

## LA EXPRESIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *ahybadh4* EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Arabidopsis thaliana* ES ESPECÍFICA EN LA RAÍZ

### ROOT SPECIFIC EXPRESSION OF *ahybadh4* GENE PROMOTER IN TRANSGENIC *Arabidopsis thaliana* PLANTS

Janette Onofre<sup>1</sup>, Juan Legaria Solano<sup>2</sup>, Nelson Avonce<sup>3</sup> y Gabriel Iturriaga<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa. C.P. 62210 Cuernavaca, Mor. México. Fax: 01 (777) 313-9988. <sup>2</sup> Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carr. México-Texcoco. C.P. 56230 Chapingo, Edo. de México. Fax: 01(595) 952-1642. <sup>3</sup> Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Universidad 1001, Col. Chamilpa. C.P. 62210 Cuernavaca, Mor. Tel: 01 (777) 329-7057. Fax: 01 (777) 329-7030. Correo electrónico: iturri@cib.uaem.mx

\* Autor responsable

#### RESUMEN

La glicina betaína es uno de los solutos compatibles con el metabolismo más eficiente. En las plantas, la biosíntesis de la glicina betaína se lleva a cabo en dos pasos enzimáticos. Primero se oxida el sustrato colina a betaína aldehído por medio de la colina monooxigenasa (CMO); el segundo paso es catalizado por una betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) que convierte la betaína aldehído a glicina betaína. Estudios previos mostraron que la transcripción del gen *ahybadh17*, que codifica para la BADH de *Amaranthus hypochondriacus*, es inducida por estrés hídrico y salinidad, en paralelo a un incremento en los niveles de glicina betaína. En el presente trabajo se analizó la expresión del promotor del gen *ahybadh4* de *A. hypochondriacus* en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Para este propósito se construyó un gen quimérico con una secuencia de 1.5 kb correspondiente a la posible región promotora del gen *ahybadh4* fusionada con el gen reportero *uid A* de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS). Las semillas de las plantas transgénicas (T<sub>3</sub>) obtenidas, fueron crecidas durante 7, 14 y 21 días después de la germinación y fueron sometidas a tratamientos de estrés osmótico y ácido abscísico (ABA) por un periodo de 16 horas. Los análisis histoquímico y fluorimétrico de GUS mostraron una expresión constitutiva y específica en la raíz. Estos resultados permiten concluir que la secuencia 5' de 1.5 kb del gen *ahybadh4* no se regula por estrés ósmótico o ABA en *A. thaliana*.

**Palabras clave:** *Amaranthus hypochondriacus*, betaína aldehído deshidrogenasa (BADH), *Arabidopsis thaliana*, planta transgénica, GUS.

#### SUMMARY

Glycine betaine is one of the most efficient solutes compatible with metabolism. In plants glycine betaine is synthesized in two enzymatic steps. First, choline is oxidized to betaine aldehyde by a choline monooxygenase (CMO); the second step is catalyzed by a betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) that converts betaine aldehyde to glycine betaine. Previous studies had shown that the *ahybadh17* gene transcription is induced by water stress and salinity, in parallel to an increase of glycine betaine levels. In the present study the expression of the *ahybadh4* gene from *Amaranthus hypochondriacus* in *Arabidop-*

*sis thaliana* transgenic plants was analysed. For this purpose a chimeric gene was constructed with a 1.5 kb sequence corresponding to the putative promoter of the *ahybadh4* gene fused to the GUS reporter gene (*uid A*). Seeds obtained from these transgenic plants (T<sub>3</sub>) were grown during 7, 14 and 21 days after germination and subjected to osmotic stress and abscisic acid (ABA) treatments for a period of 16 hours. The histochemical and fluorimetric analyses of GUS showed a constitutive and root-specific expression. These results allowed to conclude that the 1.5 kb 5'-sequence of the *ahybadh4* gene is not regulated by osmotic stress or ABA in *A. thaliana*.

**Index words:** *Amaranthus hypochondriacus*, betaine aldehyde dehydrogenase (BADH), *Arabidopsis thaliana*, transgenic plant, GUS.

#### INTRODUCCIÓN

La mayor parte de las plantas están expuestas, al menos temporalmente, a condiciones de déficit hídrico durante su ciclo de vida (Grillo y Leone, 1996). La tercera parte de la superficie terrestre se considera árida o semiárida y del resto, una importante proporción está sujeta a periodos estacionales de sequía. La irrigación es un recurso cada vez más limitado y está contribuyendo progresivamente a la salinización de los suelos. Por ello, el estudio de los efectos del déficit hídrico en las plantas, la caracterización de los mecanismos de aclimatación y el mejoramiento para el incremento de la tolerancia al estrés hídrico y su abordaje biotecnológico, son de fundamental interés en áreas afectadas por dichos tipos de estrés.

La glicina betaína es un compuesto cuaternario de amonio que se encuentra presente en bacterias, cianobacterias, algas, animales y varias familias de plantas, pero presente en muchos cultivos de interés agrícola (McCue y Hanson, 1990; Rhodes y Hanson, 1993). Estudios

genéticos en plantas y en bacterias han mostrado que la presencia de la glicina betaína está correlacionada con la tolerancia al estrés osmótico. La glicina betaína se acumula principalmente en hojas de plantas sometidas a déficit hídrico (Rhodes y Hanson, 1993); además, el tratamiento de plantas de cebada y remolacha con NaCl, induce la acumulación de glicina betaína en las hojas y las raíces (McCue y Hanson 1992; Arakawa *et al.*, 1990).

La síntesis de la glicina betaína en plantas lleva a cabo en dos pasos enzimáticos. El primero es catalizado por la enzima colina monooxigenasa (CMO, EC 1.14.15.7) que convierte a la colina en betaína aldehído; el segundo es catalizado por la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH, EC 1.2.1.8) que utiliza como cofactor NAD<sup>+</sup> y convierte a la betaína-aldehído en glicina betaína (Rhodes y Hanson, 1993). La BADH vegetal es una proteína dimérica con monómeros de 60 kDa (Weigel *et al.*, 1986; Arakawa *et al.*, 1987; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994). A la fecha se han aislado genes *badh* de *Escherichia coli* (Boyd *et al.*, 1991), espinaca (*Spinacea oleracea*) (Weretilnyl y Hanson, 1990), remolacha (*Beta vulgaris*) (McCue y Hanson, 1992), cebada (*Hordeum vulgare*) (Ishitani *et al.*, 1995), sorgo (*Sorghum bicolor*) (Wood *et al.*, 1996) y arroz (*Oriza sativa*) (Nakamura *et al.*, 1997). En estas especies la síntesis y de ARNm y de la proteína BADH son inducidas por sequía, salinidad y frío en forma paralela al incremento en los niveles de glicina betaína.

Estudios anteriores mostraron que *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto) es capaz de acumular glicina betaína en sus hojas bajo condiciones de estrés hídrico (Gamboa *et al.*, 1991), y aumentar Además, la actividad de BADH (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994). Legaria *et al.* (1998) aislaron un gen completo denominado *ahybadh4* y un ADN complementario, *ahybadh17*, que codifican para la BADH de *A. hypochondriacus*. El análisis de la expresión del gen *ahybadh17* mostró que los niveles de ARNm y el nivel de proteína de la BADH están presentes en hojas de plantas bajo condiciones normales y que aumenta de manera rápida por exposición a tratamientos de estrés osmótico (PEG 17 %, p/v, NaCl 0.5 M) y ácido abscísico (ABA 100 µM).

Los promotores de muchos genes contienen elementos regulatorios responsables del control de la expresión espacial y temporal. Caracterizar la correcta regulación de los promotores garantiza poder manipular la especificidad de la expresión de genes de interés en plantas transgénicas. En la región del promotor del gen *ahybadh4* se encontraron las secuencias consenso MybRE, CE1 y ABRE, que pueden ser reconocidas por activadores de la transcripción,

que posiblemente estén involucradas en la regulación del gen por ABA y estrés osmótico (Legaria *et al.*, 1998).

En este trabajo se analiza la función de la región promotora del gen *ahybadh4* en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, con el propósito de avanzar en el conocimiento del mecanismo de regulación de los genes involucrados en la síntesis de osmolitos en plantas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia cultivadas en una mezcla de vermiculita-perlita (1:1) e irrigadas con solución MS (Murashige y Skoog, 1962), en condiciones controladas (24 °C, 16 horas luz y 50 % de humedad relativa).

### Reacciones de PCR

Para la amplificación del promotor *ahybadh4* se utilizaron los oligonucleótidos M13 reverso (5'-AACAGCTATGACCATG-3') para flanquear al extremo 5' de la clona y al oligonucleótido específico del promotor del gen *ahybadh4* (5'-CGGATCCGAAGTTGGAAGTATAAGAAAG-3') que termina en el 5' del codón de inicio de la traducción, bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94 °C por 3 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min y 72 °C por 1.5 min. Para los ensayos de amplificación del ADN genómico de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* se utilizaron las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94 °C por 3 min, 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min y 72 °C por 3 min. Para amplificar el promotor 35S del testigo (plantas transformadas con pBI121) se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: 35S (5'-TATCCTTCGCAAGACCC-3') para flanquear al extremo 5' y al oligonucleótido M13 universal (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'). En todas las reacciones se utilizaron las siguientes concentraciones finales: 100 ng de ADN, 5 unidades de la *Taq* polimerasa "Expand" (Roche), 100 nM de oligonucleótidos, y 100 µM de nucleótidos, en un volumen final de 100 µL.

### Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Los genes quiméricos pBADH4-GUS-NOS y pBI121 (Jefferson *et al.*, 1987) fueron transferidos a plantas adultas de *A. thaliana* por el método de infiltración por vacío descrito por Clough y Bent (1998). Este método consiste en incubar durante un minuto en una cámara con vacío, a plantas de *A. thaliana* que contengan botones florales con

un cultivo líquido de *Agrobacterium tumefaciens* (D.O.<sub>600</sub> de 0.8) que porta la construcción deseada; en este trabajo se utilizaron pBADH4-GUS-NOS y pBI121. Las plantas así tratadas se cultivaron hasta que formaron frutos maduros. Posteriormente, se cosecharon las semillas y se pusieron a germinar en cajas Petri (alrededor de 3000 por caja) en medio con sales MS (Sigma), 50 µg mL<sup>-1</sup> de kanamicina y 0.7 % de fitoagar (Gibco BRL). Las plantas transgénicas fueron identificadas por su crecimiento en el medio de cultivo porque tenían raíces bien establecidas y hojas verdes, mientras que las plantas no transformadas no germinaron o se tornaron albinas y fueron de un tamaño muy inferior. Las líneas transgénicas se crecieron en macetas, tal como se describió anteriormente y sus semillas (generación T<sub>2</sub>) se germinaron en cajas Petri en presencia de kanamicina. El criterio para seleccionar líneas homocigotas dominantes fue de acuerdo con el porcentaje de resistencia a kanamicina en la generación T<sub>3</sub> (plantas verdes vs plantas albinas), que en este caso produjo 100 % de plántulas verdes en cada línea homocigótica. Las líneas transgénicas obtenidas fueron analizadas por PCR para corroborar la presencia del transgen. Para determinar el número de copias del transgen, se realizó un análisis del patrón de segregación de resistencia a kanamicina de cada línea transgénica.

#### Análisis de la actividad de β-glucuronidasa

La expresión del gen reportero *uid A* (GUS) fue analizada mediante dos tipos de ensayos. El ensayo histoquímico (Jefferson *et al.*, 1987) se utilizó para determinar la localización espacial del gen reportero; y los ensayos fluorimétricos (Jefferson, 1987) para cuantificar la actividad de la β-glucuronidasa en las diferentes líneas transgénicas. En ambos ensayos, las plantas transgénicas homocigotas portadoras de la construcción pBADH4-GUS-NOS y pBI121 (testigo positivo) fueron sometidas a tratamientos de NaCl 0.5 M, PEG(17 %), ABA 100 µM y medio MS líquido (como testigo negativo), por un periodo de 16 horas, a los 7, 14 y 21 días después de la germinación.

Para la detección histoquímica de la actividad de la β-glucuronidasa las plántulas se colocaron en una solución amortiguadora de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M, pH 7.0; Na<sub>2</sub>EDTA 10 mM; K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 0.5 mM; K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 0.5 mM; X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D glucuronido, Sigma) 0.5 mg mL<sup>-1</sup>, previamente disuelto en DMSO. Estas reacciones se incubaron a 37 °C durante 16-24 h en la oscuridad. Posteriormente, los tejidos se sometieron a lavados con metanol:acetona (3:1) para eliminar la clorofila y evitar que interfiriera con la tinción; después se conservaron en una solución con glicerol-agua (1: 1) a 4 °C.

La cuantificación de la actividad de β-glucuronidasa se realizó en tejido de plántulas completas previamente pulve-

rizado y congelado en nitrógeno líquido. Estas muestras fueron homogeneizadas en amortiguador de extracción GUS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7.0, β-mercaptoetanol 10 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 10 mM, sarcosil 0.1 % y tritón X-100 0.1 %) y centrifugadas por 30 min a 4 °C; posteriormente se recuperó la fase acuosa y se determinó la concentración de proteínas totales (Bradford, 1976).

Para el ensayo enzimático se utilizó una concentración estándar de 10 µg de proteínas totales resuspendidas en un volumen final de 90 µL de amortiguador de extracción GUS; a esta solución se le adicionaron 10 µL de solución de MUG (4-metil-umberiferil-β-D-glucuronido, Sigma) 10 mM. Esta mezcla se incubó a 37 °C en oscuridad durante 1 h. Para detener la reacción se adicionaron 900 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2 M.

El fluorímetro (DNAQuant 200, Hoefer) se calibró a 500 unidades con MU 1 µM (4-metilumberilferona, Sigma) en 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2 M, a longitudes de onda de 365 nm de excitación y 465 nm de emisión. Se tomaron 200 µL de las mezclas de reacción, se completaron a 2 mL con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2 M y se registraron las unidades de fluorescencia; para cada lectura se registraron también las unidades de emisión de fondo. La actividad específica de la enzima en cada extracto se registró como la concentración de producto de la reacción de MUG hidrolizado por mg de proteína total por minuto de reacción.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Generación de la construcción pBin-BADH4-GUS-NOS

Para obtener la región 5' del gen *ahybadh4* correspondiente al promotor del gen, se realizó un ensayo por PCR en el que se usó como molde un fragmento de 1492 pb de la clona genómica del mismo gen, clonado en el plásmido pGEM 3zf, que incluía la región río arriba del punto de inicio de la transcripción de la clona genómica *ahybadh4* (Legaria *et al.*, 1998). De la amplificación por PCR se obtuvo una banda de 1.5 kb, que correspondía al tamaño esperado e incluía la región (-1356/+136) de la clona genómica *ahybadh4*. Después de determinar que la secuencia nucleotídica correspondía a la reportada (Legaria *et al.*, 1998), el producto de PCR fue clonado en los sitios de restricción *Xba I-Bam HI* del plásmido pBI201.1 (Jefferson, 1987), que es un derivado del plásmido pUC19 que contiene la secuencia codificante del gen de la β-glucuronidasa y la señal de poliadenilación de la nopalina sintasa (NOS). El inserto de 3.5 kb correspondiente al promotor del gen *ahybadh4* fusionado al gen reportero GUS y NOS, se subclonó en el plásmido pBin19 (Bevan, 1984), en los sitios *Xba I-Eco RI*, lo que dio lugar al gen

quimérico pBADH4-GUS-NOS (Figura 1). Este plásmido fue utilizado para la transformación de *A. thaliana*. Por otro lado, la construcción pBI121 (Jefferson *et al.*, 1987), que contiene al promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor CaMV fusionado al gen reportero GUS, fue utilizada como testigo positivo de la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa (Figura 1).

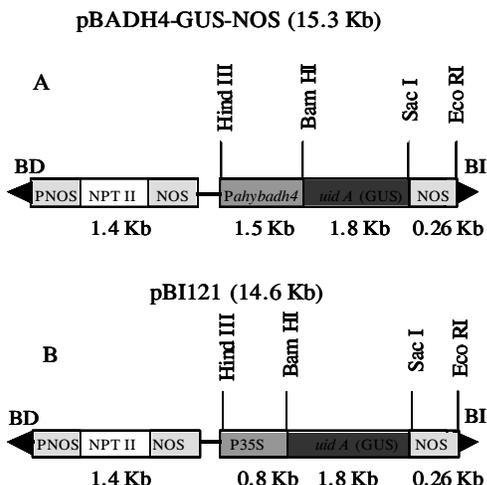


Figura 1. Esquema de los plásmidos pBADH4-GUS-NOS y pBI121. A. Fragmento de 1.5 kb del promotor del gen *ahybadh4* fusionado al gen reportero GUS. PNOS y NOS indican el promotor y la señal de poliadenilación de la nopalina sintasa, respectivamente. También se muestran los sitios de restricción, la región codificante del gen de la neomicina fosfo-transferasa (NPTII), borde derecho (BD) y borde izquierdo (BI) de la región de T-ADN de *Agrobacterium tumefaciens*. B. Construcción utilizada como control positivo de la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa.

### Análisis genético y por PCR de las plantas transgénicas

Por cada construcción se transformaron 20 plantas de *Arabidopsis thaliana*; se obtuvieron ocho plantas resistentes a kanamicina transformadas con pBADH4-GUS-NOS y nueve plantas con pBI121. Para corroborar la presencia de los transgenes en las líneas obtenidas se realizó un ensayo por PCR de cinco líneas portadoras de pBADH4-GUS-NOS y una línea con pBI121 (T<sub>1</sub>). Para las plántulas con pBADH4-GUS-NOS se obtuvo una banda de 1.5 kb correspondiente a la región promotora del gen *ahybadh4*. Para la línea con pBI121 se obtuvo una banda de 2.1 kb correspondiente a 57 pb del promotor 35S, 1.8 kb del gen reportero GUS y 260 pb de la señal de poliadenilación de la nopalina sintasa (Figura 2). Con el fin de tener una idea del número de copias del transgen presente en cada línea, se analizó el patrón de segregación de resistencia a kanamicina de plántulas T<sub>2</sub>. El patrón de segregación de todas las líneas fue de 3:1 lo que sugiere la presencia de al menos una copia del transgen integrada en el genoma de *A. thaliana*.

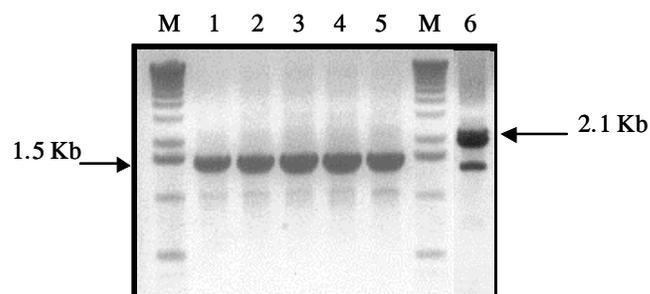


Figura 2. Ensayo por PCR en plantas transgénicas de *A. thaliana*. Se muestra la amplificación de una región del T-ADN de las construcciones pBADH-GUS-NOS (carril 1-5) y pBI121 (carril 6). Para amplificar la región de 1.5 Kb del promotor del gen *ahybadh4* (carriles 1-5) se utilizaron los oligonucleótidos M13 reverso y *ahybadh4*. Para obtener el fragmento de 2.1 Kb del gen reportero GUS (carril 6) se utilizaron los oligonucleótidos 35S y M13 universal. M: marcadores de peso molecular (1 Kb ladder, Gibco BRL).

### Análisis histoquímico y fluorimétrico de las plantas transgénicas

Con el propósito de conocer la actividad del promotor *ahybadh4* en *A. thaliana*, las plantas transgénicas de ocho líneas homocigas (T<sub>3</sub>) independientes que portan el transgen BADH4-GUS-NOS (1.5, 2.11, 3.6, 4.6, 5.10, 6.3, 7.2 y 9.4), fueron sometidas a tratamientos de estrés osmótico, ABA o sólo con medio MS, y posteriormente se les practicó el ensayo histoquímico de GUS de acuerdo con los protocolos descritos en Materiales y Métodos. De las ocho líneas probadas sólo cinco mostraron la actividad de GUS (2.11, 3.6, 4.6, 5.10 y 7.2). Tal y como se ha reportado en un sinnúmero de casos, esto puede deberse a que la expresión del transgen en la planta sufrió un silenciamiento o a que durante la inserción del T-ADN en el genoma de la planta se llevó a cabo una delección del transgen (Matzke y Matzke, 1998). En las Figuras 3, 4 y 5 se muestra la expresión de GUS en una línea representativa (7.2). La presencia de color azul en los tejidos fue utilizada como indicador de la actividad de GUS. Se utilizó como testigo positivo a las plantas de *A. thaliana* que expresaban al gen *uid A* bajo el control del promotor 35S, caracterizado por ser un promotor fuerte y constitutivo (Figura 3A). La tinción de la actividad de GUS se puede observar en las raíces de *A. thaliana* de 7, 14 ó 21 días después de la germinación sometida a los tratamientos con ABA (Figura 3B, C, D, E, F), NaCl (Figura 3G, H, I, J, K) o PEG (Figura 3L, M, N). No se observó expresión del gen reportero GUS en otros órganos o tejidos de plántulas en ninguna de las edades analizadas (Figura 3B, C, D, G, H, I, L, M). Por otro lado, el análisis histoquímico de plantas de *A. thaliana* de tres distintas edades, tratadas solamente con medio MS, mostró también expresión del transgen exclusivamente en las raíces (Figura 4A, D, E). De acuerdo con

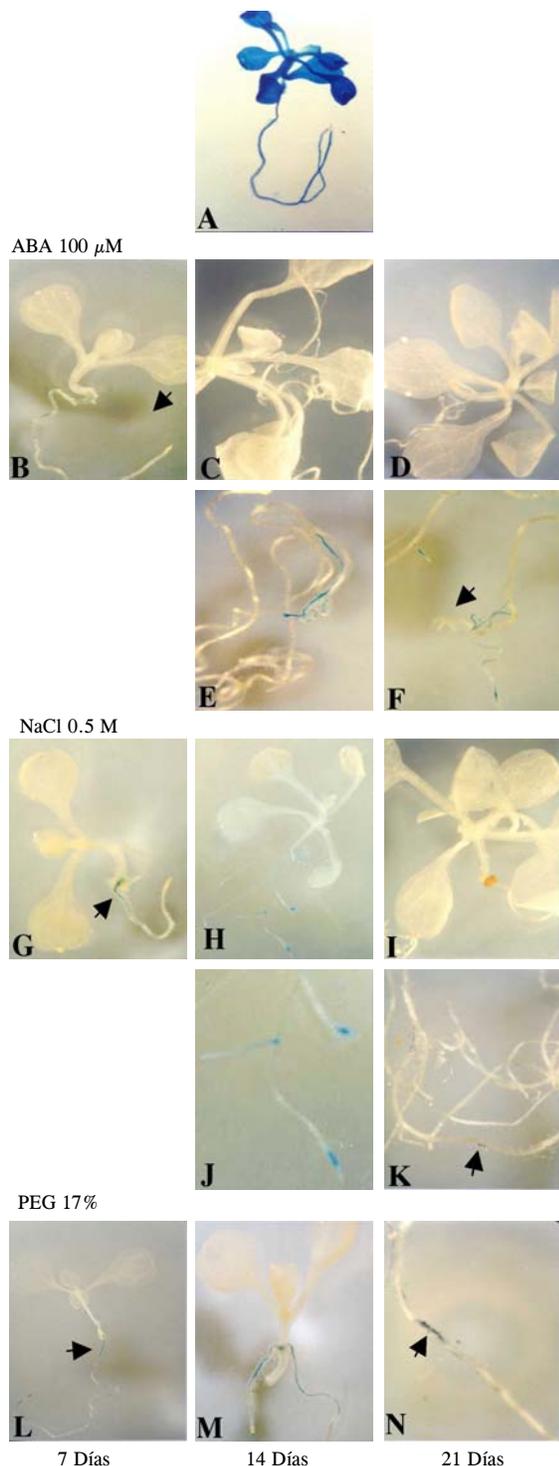


Figura 3. Ensayo histoquímico de la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en plantas tratadas con ABA, NaCl y PEG. Se muestran plántulas transgénicas de diferentes edades: 7(B, G, L), 14(C, E, H, J, M) y 21(D, F, I, K, N) días después de la germinación, pertenecientes a la línea BADH 7.2 progenie T<sub>3</sub>, portadora de la construcción pBADH-4-GUS-NOS. Las plántulas fueron sometidas a un tratamiento con ABA 100  $\mu$ M (B, C, D, E, F), NaCl 0.5 M (G, H, I, J, K) o con PEG 17 % (L, M, N) durante 16 horas. A. Planta transgénica T<sub>3</sub> portadora de la construcción pBI121 después de 14 días de germinación. Las flechas indican zonas discretas de tinción de la actividad de GUS.

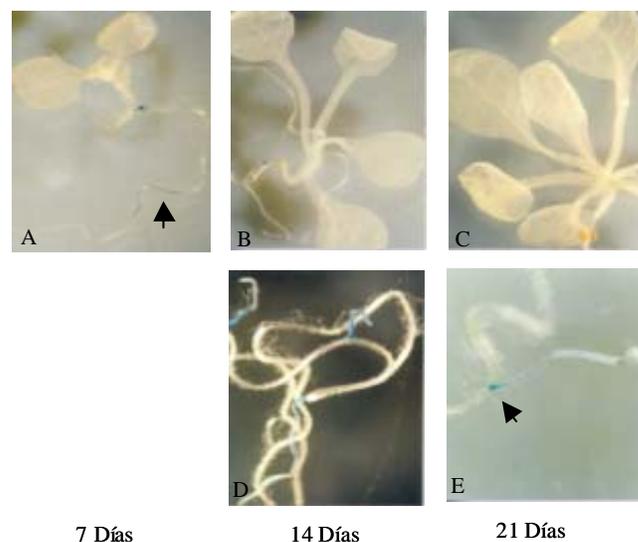


Figura 4. Ensayo histoquímico de la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en plantas sin tratamiento. Se muestran plántulas transgénicas de diferentes edades: 7(A), 14(B, D) y 21(C, E) días después de la germinación, de la línea BADH 7.2 generación T<sub>3</sub>, portadora de la construcción pBADH-4-GUS-NOS. Estas plantas fueron colocadas en medio MS líquido durante 16 horas. Las flechas indican zonas discretas de tinción de la actividad de GUS.

la tinción observada en los tejidos, estos resultados parecen indicar que la incubación de las plantas con ABA o agentes osmóticos como NaCl o PEG no provocaron un aumento en la expresión de GUS. Para descartar esta posibilidad, se llevaron a cabo ensayos fluorimétricos de GUS en las plantas transgénicas, de tal manera que permitieran cuantificar la expresión del gen reportero.

Los resultados de la actividad enzimática de GUS se muestran en la Figura 5. Los datos obtenidos en los ensayos fluorimétricos fueron analizados mediante una prueba de "t", en donde se comparó la actividad enzimática de GUS de cada línea transgénica portadora de la construcción pBADH4-GUS-NOS en cada uno de los tratamientos (ABA 100  $\mu$ M, NaCl 0.5 M o PEG 17 %) contra los testigos negativos (plantas tratadas con medio MS líquido) para cada una de las edades de las plantas (Figura 5A, B, C). La línea 6.3, que fue transformada con pBI121, se utilizó como testigo positivo para la cuantificación de la actividad de GUS (Figura 5D). El análisis estadístico de los datos mostró que las diferencias entre los tratamientos y los testigos no fueron significativas ( $P < 0.01$ ) en ninguna de las líneas transgénicas analizadas (Figura 5); es decir, la secuencia 5' del gen *ahybadh4* de 1492 pb no reguló la expresión del gen reportero GUS en plantas transgénicas de *A. thaliana*, cuando éstas fueron sometidas a tratamientos de estrés osmótico y ABA. Existen varios ejemplos reportados en donde se ha mostrado que el promotor de un gen

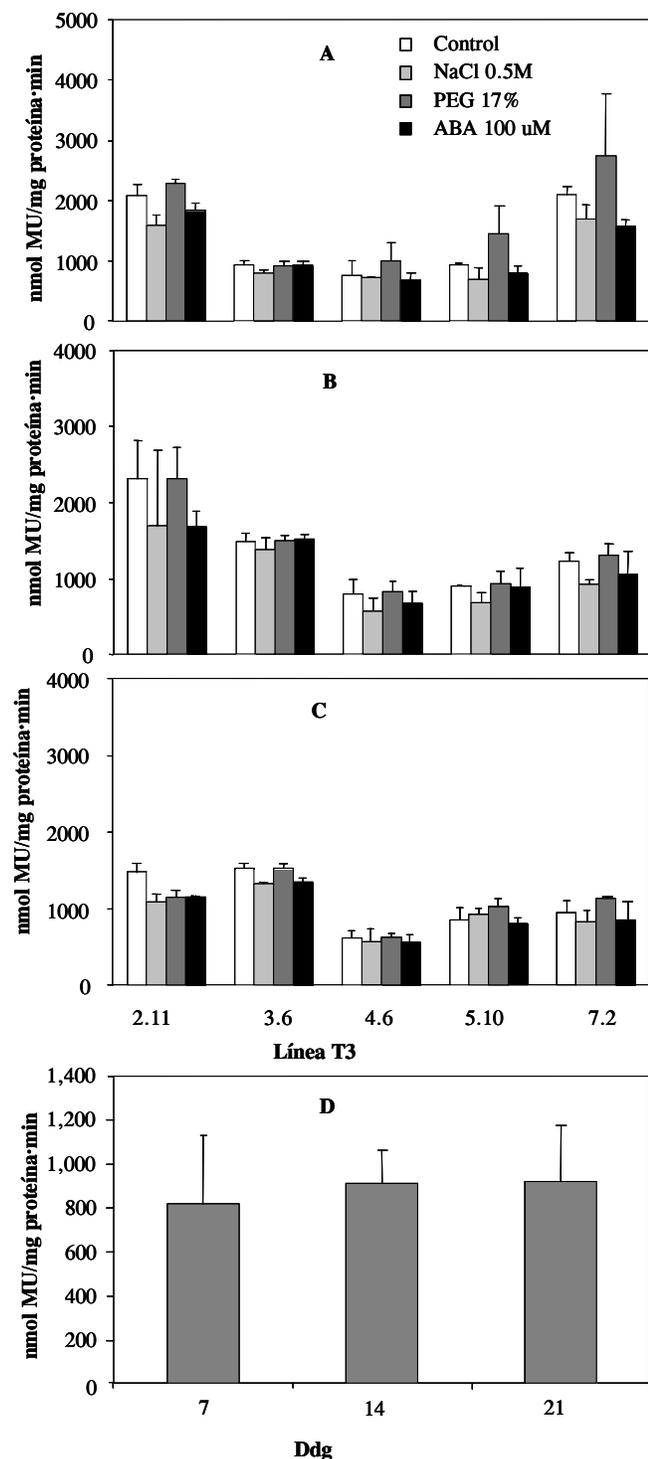


Figura 5. Medición de la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa en plantas transgénicas de *A. thaliana*. Los ensayos se realizaron en 5 líneas transgénicas T<sub>3</sub> de *A. thaliana* portadoras de las construcción pBADH4-GUS-NOS de 7 (A), 14 (B) y 21 (C) días después de la germinación, tratadas con ABA 100  $\mu$ M, NaCl 0.5M, o PEG 17% por un periodo de 16 horas. Actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa de la línea transgénica 6.3 portadora de la construcción pBI121 de 7, 14 y 21 días después de la germinación (D). Los resultados representan la media de las actividades de tres muestras independientes con sus respectivas desviaciones estándares. Ddg: Días después de la germinación.

regula la expresión de GUS en una planta transgénica bajo tratamiento con ABA, déficit hídrico, frío o estrés salino. Por ejemplo, Velasco *et al.* (1998) mostraron que el promotor del gen *Cp11-24* fusionado con GUS, se expresó en *A. thaliana* en respuesta al ABA y a deshidratación.

En general, los elementos que actúan en *cis* requeridos para la expresión genética se encuentran en regiones corriente arriba del punto de inicio de la transcripción; sin embargo, también se han encontrado elementos de control intragénicos localizados en el extremo 3' de varios genes. Por ejemplo, Dietrich *et al.* (1992) demostraron que la combinación de dos secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del gen *AX92* afectaban su distribución espacial en embriones y plántulas de *Brassica napus*. El análisis del gen *AGAMOUS (AG)* de *A. thaliana* con GUS, reveló que las regiones más importantes para el control de la expresión de *AG*, estaban localizadas dentro de una secuencia intragénica de naturaleza principalmente intrónica (Sieburth y Meyerowitz, 1997).

En estudios previos se ha observado la existencia de efectos aditivos en diferentes elementos que actúan en *cis* y que juntos tienen influencia en la inducción de la transcripción (Skriver *et al.*, 1991). También es importante el número de copias de un determinado elemento que actúa en *cis* dentro de una secuencia promotora. Los elementos ABRE contienen la secuencia central "ACGT", y se ha demostrado que las bases que rodean la secuencia central son esenciales para la especificidad de la respuesta al ABA y pueden estar unidos o relacionados con elementos de acoplamiento (CE1) distantes para formar un complejo conjunto en respuesta al ABA (Shen y Ho, 1995).

De igual manera, en un estudio realizado por Rossi *et al.* (1998) se determinó que el promotor del gen *Asr2* de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) contenía elementos potenciales involucrados en la respuesta al ABA como una caja parecida a las cajas G y CE1 encontradas en varios genes que responden al ABA; además, la expresión del gen era estimulada por estrés y ABA en hojas y raíces. El promotor del gen *Asr-2* fue fusionado a GUS y esta construcción se utilizó para producir plantas transgénicas de tomate, papa (*Solanum tuberosum* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum*) y papaya (*Carica papaya* L.). La región promotora de *Asr-2* mostró ser funcional en todos los sistemas, pero la expresión de GUS fue estimulada por ABA sólo en plantas transgénicas de papaya y tabaco, pero no en papa (Rossi *et al.*, 1998). La ausencia de la regulación del promotor de *Asr2* por ABA en papa, puede deberse al hecho de que la maquinaria transcripcional presente en algunas especies no reconoce a los elementos genómicos regulatorios que controlan la transcripción genética en otras especies (Rossi *et al.*, 1998).

El fragmento de 1.5 kb del promotor del gen *ahybadh4*, analizado en el presente trabajo, contiene una secuencia ACGT que ha sido reportada como la secuencia central de las cajas ABRE (Shen y Ho, 1995), dos elementos de control CE1 y una caja AS1, con el consenso TGACG, involucrada en la expresión específica en la raíz (Lam *et al.*, 1989). Si bien el gen *ahybadh* se expresó en la raíz de *A. thaliana*, no se observó una regulación por ABA o estrés osmótico. Dado que es concebible que la región 5' de un gen no siempre contenga todos los elementos que regulan su expresión, se podría sugerir que el promotor del gen *ahybadh4* carezca de algunos elementos necesarios para su expresión regulada en *A. thaliana*. Es decir, la expresión del gen *ahybadh4* podría requerir secuencias adicionales corriente arriba, de alguna secuencia intragénica o de alguna secuencia 3' de la región no codificante. Por otro lado, es posible que los elementos en *cis* del promotor del gen *ahybadh4* sean suficientes, pero que la maquinaria de transcripción de *Arabidopsis* no contenga los factores necesarios que reconozcan dichos elementos en *cis* del promotor de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). Recientemente se reportó la expresión del promotor del gen *AcBADH*, de la planta halófila *Atriplex centralasiatica*, en plantas transgénicas de tabaco (Yin *et al.*, 2002). La expresión del gen reportero *uidA* (GUS) mostró inducción del promotor por NaCl 0.4 M pero no por ABA, a pesar de tener la secuencia del promotor de *AcBADH* una caja ABRE.

Otra posibilidad es que la expresión del gen *ahybadh4* en *A. thaliana* refleje correctamente su expresión nativa en *A. hypochondriacus*; es decir, la familia de genes *badh* de amaranto podría constar de genes inducidos por estrés y constitutivos, entre los cuales habría genes específicos de raíz. Esto último es posible ya que Legaria *et al.* (1998) encontraron por hibridación tipo Southern, que la familia de genes *badh* consta de tres o más miembros. Se sabe que el déficit hídrico es percibido inicialmente en la raíz y existe evidencia de que el ABA está involucrado en la señalización y propagación de este fenómeno hacia la parte aérea de la planta (Zhang *et al.*, 1987). Dado que la raíz se ve sometida constantemente a procesos de osmorregulación, la síntesis de un osmoprotector en este órgano es de vital importancia.

### CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados de la presente investigación, se puede concluir que la secuencia 5' del gen *ahybadh4* de 1492 pb es funcional en raíces de plantas transgénicas de *A. thaliana*. La región del promotor del gen *ahybadh4* de *A. hypochondriacus*, se expresa constitutivamente en raíces de plantas de *A. thaliana* de 7, 14 y 21

días después de la germinación, y no se regula por tratamientos con ABA o estrés osmótico.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la valiosa colaboración del Dr. Juan Estévez Palmas, del Instituto de Biotecnología-UNAM, en la asesoría brindada para la transformación de *A. thaliana* y a los integrantes de la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología-UNAM, Paul Gaytán Colin, Eugenio López Bustos y Santiago Becerra Ramírez, por su ayuda en la síntesis de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Este trabajo fue financiado con fondos de CONACYT (clave 27703-N) e ICGEB (clave CRP/MEX98-01).

### BIBLIOGRAFÍA

- Arakawa K, M Katayama, T Takabe (1990) Levels of betaine aldehyde activity in the green leaves and etiolated leaves and roots in barley. *Plant Cell Physiol.* 31:797-803.
- Arakawa K, T Takabe, T Sugiyama, T Akazawa (1987) Purification of betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves and preparation of its antibody. *J. Biochem.* 101:1485-1488.
- Bevan M (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12:8711-8721.
- Boyd L A, L Adam, L E Pelcher, A McHughen, R Hirji, G Selvaraj (1991) Characterization of an *Escherichia coli* gene encoding betaine aldehyde dehydrogenase (BADH): structural similarity to mammalian ALDHs and a plant BADH. *Gene* 103:45-52.
- Bradford M M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analyt. Biochem.* 72:278-259.
- Clough S T, A F Bent (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16:735-743.
- Dietrich R A, S E Radke, J J Harada (1992) Downstream DNA sequences are required to activate a gene expressed in the root cortex of embryos and seedlings. *Plant Cell* 4:1371-1382.
- Gamboa A, E M Valenzuela, E Murillo (1991) Biochemical changes due to water loss in leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. *J. Plant Physiol.* 137:586-590.
- Grillo S, A Leone (1996) *Physical Stresses in Plants*. Springer-Verlag. Heidelberg. 187 p.
- Ishitani M, T Nakamura, H Youn, T Takabe (1995) Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Molec. Biol.* 27:307-31.
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molec. Biol. Rep.* 5:387-405.
- Jefferson R A, T A Kavanagh, M W Bevan (1987) GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6:3901-3907.
- Lam E, P N Benfey, P M Gilmartin, R-X Fang, N-H Chua (1989) Site-specific mutations alter *in vitro* factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:7890-7894.
- Legaria J, R Rajsbaum, R A Muñoz-Clares, N Villegas-Sepúlveda, J Simpson, G Iturriaga (1998) Molecular characterization of two genes encoding betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth. Expression in leaves under short-term exposure to osmotic stress or abscisic acid. *Gene* 218:69-76.
- Matzke A J M, M A Matzke (1998) Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr. Op. Plant Biol.* 1:142-148.
- McCue K F, A D Hanson (1990) Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotech.* 8:358-362.

- McCue K F, A D Hanson (1992)** Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Mol. Biol.* 18:1-11.
- Murashige T, F A Skoog (1962)** Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nakamura T, S Yokota, Y Muramoto, K Tsutsui, Y Oguri, K Fukui, T Takabe (1997)** Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycine betaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant Journal* 11: 1115-1120.
- Rhodes D, A D Hanson (1993)** Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 44:357-384.
- Rossi M, F Carrari, J L Cabrera-Ponce, C Vázquez-Rovere, L Herrera-Estrella, G Gudesblat, N D Iusem (1998)** Analysis of an abscisic acid (ABA)-responsive gene promoter belonging to the *Asr* gene family from tomato in homologous and heterologous systems. *Molec. Gen. Genet.* 258:1-8.
- Shen Q, D T H Ho (1995)** Functional dissection of an abscisic acid (ABA) inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel *cis*-acting elements. *Plant Cell* 7:295-307.
- Sieburth L E, E M Meyerowitz (1997)** Molecular dissection of the *AGAMOUS* control region shows that *cis* elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell* 9:355-365.
- Skriver K, F Lok Olsen, J C Rogers, J Mundy (1991)** *Cis*-DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 88:7266-7270.
- Valenzuela-Soto E M, R Muñoz -Clares (1994)** Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit. *J. Plant Physiol.* 143:145-152.
- Velasco R, F Salamini, D Bartels (1998)** Gene structure and expresión análisis of the drought and abscisic acid responsive *CDeT11-24* gene family from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta.* 204:459-471.
- Weigel P, E A Weretylnyk, A D Hanson (1986)** Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 82:753-759.
- Weretylnyk E A, A D Hanson (1990)** Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 87: 2745-2749.
- Wood A J, H Saneoka, D Rhodes, R J Joly, P B Goldsgrough (1996)** Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum. Molecular cloning and expression of two related genes. *Plant Physiol.* 110:1301-1308.
- Yin X, Y Zhao, D Luo, H Zhang (2002)** Isolating the promoter of a stress-induced gene encoding betaine aldehyde dehydrogenase from the halophyte *Atriplex centralasiatica* Iljin. *Biochi. Biophysica Acta.* 1577:452-456.
- Zhang J, U Schurr, W J Davies (1987)** Control of stomatal behaviour by abscisic acid which apparently originates in roots. *J. Exp. Bot.* 38:1174-1181.