sistema de biolística fueron examinadas en el *Servei de Microscopia Confocal* de los *Serveis Científico-Tècnics* de la *Universitat de Barcelona*. Las observaciones se realizaron directamente utilizando un microscopio láser de escáner confocal modelo *Leica TCS 4D*, o bien *Olympus IX70*. La fluorescencia verde correspondiente a las proteínas de fusión con la GFP fue detectada a través de un filtro BP515-525 tras excitación con luz azul a 488 nm de longitud de onda, mientras que la autofluorescencia roja correspondiente a la clorofila se detectó usando un filtro LP590, tras excitar mediante la emisión con luz verde a 568 nm. Ocasionalmente, se efectuó una observación preliminar con la ayuda de la lupa binocular de fluorescencia *Leica DC250*, con el objeto de detectar en la muestra regiones que estuviesen expresando la GFP.

El análisis de la superposición de los dos tipos de imágenes obtenidas, así como el tratamiento de las mismas, fue efectuado mediante la aplicación *Corel Photo-Paint*, integrada en el paquete informático *Corel-Draw 9*.

V.4.7. Detección de la actividad GUS.

V.4.7.1. Análisis histoquímico de la actividad GUS.

Las plantas transgénicas portadoras de construcciones resultantes de la fusión de la región 5' flanqueante del gen a estudio con el gen *uidA* (*GUS*) de *E. coli* permiten estudiar su patrón de expresión a lo largo de los distintos estadios de desarrollo, tejidos y condiciones de crecimiento analizados gracias a la actividad β -glucuronidasa (*GUS*) codificada por dicho gen (apdo. V.4.1.1.). Para ello, se incubaba la muestra problema en presencia del sustrato 5-bromo-4-cloro-indolilglucurónido (X-Gluc). La actividad *GUS* hidroliza este sustrato liberando una aglicona que al dimerizar adquiere una coloración azul fácilmente visualizable. La dimerización a su vez vendrá estimulada por el oxígeno atmosférico y puede incrementarse mediante agentes catalizadores [141].

Los análisis se llevaron a cabo con al menos 6 líneas de plantas transgénicas transformadas con cada una de las construcciones a analizar en la generación T₂. Se confirmó que las diferencias entre las distintas líneas pertenecientes a una misma construcción eran únicamente de naturaleza cuantitativa, esto es ligeras variaciones en la intensidad de tinción, y que cualitativamente el patrón de expresión espacio-temporal no variaba de unas a otras. De este modo, se seleccionó una de las líneas para cada construcción como representativa. Sobre estos individuos se llevaron a cabo los experimentos definitivos, siguiendo la metodología que se detalla a continuación:

Materiales: