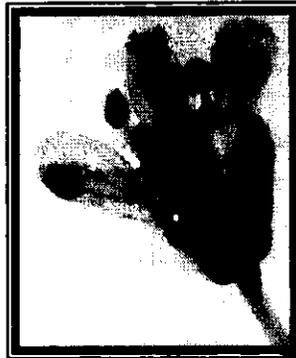




00591  
**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y  
DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS  
Y HUMANIDADES**

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE UN  
GEN QUE CODIFICA PARA UNA  
PROTEÍNA LEA DE FRIJOL**



**T E S I S**

**DE DOCTORADO EN  
BIOQUÍMICA**

**LIZ PATRICIA MORENO FONSECA**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**CUERNAVACA, MOR.**

**OCTUBRE DEL 2000**



MT 284737



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Alejandra Covarrubias Robles y la supervisión del siguiente comité tutorial:

Dra. Patricia León Mejía  
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres  
Dra. Alejandra Covarrubias Robles

Este trabajo se realizó con el apoyo de las siguientes instituciones  
COLCIENCIAS (Colombia)  
CONACYT (México)

A Rosario, Graciela y Adela

A mis Padres

Al Chinito

Al Renacuajito

A mi sufrida Colombia

## AGRADECIMIENTOS I

A Carlos, porque emprendimos esta aventura juntos y siempre estuvo conmigo apoyándome cuando más lo necesité. Gracias Chinito.

A mis tías Rosario, Graciela y Adela por el amor que siempre me dieron, y porque sin su ayuda nunca hubiera llegado hasta aquí.

A mis padres, por querer siempre algo mejor para mí.

A Alejandra, por el apoyo incondicional que me brindó en los momentos más difíciles, por todas sus enseñanzas y por estar siempre dispuesta a ayudarme. Sin ella no hubiera sido posible el desarrollo de esta tesis. Gracias Ale.

A Pirata, mi felino amigo, por enseñarme que solo somos de especies diferentes y por hacerme reír tantas veces, aún en días en que era difícil hacerlo.

A Lidia, mi querida amiga rola quien se convirtió en parte de mi familia, con quien disfruté tantas tardes de fin de semana y quien siempre me mostró el lado positivo de las cosas.

A Lina, mi querida amiga, que aunque lejos siempre estuvo conmigo y nunca olvidó nuestra amistad.

A Chemito, por tantas cosas que intentaré resumir en pocas palabras: por su compañerismo, por sus enseñanzas y por el entusiasmo contagiante que siempre tenía para todo y con todos.

A Emmanuelito, por su sincera amistad, su nobleza y por nunca enojarse conmigo.

A Erika por haber tenido la paciencia de aguantarme y por su gran ayuda.

A Sonita por estar siempre dispuesta a ayudarme y por enseñarme que las computadoras son aparatos amigables.

A mis compañeros del laboratorio, Chemito, Blanca, Espe, Sonia, Magda, Pancho, el Niño Oscar, Florita, la Sta. Smith, Emmanuel, Adriana, Isa, Pepe, Erika, Wendy, Marina, Rosy, Abraham, Anita, Kannan, Sergio, Larissa, Luz Ma, Jordi, Carlitos, Ale, Run Ying, Lupita, José Luis y la Sra. María Jesus por su profundo sentido del compañerismo, su amistad y su buen humor, que hicieron que el laboratorio, mas que un lugar de trabajo fuera un lugar de camaradería y convivencia

A Geo, por su invaluable e incondicional amistad.

A mis paisanos, Lidia, Claudia B., Rubén, Sonia, Alfonso, Alexandra, Nubia, y Armando por esas inolvidables veladas al son de la cumbia y la salsa.

A Juan Estévez, por su compañerismo, su amabilidad y por estar siempre dispuesto a ayudarme.

A Orlando Acosta, al Profe Peñaranda y al Ingeniero Buitrago por creer en mi y darme la oportunidad de realizar mi sueños.

Al Instituto de Biotecnología y a la Universidad Nacional de Colombia por el apoyo que me brindaron para obtener la beca que soportó mis estudios.

A la UNAM y a México por darme la oportunidad de ser parte de ellos durante 5 años.

A COLCIENCIAS por el apoyo económico que me brindó durante 4 años y que permitió el desarrollo de este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS II

La presente tesis no se habría realizado sin el apoyo técnico de varias personas a quienes agradezco profundamente su invaluable y oportuna ayuda.

A Lorena López por su apoyo en realización de los cortes histológicos.

A Patricia Rueda por su ayuda en el manejo y cultivo de células en suspensión.

A Erika Arroyo por su apoyo en el mantenimiento de las plantas y por su ayuda en la realización de algunos experimentos.

A Aida Martínez y María Luisa López por su ayuda en la realización de los experimentos relacionados con luz.

A José Luis Cabrera del CINVESTAV-IRAPUATO por el apoyo en la realización de los experimentos de bombardeo.

A Carlos A. Guerrero, Rosy Solorzano y Victor H. Bustamante por su invaluable ayuda en la realización del experimento de "primer extension".

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo recibido por dos Instituciones: COLCIENCIAS (Colombia) quien me financió a través de una beca durante 4 años y CONACYT (México) quien apoyó la realización de este trabajo a través del proyecto 20242N.

## INDICE

Introducción	1
El agua en las plantas	1
Estrés hídrico y respuesta de las plantas	2
Los genes <i>lea</i>	5
Acido abscísico y su relación con estrés	8
Expresión independiente de ABA de genes durante estrés	12
Antecedentes del trabajo	16
Hipótesis	18
Objetivos	18
Artículo	19
Materiales y métodos	51
Resultados	57
Discusión	69
Conclusiones	75
Perspectivas	76
Bibliografía	78

## RESUMEN

En un trabajo previo se demostró que tanto el transcrito como la proteína que codifica para el gen *Pvlea-18* de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), el cual constituye un miembro de una nueva familia de proteínas de embriogénesis tardía (LEA), se acumula en plántulas de frijol en crecimiento etiolado, no sólo en respuesta a déficit hídrico, sino durante condiciones de irrigación óptima (Colmenero *et al.*, 1997; Colmenero *et al.*, 1999). En el presente trabajo se estudia la regulación de este gen usando una fusión transcripcional de la región promotora del gen con el gen reportero GUS. Con el fin de determinar el papel de la región 3' en la regulación del gen *Pvlea-18*, se hicieron dos construcciones usando como terminadores en una de ellas la región 3' de la nopalina sintasa y en la otra la región 3' del gen *Pvlea-18*. Estas construcciones fueron expresadas en plantas de *A. thaliana*, donde se analizó la actividad del gen reportero bajo diferentes condiciones. Aquí se demuestra que el gen *Pvlea-18* se expresa, al igual que en plantas de frijol, durante el desarrollo normal, en respuesta a ABA y a deshidratación. En las plantas que tienen la construcción que incluye la región 3' del gen *Pvlea-18*, se observó una mayor expresión del gen durante desarrollo y en respuesta a deshidratación, pero no en respuesta a ABA. Estos resultados indican que la región 3' del gen *Pvlea-18* tiene un efecto incrementador sobre la expresión del gen, el cual es específicamente mayor en respuesta a deshidratación. También se demostró que la mayoría de la respuesta del gen a deshidratación es independiente de ABA. Así, al tratar las plantas transgénicas de *Arabidopsis* con fluridona, un inhibidor de la síntesis de ABA, y posteriormente deshidratarlas se observó sólo una pequeña disminución en la inducción del gen. Finalmente, se presenta evidencia que indica que este gen es regulado negativamente durante el crecimiento etiolado, particularmente en raíces, en contraste con el patrón de expresión observado durante el desarrollo normal. Esta regulación durante el crecimiento etiolado no depende directamente de la luz y es independiente de ABA. Los resultados obtenidos sugieren que este gen presenta una regulación compleja, en la cual la región 3' juega un papel muy importante. Este es el primer caso en que se demuestra, la participación de la región 3', en la respuesta a deshidratación.

## ABSTRACT

We have previously shown that mRNA and protein encoded by the *Pvlea-18* gene from *Phaseolus vulgaris* L., a member of a new family of Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins, accumulate in dark grown bean seedlings, not only in response to water deficit, but also during optimal irrigation (Colmenero-Flores *et al.*, 1997; Colmenero-Flores *et al.*, 1999). In this work, we studied the *Pvlea-18* gene regulation by using a transcriptional fusion between the *Pvlea-18* promoter region and the GUS reporter gene. With the purpose of analyzing the role of the 3' region in the regulation of this gene, we made two constructions using in one case the 3'-*nos* as a terminator, and in the other case the 3'-*Pvlea-18*. These constructions were expressed in *A. thaliana* plants, in which we analyzed the reporter gene activity under different conditions. Here we demonstrate that the *Pvlea-18* gene is expressed during development and in response to ABA and dehydration, as we previously observed in bean plants. In the plants transformed with the chimeric gene containing the 3' *Pvlea-18* region, we observed a higher gene expression during development and in response to dehydration, but not in response to ABA. These results indicate that the 3' *Pvlea-18* region has an enhancer effect on gene expression, which was specifically higher under dehydration conditions. We also demonstrated that the majority of the dehydration response by this gene is ABA-independent. Thus, when we treated *Arabidopsis* transgenic plants with fluridone, an ABA-biosynthesis inhibitor, before exposing them to dehydration, only a small decrease in the *Pvlea-18* promoter expression was observed, suggesting that the *Pvlea-18* gene dehydration response is mostly ABA-independent. Finally, we present evidence indicating that *Pvlea-18* gene expression is negatively regulated during etiolated growth, particularly in roots, in contrast to the expression pattern observed during normal development. Such regulation during the etiolated growth not dependent of light or ABA. Finally, our results suggest that the *Pvlea-18* gene presents a complicated regulation pattern, in which the 3'-region has an important role. In addition, this is the first case in which a role of 3' region in regulation is demonstrated for a dehydration-induced gene.

## INTRODUCCION

### EL AGUA EN LAS PLANTAS

El agua es el componente más abundante en las células de las plantas. Típicamente constituye del 80 al 95% de la masa de los tejidos en crecimiento y desempeña varias funciones únicas en la planta. Es el solvente más abundante y mejor conocido y, como tal, permite el movimiento de moléculas dentro y entre las células. Debido a sus propiedades polares, tiene gran influencia en la estructura de moléculas tales como proteínas, polisacáridos y otras. Igualmente, la expansión celular y la integridad fisico-química de la pared dependen del agua. Teniendo en cuenta la gran importancia del agua en las plantas, se puede considerar que una cantidad limitada o excesiva de agua para éstas constituye un factor inductor de situaciones adversas.

El agua viaja desde las zonas donde el potencial hídrico es mayor (menos negativo) hacia las zonas donde éste es menor (más negativo). El potencial hídrico se define según la ecuación (Taiz y Zeiger, 1991, Cap. 3):

$$Y_W = P - p$$

donde "Y<sub>W</sub>" es el *potencial hídrico*; "P" es la *presión de turgor* o la fuerza hidrostática ejercida en el interior de la célula vegetal contra la pared celular y es de signo (+) y "p" es la *presión osmótica*, que es una medida de la concentración de los solutos. La interacción del agua con los solutos disueltos en ésta tiene un efecto negativo sobre el Y<sub>W</sub> ya que disminuye la cantidad de agua libre disponible en el sistema, por lo que se resta en la ecuación. La reducción en el valor del Y<sub>W</sub>, consecuencia de la interacción del agua con los materiales insolubles y las paredes define al *potencial mátrico*, que no aparece en la ecuación por haberse comprobado empíricamente que su contribución al valor del Y<sub>W</sub> es despreciable. El turgor es, según la ecuación, directamente proporcional al potencial hídrico. La principal fuerza motora que impulsa al agua en su viaje a la parte aérea es la pérdida de agua en las hojas por evapotranspiración. Esto supone que las hojas son los órganos de las plantas que presentan los potenciales hídricos más negativos.

## ESTRÉS HÍDRICO Y RESPUESTAS DE LAS PLANTAS

El estrés por déficit hídrico o por sequía se produce en las plantas en respuesta a un ambiente escaso en agua, en donde la tasa de transpiración excede a la toma de agua. El déficit hídrico no sólo ocurre cuando hay poca agua en el ambiente, sino también por bajas temperaturas y por una elevada salinidad del suelo. Estas condiciones, capaces de inducir una disminución del agua disponible del citoplasma de las células también se conocen como estrés osmótico (Levitt, 1980, cap. 3).

De acuerdo a los requerimientos de agua, las plantas pueden ser consideradas como hidrófitas si están adaptadas a vivir total o parcialmente sumergidas en el agua (en general no toleran potenciales hídricos más negativos de -5 a -10 bares); como mesófitas si están adaptadas a un aporte moderado de agua (en general no toleran potenciales hídricos más negativos de -20 bares) y como xerófitas si están adaptadas a ambientes áridos (en general no toleran potenciales hídricos más negativos de -40 bares).

Todas las plantas a lo largo de su desarrollo experimentan algún grado de limitación de agua. En los sistemas naturales, un déficit de agua puede ser el resultado de bajas precipitaciones, baja capacidad de retención de agua del suelo, excesiva salinidad, temperaturas extremas frías o calientes, baja presión de vapor atmosférica o una combinación de estos factores (Nilsen y Orcutt, 1996). De otro lado, una tercera parte de la superficie del planeta se considera como árida o semiárida, mientras que la mayoría de la superficie restante está sujeta a períodos temporales de déficit hídrico. De esta manera, el agua constituye el principal factor limitante del crecimiento de las plantas en la tierra, actuando como una fuerza selectiva de primer grado para la evolución y distribución de las especies vegetales (Hanson y Hitz, 1982).

Las plantas han respondido al estrés hídrico desarrollando evolutivamente adaptaciones tanto a nivel morfológico, como anatómico y celular que les permiten vivir bajo condiciones de constante estrés hídrico. Las plantas que son capaces de adquirir más agua o que hacen un uso más eficiente de ésta podrán tener resistencia al estrés por sequía. De esta manera, algunas plantas poseen adaptaciones tales como el desarrollo del metabolismo C4 y del metabolismo ácido de las crasuláceas o CAM, que les permiten explotar ambientes más áridos. Así, en las plantas C4 hay una separación física entre el proceso de asimilación de CO<sub>2</sub>, que se produce en células del mesófilo y la reducción de éste a carbohidratos que tiene lugar en otro

tipo celular especializado (parenquima vascular) donde se acumula el  $\text{CO}_2$ . En este metabolismo, se genera una mayor concentración de  $\text{CO}_2$  en las células especializadas que puede estar en equilibrio con la atmósfera externa. Esta elevada concentración de  $\text{CO}_2$  en el sitio de carboxilación de la ribulosa bifosfato resulta en una supresión de la oxigenación (fotorrespiración).

El metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) consiste en una separación temporal de la fijación del  $\text{CO}_2$  respecto a las reacciones luminosas de la fotosíntesis. El  $\text{CO}_2$  atmosférico se acumula durante la noche, cuando la mayor humedad del ambiente permite tener los estomas abiertos. El  $\text{CO}_2$  se asimila como ácido málico y se almacena en la vacuola. Con la llegada del día se cierran los estomas, lo que detiene la asimilación de  $\text{CO}_2$  y previene la pérdida de agua. Se metaboliza el ácido málico, produciéndose  $\text{CO}_2$  que, con el ATP y el poder reductor generado en las reacciones luminosas de la fotosíntesis, va a ser reducido a carbohidratos en el ciclo de Calvin o ciclo C3-PCR. Además, la alta concentración de  $\text{CO}_2$  generada en el citoplasma celular reduce la fotorrespiración drásticamente y por tanto el daño oxidativo (Taiz y Zeiger, 1991, Cap. 9).

Las plantas también poseen mecanismos de aclimatación que se activan en respuesta a estrés hídrico. Cuando el déficit hídrico se desarrolla lentamente, se dan cambios en procesos de desarrollo que tienen varios efectos sobre el crecimiento. Uno de principal importancia es la limitación específica de la expansión foliar. Aunque el área foliar es importante, pues de ella depende la fotosíntesis, una rápida expansión foliar puede afectar negativamente la adaptación a la poca disponibilidad de agua. Otro proceso que se modifica es el crecimiento radicular. La disponibilidad de agua afecta la relación entre el crecimiento de la parte aérea y la raíz; la raíz continúa su desarrollo mientras que la parte aérea deja de crecer por causa del estrés. Así, las plantas son capaces de continuar el desarrollo de sus raíces en búsqueda de agua en zonas más profundas del suelo.

Otro mecanismo de resistencia a nivel fisiológico es el cierre de estomas. Los estomas son los responsables de la mayor proporción de pérdida de agua en las plantas. El proceso de cerrado de los estomas, cuando el mesófilo comienza a sufrir deshidratación, está regulado por la hormona ácido abscísico (ABA). Así, el ABA que está compartimentalizado en los cloroplastos de las células del mesófilo es liberado al apoplasto, llegando a las células guarda a través de la corriente de transpiración. Esta fitohormona produce una pérdida de iones  $\text{K}^+$  (calculada en 4-8 veces de disminución, desde 400-800 mM hasta 100 mM) y de aniones  $\text{Cl}^-$  y/o malato<sup>2-</sup> en las

células guarda, que provoca una salida de agua del citoplasma, dando lugar al cerrado del estoma (Taiz y Zeiger, 1991, Cap. 6).

A nivel celular, otro mecanismo de resistencia es el ajuste osmótico. Este consiste en una disminución del potencial hídrico en los tejidos vegetales, lo cual tiene como consecuencia la entrada de agua y, por tanto, no se presenta una disminución en el turgor o en la productividad fotosintética. El ajuste osmótico se da en las plantas a través de la biosíntesis de osmolitos orgánicos de bajo peso molecular y por la acumulación de iones, fundamentalmente  $K^+$ . En general, las enzimas son sensibles a las altas concentraciones de iones, como el  $Na^+$ . La acumulación de iones durante el ajuste osmótico ocurre principalmente en la vacuola, mientras que en el citoplasma se acumulan solutos que no afectan negativamente la funcionalidad de macromoléculas celulares. Estos solutos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular (osmolitos) como polioles (azúcares), metilaminas, aminoácidos libres y derivados de aminoácidos. Diferentes tipos de organismos como plantas, bacterias, hongos y animales presentan osmolitos compatibles que se caracterizan por no alterar la estructura y función de las macromoléculas, cuando se acumulan en altas concentraciones. Se propone que estos osmolitos compatibles, no interaccionan con substratos y cofactores enzimáticos, ni afectan negativamente las interacciones entre las macromoléculas y el solvente (Yancey *et al.*, 1982). La acumulación de osmolitos compatibles también tiene como consecuencia la osmoprotección, que está dada por la capacidad estabilizadora de algunos de estos solutos sobre macromoléculas como las proteínas y los sistemas de membrana celulares.

Una respuesta molecular de las plantas al estrés, y quizá una de las más importantes, es la modificación de la expresión de genes. Durante el déficit hídrico, diferentes tipos celulares responden incrementando o disminuyendo la expresión de algunos genes. Igualmente, se ha visto que muchos genes que no se expresan en condiciones de irrigación óptima pueden empezar a hacerlo bajo déficit hídrico.

Como parte de esta respuesta molecular de las plantas al déficit hídrico se ha determinado la acumulación de proteínas nuevas utilizando electroforesis uni y bidimensional (Bray, 1993). De otro lado, se han realizado estudios de rastreo diferencial de bibliotecas génicas hechas a partir de plantas estresadas y plantas bien irrigadas. Esto ha llevado, en las últimas décadas, a la clonación y análisis de muchos de los genes obtenidos a partir de estos rastreos. (Bray, 1993; Skriver y Mundy, 1990). Igualmente, el análisis de la expresión de genes en diferentes mutantes afectadas en la respuesta a déficit hídrico como las *aba* (bloqueadas en la

síntesis de ABA) y las *abi* (insensibles a ABA) ha permitido identificar varios genes importantes en dicha respuesta. El principal objetivo de estos estudios ha sido entender el estrés hídrico a nivel molecular y hallar los genes que son importantes para la tolerancia al mismo, los cuales han jugado un papel, sin duda relevante, en la adaptación de las plantas a dicho estrés.

## LOS GENES *lea*

El grupo más grande de genes que se inducen por estrés osmótico corresponde a los genes que codifican para las proteínas LEA (Late Embriogenesis Abundant Proteins) (Baker *et al.*, 1988; Dure *et al.*, 1989). Las LEA son varias familias de proteínas que se acumulan en altos niveles durante la etapa madura de la embriogénesis, justo antes del inicio de la desecación de la semilla. Algunas de ellas también se acumulan en tejidos vegetativos en respuesta a estrés osmótico, generado por diversos agentes medioambientales (deshidratación, salinidad, frío y congelamiento) (Bray, 1993; Barker *et al.*, 1988; Galau *et al.*, 1986). Durante el desarrollo embrionario y en la gran mayoría de los casos reportados por diferentes tipos de estrés mediambiental, la inducción de los genes *lea* está mediada por ABA. Esta fitohormona es capaz de inducir precozmente la expresión de dichos genes en embriones inmaduros o en tejidos vegetativos no estresados cuando se aplica exógenamente (revisado en Dure III, 1993). Las proteínas LEA son proteínas altamente hidrofílicas ricas en glicina y en aminoácidos cargados que se caracterizan por no tener una estructura globular y ser, por lo tanto, resistentes a la coagulación por efecto de las altas temperaturas (revisado en Dure III, 1993). Las proteínas LEA se agrupan en varias familias o grupos de acuerdo a la homología en la secuencia de aminoácidos y fueron descritas primeramente por Dure en algodón (Colmenero-Flores *et al.*, 1997; Ingram y Bartels, 1996).

**Proteínas LEA del grupo 1 (familia D-19).** Son proteínas altamente homólogas entre sí (alrededor de 65% de identidad y 80% de similitud) y de bajo peso molecular (90-110 aminoácidos). Son muy ricas en glicinas (16-21%), que están distribuidas a lo largo de toda la proteína, lo que favorece que adopten una estructura aleatoria ("random coil") en la mayor parte de su extensión. Para una proteína LEA de este grupo, la proteína *Em* de trigo, se han determinado las propiedades hidrodinámicas, confirmándose que un 70% de la proteína es de estructura aleatoria y por tanto, es altamente hidratable (McCubbin y Kay, 1985).

**Proteínas LEA del grupo 2 (familia D-11).** Son conocidas como dehidrinas también son muy hidrofílicas, presentan tamaños muy variables (14-150 kDa) y poseen diversos motivos característicos o hélices anfipáticas, representados variablemente entre los distintos componentes de la familia (revisado en Close *et al.*, 1993). Esta familia es la mejor caracterizada a la fecha. Existe evidencia que sugiere que son proteínas que se unen a lípidos (Ismail *et al.*, 1999). Representan cerca del 0.5% de la proteína total soluble de un embrión.

**Proteínas LEA del grupo 3 (familia D-7).** Se caracterizan principalmente por la presencia de 11-meros conservados y repetidos en tándem en un número variable de veces (entre 5 y 13). Esto hace que los miembros de esta familia tengan tamaños muy variables. Como en el caso de las dehidrinas, estos motivos están muy conservados y constituyen  $\alpha$ -hélices anfipáticas. Estudios de predicción de estructura concluyeron que dos 11-meros pueden dimerizar en una estructura helicoidal dextrógira. Se encuentran también uniformemente distribuidos en embriones de algodón en una concentración estimada de 0.34 mM, lo que supone el 4% de la proteína citosólica no organelar (revisado en Dure III, 1993).

**Proteínas LEA del grupo 4 (familia D-113).** Estas proteínas poseen un rango muy variable de tamaño (88-175 aminoácidos), son ricas en glicinas y treoninas y, a diferencia de las otras familias, son muy ricas en alaninas (11-20%). Según las predicciones, poseen siempre un dominio conservado de unos 60-80 aminoácidos con estructura prácticamente ininterrumpida en  $\alpha$ -hélice. El resto de la proteína varía en tamaño y su secuencia está poco conservada. En embriones de algodón esta proteína se encontró distribuida homogéneamente por todas las células en una concentración 0.3 mM (revisado en Dure III, 1993).

**Proteínas LEA del grupo 5.** Dentro de este grupo se hallan las denominadas LEAs atípicas que no pertenecen a ninguna de las familias citadas y no presentan el grado de hidrofiliidad generalizado que predomina en las ya descritas. Estas proteínas tampoco contienen la composición de aminoácidos que caracteriza a las LEAs hidrofílicas. Podríamos pensar que son proteínas de embriogénesis tardía que cumplen funciones diferentes a las LEAs hidrofílicas. Dentro de este grupo están las proteínas LEA5 y LEA14 de algodón, cuyos homólogos se han encontrado en otras especies. La expresión particular de estas LEAs en hojas maduras y sus dominios hidrofóbicos podrían estar relacionados con la protección de los tilacoides cloroplásticos durante el estrés.

**Proteínas LEA del grupo 6.** Fueron recientemente descritas e incluye a la proteína *Pvlea-18* de frijol y proteínas relacionadas de tabaco, tomate, soya, chícharo, maíz y *Arabidopsis* que fueron detectadas con un anticuerpo dirigido contra la proteína *Pvlea-18* (Colmenero-Flores *et al.*, 1999). Estas proteínas no muestran una homología significativa con las proteínas LEA de los grupos conocidos, de ahí que fueron incluidas en un nuevo grupo. (Colmenero-Flores *et al.*, 1997).

Se ha propuesto que las proteínas LEA protegen proteínas y membranas del daño debido a la pérdida de agua. El agua, como resultado de su constante dieléctrica, mantiene *in vivo* la estructura de proteínas y fosfolípidos y es posible que proteínas tales como las LEA D-11 y D-13, las cuales forman una estructura en "random coil", sustituyan el agua y mantengan la estructura de proteínas y membranas en ausencia del ésta. Para proteínas tales como la D-29, que pueden formar hélices anfífilicas se ha propuesto que puedan actuar como trampas de iones, secuestrando iones que están concentrados durante la desecación (Baker *et al.*, 1988). Aunque estas funciones no se han probado, existe evidencia circunstancial que sugiere su papel como protectoras en diferentes tipos de estrés. Más recientemente se ha obtenido evidencia directa del papel de, al menos, algunas de estas proteínas en la tolerancia a la sequía como es el caso de la Em de trigo, una proteína altamente hidrofílica, perteneciente al grupo 1, la cual fue sobre expresada en levadura y confirió resistencia contra diferentes tipos de estrés osmótico (Swire-Clark y Marcotte, 1999). Otro ejemplo es el de la proteína LEA del grupo 3, la HVA1 de cebada, que al ser sobre expresada en plantas de arroz confiere resistencia a estrés hídrico y salino (Xu *et al.*, 1996). Esta misma proteína al ser expresada en levadura confiere resistencia a estrés salino y a congelamiento (Zhang *et al.*, 2000). Otras dos proteínas fueron expresadas en levadura, la LE25 de tomate, perteneciente grupo 4, que confiere resistencia a estrés salino y por frío (Imai *et al.*, 1995) y la LE4 perteneciente al grupo 2, que confiere resistencia estrés salino y a congelamiento (Zhang *et al.*, 2000). Los datos obtenidos a partir de la sobre-expresión de estas proteínas apoyan la hipótesis de que diferentes proteínas LEA juegan un papel distintivo en la protección contra la deshidratación celular.

Aún cuando la mayoría de los genes *lea* se expresan en plantas sometidas a diferentes condiciones de estrés, se ha encontrado que algunos genes *lea* se expresan en diferentes órganos vegetativos durante el desarrollo normal de las plantas (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1993; Iwasaki *et al.*, 1995; Rouse *et al.*, 1996; Colmenero-Flores *et al.*, 1999). Su función en estas condiciones se desconoce.

## ACÍDO ABSCISICO Y SU RELACION CON ESTRES.

### Generalidades.

La fitohormona ABA es sintetizada a partir del precursor carotenoide C<sub>40</sub>. La primera enzima relacionada directamente con su síntesis es la 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa, la cual está localizada en los plástidos y rompe un precursor epoxicarotenoide para formar xantosina. Posteriormente, la xantosina es convertida a ABA por dos enzimas citosólicas vía aldehído abscísico (Cutler y Krochko, 1999). Además de esta vía, hay evidencia que sugiere la existencia de al menos otra vía alternativa menor (Tabaeizadeh, 1998). ABA regula dos procesos básicos para el desarrollo de las plantas; uno es la maduración y germinación de la semilla, donde está involucrado en los procesos de adquisición de la dormancia, acumulación de reservas nutritivas y adquisición de la tolerancia a desecación (Busk y Pagés, 1998; Leung y Giraudat, 1998). De otro lado, está involucrado en el proceso de adaptación de la planta a diferentes tipos de estrés medioambiental como el frío, la salinidad y la deshidratación. Se ha comprobado que durante estos estreses los niveles de ABA se incrementan en tejidos vegetativos. Esta relación llevó a proponer que ABA es uno de los mediadores de dichas respuestas (Galau *et al.*, 1986; Zeevaart y Creelmen, 1988; Bray, 1991).

En muchos casos, las mutantes *aba* (con reducidos niveles de ABA endógeno) y *abi* (insensibles a ABA) han sido usadas para apoyar la hipótesis de que el ABA endógeno regula la expresión génica (Chandler y Robertson, 1994). La mayoría de estas mutantes muestran un excesiva pérdida de agua debido a los defectos en la regulación estomatal, la cual lleva a un incremento en la tendencia a marchitez. Igualmente, genes que se regulan a través de ABA presentan en estas mutantes niveles muy bajos de expresión durante las diferentes condiciones de estrés y durante embriogénesis (Giraudat *et al.*, 1994).

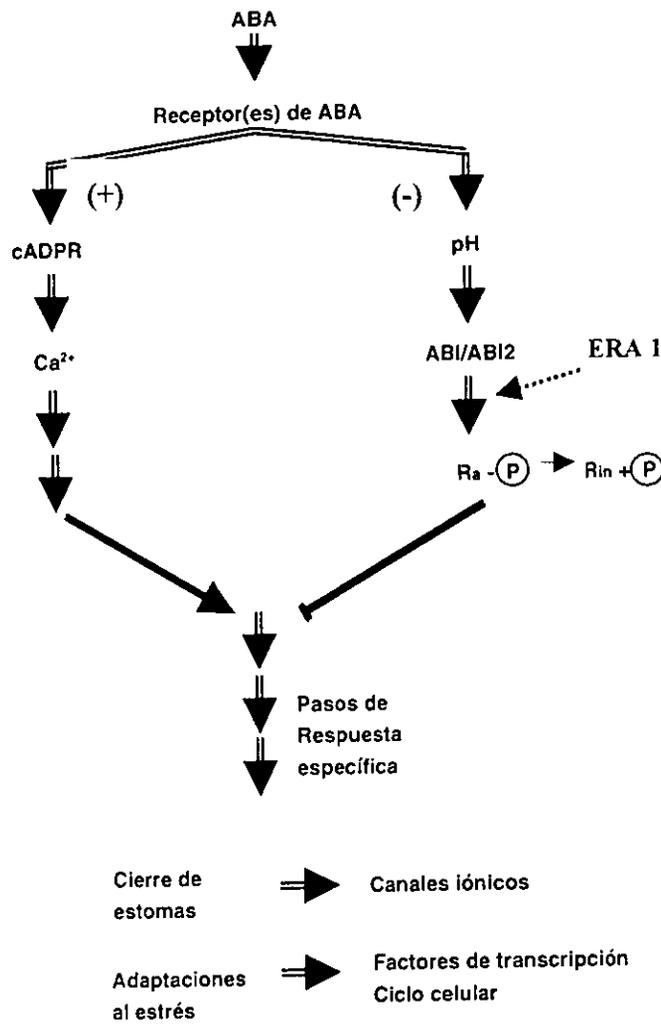
No se conoce el mecanismo por el cual ABA es reconocido por la célula vegetal, aunque hay evidencia de que puede ser reconocido dentro y fuera de ésta. Los datos sobre la respuesta de genes frente a análogos estructurales de ABA indican que hay múltiples receptores para ABA (revisado en Bray, 1997). Sitios de unión específicos para ABA fueron detectados en preparaciones de membrana de células en cultivo de *Arabidopsis* y arroz (Pedron *et al.*, 1998; Schultz y Quatrano, 1997). Respecto a la vía de transducción de señales desencadenada por ABA, se han identificado dos proteínas fosfatasa (PP2Cs), como la ABI1 y la ABI2 que se han colocado en la parte superior de la vía de transducción. Estas actúan

paralelamente a la vía mediada por la adenosin 5'-difosfato ribosa cíclica (cADPR) y el  $\text{Ca}^{++}$  (Himmelbach *et al.*, 1998). Se ha sugerido que las fosfatasas (PP2Cs) son parte de un mecanismo de control negativo ejercido por un represor el cual ejerce su control negativo en forma fosforilada y se inactiva al ser desfosforilado por las fosfatasas. En este contexto, la activación de las fosfatasas (PP2Cs), por un incremento en el pH inducido por ABA, lleva a la inactivación del represor y, por tanto, promueve la señalización de la vía de cADPR (Figura 1). Finalmente, los blancos de la vía de la transducción de señales involucrados en las respuestas adaptativas mediadas por ABA podrían incluir canales iónicos en la respuesta estomatal, reguladores transcripcionales y algunos componentes de la maquinaria del ciclo celular (Himmelbach *et al.*, 1998). Este modelo de la señalización de ABA se ha complementado con la identificación de la farnesiltransferasa ERA1, como un regulador negativo de la inhibición de la germinación inducida por ABA en *Arabidopsis*. La mutación *era1* suprime el fenotipo ABA-insensible de *abi1* y *abi2*, tanto en la respuesta a germinación como en el cierre de estomas, indicando que la acción de ERA1 está hacia abajo o es paralela a la vía de señales en la cual está involucrada la PP2C.

### **Aba como regulador de la expresion de genes durante estrés.**

Se ha determinado que una parte importante de la respuesta fisiológica a ABA se da a través de la expresión génica *de novo* (Bohnert y Jensen, 1996). Muchos genes que se expresan durante la fase tardía de desarrollo del embrión pueden ser inducidos por ABA exógeno en embriones y tejido vegetativo (Mundy y Chua, 1988). También, se ha determinado que los niveles endógenos de ABA se incrementan bajo diferentes condiciones de estrés, incluido el déficit hídrico. Estos datos junto con los de la caracterización de las mutantes deficientes en ABA de *A. thaliana* y de maíz, apoyan la participación del ABA endógeno en la regulación de la expresión de genes durante estrés.

Los genes inducidos durante estrés a través de ABA pueden dividirse en dos grupos. Están los que se inducen por ABA y cuya expresión es independiente de la síntesis de proteínas; es decir, donde no se requiere síntesis de proteínas *de novo* para su inducción. De otro lado, están los genes inducidos por ABA de una manera dependiente de la síntesis *de novo* de proteínas (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996) (Figura 2). La disección funcional de los promotores de los genes que responden a ABA, basada principalmente en sistemas de expresión transitoria, ha



**Figura 1.** Modelo general de la vía de señalización que media la respuesta inducida por ABA. La unión de ABA a un receptor(es) específico resulta en la generación de cADPR y a la vez en un incremento del pH citosólico. Seguidamente, la cADPR induce la liberación de Ca<sup>2+</sup> en el citosol a través de canales sensibles a rianodina. El Ca<sup>2+</sup> se libera posiblemente a partir de almacenamientos internos. La cADPR y el Ca<sup>2+</sup> son parte de una rama reguladora positiva de una vía de señalización bifurcada de ABA, mientras el pH y las PP2Cs como la ABI1 y la ABI2 controlan asas regulatorias negativas, asumiendo que proporcionan el Ca<sup>2+</sup> necesario para la respuesta a ABA. Después de la activación de ABI1 y ABI2 por la alcalinización del citosol, un represor fosforilado (R<sub>a</sub>) de la transferencia de señal de ABA es defosforilado generando una forma inactiva (R<sub>in</sub>). La acción de las PP2Cs, deficientes enzimáticamente, *abi1* y *abi2*, podría explicarse en este modelo por unión al sustrato R<sub>a</sub> que previene la defosforilación del represor. El Ca<sup>2+</sup> liberado propaga la señal en ausencia de R<sub>a</sub> a blancos de respuesta específicos en varios pasos posteriores no caracterizados, que involucran eventos de fosforilación reversible. Tales blancos son canales iónicos

específicos, factores de transcripción, así como la maquinaria del ciclo celular para inducir el cierre de estomas. Igualmente incluyen respuestas adaptativas a estrés e inhibición del crecimiento, respectivamente Modelo tomado de Grill y Himmelbach (1998).

permitido la identificación de varios elementos en *cis* involucrados en la expresión de genes por ABA (Tabla 1)(revisado en Busk y Pagés, 1998 y Leung y Giraudat, 1998).

La caracterización de los promotores de los genes inducibles por ABA, *Em* de trigo y *rab16A* de arroz, mostró que un elemento conocido como ABRE (por abscisic acid response element) es importante para la transcripción dependiente de ABA (Guiltinan *et al.*, 1990). Actualmente, más de 20 elementos tipo ABRE funcionales han sido hallados en promotores de genes que responden a ABA. El elemento es definido como una secuencia de 8 – 10 pares de bases con una secuencia ACGT, que corresponde al núcleo o centro de una caja G. Las secuencias que flanquean el núcleo de ACGT son importantes para el funcionamiento *in vivo* de este elemento. Estudios de expresión indican que la secuencia (C/T)ACGTGGC es un ABRE fuerte; sin embargo, otras secuencias son igualmente funcionales (Busk y Pagés, 1998). En plantas se han clonado varios factores de transcripción con dominios básicos, tipo cremalleras de leucina (bZip). También la proteína bZip específica de embrión puede unirse a ABRE *in vivo*.

El ABRE no es el único elemento que tiene un núcleo de ACGT. Los elementos ACGT son hallados en muchos promotores y median la inducción por luz, anaerobiosis, luz UV y ácido cumárico. Por lo tanto, es claro que además del núcleo ACGT otras factores son importantes para determinar su especificidad. Por esto, no todas las secuencias que tienen un núcleo de ACGT funcionan como ABRE, aunque estén en un promotor de un gen inducible por ABA. Así, el elemento ABRE es una secuencia que contiene un ACGT y que está definido más por su función, ya que las secuencias que lo flanquean, no muestran consenso (Busk y Pagés, 1998).

Para los genes *HVA1* y *HVA22* se encontró que además de los elementos que contienen núcleos de ACGT se requieren secuencias adicionales denominadas CE (“coupling elements”) para mediar la inducción de estos genes en respuesta a ABA (Shen *et al.*, 1996). A partir del análisis de estos promotores, se determinó el complejo mínimo de respuesta a ABA (ABRC) que consiste de un “coupling element” y un ABRE capaces de conferir inducción por ABA a un promotor mínimo (Vasil *et al.*, 1995). Las secuencias de los elementos CE son diferentes pero presentan un alto contenido de citocinas y guaninas. Los ABRCs también pueden estar compuestos por dos cajas G, como sucede en el promotor del gen *Em* de trigo. En contraste,

otros ABRCs consisten de un ABRE y de un elemento en *cis* no relacionado a la caja G (revisado en Busk y Pagés, 1998; Leung y Giraudat, 1998). Recientemente, en el caso del gen *Cat1* se ha encontrado que un solo elemento tipo ABRE es suficiente para conferir expresión dependiente de ABA (Guan *et al.*, 2000).

Dentro de los elementos que median la respuesta a ABA se han descrito elementos tipo Myb y Myc en el gen *rd22* de *A. thaliana*. Puesto que estos elementos median la respuesta del gen *rd22* a estrés hídrico y parecen regular la inducción de una manera dependiente de la síntesis de proteínas, se ha sugerido que Myb y Myc pueden regular genes cuya inducción por ABA depende de la síntesis de proteínas, lo cual no sucede en la regulación vía ABRE (Iwasaki *et al.*, 1995; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Abe *et al.*, 1997). Sin embargo, los genes *rab16A* y *OsEm* que están regulados a través de ABRE, requieren síntesis de proteínas para su inducción y esta regulación podría depender de la síntesis *de novo* de una proteína tipo cremallera de leucina (bZip).

Otros elementos en *cis* involucrados en la inducción de la transcripción por ABA incluyen el sph o ASCE que media la inducción del gen C1 en el endospermo de maíz (Hattori *et al.*, 1992), un elemento del promotor del gen *CDeT274-45* de *C. plantagineum* y el motivo TT del gen *DC3* de zanahoria (Kim *et al.*, 1997), este último motivo es considerado como un ABRE imperfecto.

## **EXPRESION GENETICA INDEPENDIENTE DE ABA DURANTE ESTRES**

Aunque la expresión de muchos genes que se inducen durante estrés hídrico se incrementa considerablemente por aplicaciones de ABA, no hay una correlación consistente entre los niveles de mRNA y los niveles de ABA bajo estas condiciones. Estas evidencias sugieren fuertemente que la expresión de algunos genes durante deshidratación es total o parcialmente independiente de ABA (Chandler y Robertson, 1994). Se ha planteado que ésto podría sugerir la presencia de factores adicionales involucrados en la modulación de algunos genes durante estrés. Algunos estudios que involucran aplicaciones exógenas de ABA indican que los niveles de expresión de genes inducidos por ABA pueden ser incrementados por factores adicionales presentes solamente en plantas estresadas (Chandler y Robertson, 1994). De esta manera, las plantas no estresadas carecen de los elementos capaces de interactuar con ABA y por tanto no alcanzan los niveles adecuados de expresión presentes bajo la condición de estrés. Estos factores, presentes en las plantas estresadas, podrían

interactuar sinérgicamente con los factores inducidos por ABA para generar una respuesta mayor.

**Tabla 1.** Elementos en *cis* de los promotores importantes para la respuesta a ABA o sequía.

<b>Gen</b>	<b>Elemento</b>	<b>Secuencia <sup>a</sup></b>
<i>Rab16A</i> ( <i>Oryza sativa</i> )	ABRE (motivo 1)	GT <b>ACGTGG</b> CGC
<i>EM</i> ( <i>Triticum aestivum</i> )	Em1A	GGAC <b>ACGTGG</b> C
Hex3 (tetramero sintético) (derivado de <i>N. tabacum</i> )		GGT <b>GACGTGG</b> C
<i>Rab28</i> ( <i>Zea mays</i> )	ABRE	CC <b>ACGTGG</b>
<i>Cat1</i> ( <i>Zea mays</i> )		CCAAGAAGTC- CAC <b>GTGGAGGTGGAAGAG</b>
<i>HVA22</i> ( <i>Hordeum vulgare</i> )	ABRE	GCC <b>ACGTACA</b>
<i>HVA22</i> ( <i>Hordeum vulgare</i> )	CE1	TGCC <b>ACCGG</b>
<i>CdeT27-45</i> ( <i>Craterostigma plantagineum</i> )		AAGCCCAAATTTCA- CAGCCCGATA <b>ACCG</b>
<i>rd22</i> ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	Myb	YAAC(G/T)G
<i>rd22</i> ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	Myc	CANNTG
<i>rd29</i> ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	DRE	TACCGACAT

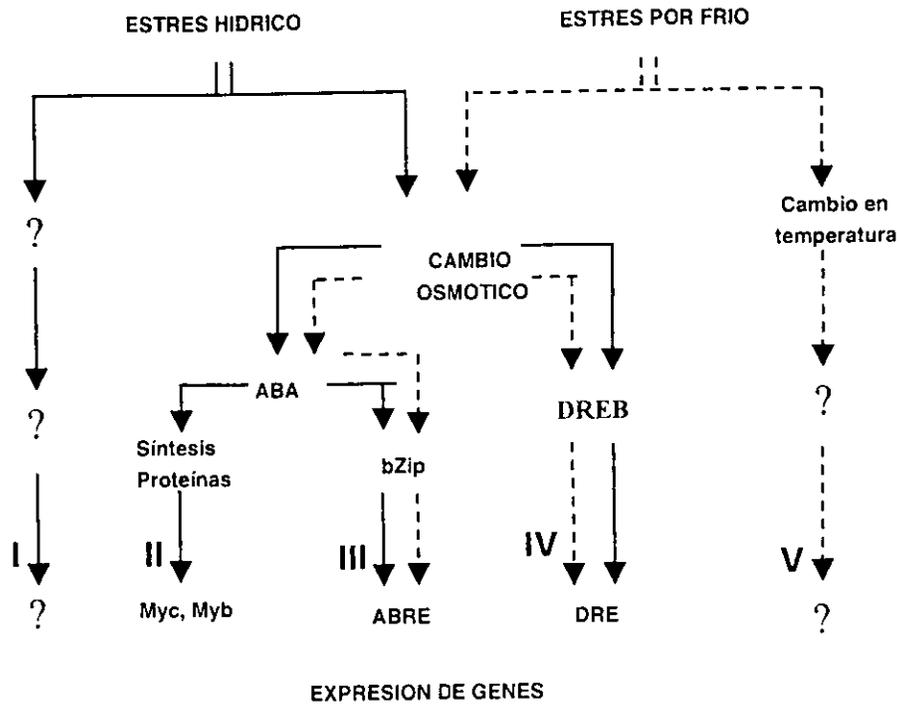
<sup>a</sup> El motivo del núcleo de la caja G se presenta en negritas.

De otro lado, algunos genes son inducidos por ABA, pero su expresión durante deshidratación es independiente de ABA. Por ejemplo el gen de la kinasa *RPK1*, aislado de *A. thaliana*, es inducido tanto por deshidratación, como por tratamiento con ABA (Hong *et al.*, 1997). Al examinar la respuesta a deshidratación de este gen en las mutantes de *A. thaliana* deficientes en la síntesis de ABA (*aba-1*) y en las mutantes insensibles (*abi-1*, *abi-2* y *abi-3*), se encontraron los mismos niveles de mRNA respecto a las plantas control.

Analizando el promotor del gen *rd29A* de *A. thaliana* (Yamaguchi-Shinozaki, 1994) se identificó un elemento nuevo en *cis* de 9 pares de bases, de respuesta a

deshidratación (DRE) (Tabla 1). Este elemento DRE es necesario para la inducción por estrés del gen *rd29A*, aun en ausencia de niveles elevados de ABA. La misma secuencia ha sido hallada en promotores de otros genes que responden a ABA (Busk *et al.*, 1997) y en genes regulados por estrés osmótico y baja temperatura en *Arabidopsis* (Iwasaki *et al.*, 1997). Estos genes se inducen por el respectivo estrés en las mutantes de *A. thaliana aba* o *abi*, lo cual sugiere que la expresión de estos genes bajo estrés no requiere de ABA, aunque respondan a tratamientos con ABA. Estas observaciones prueban que la habilidad de un gen para responder a ABA, bajo condiciones óptimas de crecimiento, no implica necesariamente que la respuesta de este gen bajo estrés esté regulada a través de ABA. Es posible que ABA participe como modulador de la expresión de este gen en otras condiciones de estrés o de desarrollo. Dos factores de transcripción, que interactúan con la secuencia DRE de 9 pares de bases, han sido detectados en extractos nucleares de plantas de *Arabidopsis* no tratadas y deshidratadas (Nakashima *et al.*, 2000).

Con base en estos datos Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki (1996) plantean la existencia de al menos cuatro vías independientes de regulación genética durante estrés hídrico: dos dependientes de ABA (una dependiente de la síntesis de proteínas y la otra independiente de la síntesis de proteínas) y dos independientes de ABA, a través de los elementos tipo DRE/CTR (Yamaguchi-Shinozaki, 1994). Recientemente se ha demostrado que la vía independiente para frío también está regulada por elementos tipo DRE/CTR que responden exclusivamente a frío (Nakashima *et al.*, 2000).



**Figura 2.** Vías de señales de transducción entre un estrés hídrico o estrés por frío y la expresión génica. Existen al menos evidencias de 5 vías de señales de transducción (I-V): dos dependientes de ABA (II y III) y tres que son independientes de ABA (I, IV y V). La síntesis de proteínas se requiere en una de las vías dependientes de ABA (II). Hay al menos 4 vías de señalización (I a IV) que funcionan bajo condiciones de estrés hídrico (indicadas por líneas sólidas) y tres vías (III a V) que funcionan bajo estrés por frío (indicadas por líneas interrumpidas). El elemento ABRE está involucrado en una de las vías dependientes de ABA (III) y el elemento DRE en una de las vías independientes de ABA (IV) (Modificado de Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996).

## ANTECEDENTES DEL TRABAJO

Este trabajo empezó con la construcción de una biblioteca de cDNA a partir de mRNA de plantas de frijol sometidas a tratamiento con ABA y a deshidratación. Esta biblioteca fue substraída con cADN obtenido a partir de plantas crecidas en condiciones óptimas de irrigación (control). Dicho banco se enriqueció en clonas de expresión específica por sequía y/o ABA (Covarrubias y Garcarrubio, 1994), mediante hibridación diferencial de esta biblioteca contra sondas radiactivas de la primera cadena de cDNA (cDNA-1c) obtenida de plantas sometidas a sequía o a ABA respecto a sondas de cDNA-1c obtenidas de plantas control. De esta hibridación se seleccionaron 39 clones de cDNA correspondientes a genes con probable expresión diferencial por sequía, ABA o por ambas condiciones (Colmenero-Flores *et al.*, 1997).

El análisis de las clonas seleccionadas reveló que una de ellas codificaba para una proteína LEA, a la cual se le denominó PvLEA-18. Puesto que su secuencia de aminoácidos no mostró similitud con ninguna proteína LEA reportada fue clasificada como parte de una nueva familia de proteínas LEA. Esta proteína se caracteriza por ser altamente hidrofílica y presentar una estructura en su mayoría como "random coil". Tanto el gen *Pvlea-18* como la proteína se expresan en semillas durante la fase tardía de la embriogénesis y en tejido vegetativo en respuesta a ABA y a deshidratación (Colmenero-Flores *et al.*, 1997).

Además se encontró que tanto el transcrito como la proteína se acumulan en diferentes órganos, no sólo durante estrés hídrico sino en plantas bien irrigadas. Esta acumulación ocurre en las regiones de la planta con los potenciales hídricos y osmóticos más negativos, tales como la región de elongación del hipocotilo. Este fenómeno no había sido previamente descrito para ninguna proteína LEA. Estudios de inmunolocalización mostraron que la proteína PvLEA-18 está presente en el núcleo y citoplasma de todos los tipos celulares, con una alta acumulación en la epidermis y en los tejidos del cilindro vascular, particularmente en células del protoxilema y en tejidos meristemáticos de la raíz (Colmenero-Flores *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos respecto a la expresión de la proteína y el gen *Pvlea-18* llevaron a plantear la pregunta de cómo está regulada la expresión de este gen durante el desarrollo y durante condiciones de estrés. Puesto que se sabe que algunos genes están regulados no solo por secuencias ubicadas en la región 5', sino

que para alcanzar un nivel óptimo de expresión requieren de secuencias ubicadas en la región 3', es interesante determinar, el papel de la región 3' en la regulación de éste gen, tanto durante desarrollo, como en respuesta a ABA y a deshidratación. Igualmente, dado que se ha demostrado que los genes que se expresan durante diferentes tipos de estreses dependen de dos vías de regulación: una dependiente de ABA y otra independiente de ABA, es importante determinar por cual de estas vías es regulado el gen *Pvlea-18* durante deshidratación. Finalmente, debido a que se ha observado la expresión de este gen durante desarrollo es interesante determinar los patrones de expresión del gen durante desarrollo, así como que posibles factores participan en su regulación.

## HIPOTESIS

Puesto que el gen *Pvlea-18* responde a aplicaciones de ABA, durante deshidratación se regula a través de una vía dependiente de ABA, mientras que durante el desarrollo se regula por una vía independiente de ABA.

## OBJETIVO GENERAL

Analizar la regulación de la expresión del gen *Pvlea-18* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* y en un sistema de expresión transitoria utilizando una fusión transcripcional de la región promotora con un gen reportero.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1). Analizar la expresión diferencial del gen *Pvlea-18* durante el desarrollo en plantas transgénicas de *Arabidopsis* a nivel de órganos y tejidos.
- 2). Analizar la expresión del gen *Pvlea-18* en respuesta a ABA y a cambios en el potencial osmótico.
- 3). Explorar la participación de algunas hormonas involucradas en el crecimiento, en la regulación de la expresión del gen *Pvlea-18* durante el desarrollo normal en plantas transgénicas de *Arabidopsis*.
- 4). Identificar elementos en *cis* presentes en la región promotora del gen *Pvlea-18* que puedan regular su respuesta a ABA y a cambios en el potencial osmótico y/o hídrico utilizando un sistema de expresión transitoria.

**Downstream DNA sequences are required to modulate *Pvlea-18* gene  
expression in response to dehydration**

**Liz P. Moreno-Fonseca and Alejandra A. Covarrubias\***

**Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62210, México**

\* Corresponding author

**Running title:**

**Keywords:** *lea* genes, stress response, ABA-independent dehydration response, etiolated growth, common bean.

Corresponding author: **Alejandra A. Covarrubias, Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62210, México.**

**E-mail:** [crobles@ibt.unam.mx](mailto:crobles@ibt.unam.mx)

**Tel:** (52)(5)622-7643; **Fax:** (52)(73)13 9988

**Abbreviations:**

**ABA** = Abscisic Acid ; **ABRE** = ABA Response Element; **ABRC** = ABA-Responsive Complexes; **6-BAP** = 6-Benzyl Aminopurine; **CE** = Coupling Element; **dag** = days after germination; **DRE** = Drought Responsive Element; **FW** = Fresh Weight; **GA** = Giberellic Acid; **GUS** =  $\beta$ -Glucuronidase; **GM** = Germination Medium; **IAA** = Indolacetic Acid; **LEA** = Late Embryogenesis Abundant; **MS** = Murashige-Skoog; **nos** = nopaline synthase ; **X-GLUC** = 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide

**The nucleotide sequence data reported will appear in the GeneBank Database under the accession number AF240774**

## Abstract

We have previously shown that mRNA and protein encoded by the *Pvlea-18* gene from *Phaseolus vulgaris* L., a member of a new family of Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins, accumulate in dark grown bean seedlings not only in response to water deficit but also during optimal irrigation (Colmenero-Flores *et al.*, 1997). In this work, we studied the *Pvlea-18* gene transcriptional regulation by using transgenic *Arabidopsis thaliana* plants containing a chimeric gene consisting of the *Pvlea-18* promoter region and the 3'-nos terminator fused to the *GUS* gene coding region. We demonstrate that the chimeric gene is active during *Arabidopsis* normal development under well-irrigated conditions, and that it is further induced in response to ABA and dehydration treatments. Replacing the 3'-nos terminator with the *Pvlea-18* 3'-region led to an additional increase in expression during development and in response to dehydration, but not in response to exogenous ABA. These results reveal an enhancer effect of the *Pvlea-18* 3'-region, which showed to be higher specifically under dehydration. The small decrease in the *Pvlea-18* promoter expression observed when transgenic plants treated with fluridone (an ABA biosynthesis inhibitor) were subjected to dehydration suggests that the *Pvlea-18* gene dehydration response is predominantly ABA-independent. Finally, we present evidence indicating that *Pvlea-18* gene expression is negatively regulated during etiolated growth, particularly in roots, in contrast to the expression pattern observed during normal development.

## Introduction

Water deficit is one of the most common environmental stresses experienced by soil plants. During periods of water limitation, plants undergo a number of physiological changes, including alterations in gene expression (Skriver and Mundy, 1990; Bray, 1993). Some of the genes whose expression is induced in vegetative organs during this stress condition are those encoding the so-called Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins. These proteins accumulate to high levels during the last stage of seed maturation, when natural desiccation of the seed tissues takes place (Galau *et al.*, 1986; Baker *et al.*, 1988; Bray 1993). The expression of some *lea* genes has been shown to be regulated by abscisic acid (ABA), a phytohormone whose endogenous levels increase not only during late embryogenesis but also during vegetative growth upon conditions of water deficit (Busk and Pagès, 1998; Leung and Girudat, 1998). LEA proteins have been grouped into at least six families on the basis of sequence similarity (Ingram and Bartels, 1996; Colmenero-Flores *et al.*, 1997). Although significant similarity has not been detected between the members of the different classes, an unifying and outstanding feature of these proteins is their high hydrophilicity and high percentage of glycine residues (Baker *et al.*, 1988; Dure, 1993). LEA protein families have been identified in a wide range of plant species, to the extent that they can be considered ubiquitous throughout the plant kingdom (Ingram and Bartels, 1996; Close, 1997). Although a precise function has not been demonstrated for any LEA protein, circumstantial and indirect evidence indicate that they play a role as protectors of cellular structures and proteins during drought, salt and freezing stress (Ingram and Bartels, 1996; Close, 1997; Xu *et al.*, 1996; Swire-Clark and Marcotte, 1999; Imai *et al.*, 1996).

ABA plays a major role in seed maturation and germination, as well as in the response to environmental stresses involving water loss (Galau *et al.*, 1986; Zeevaart and Creelman, 1988; Bray, 1991). ABA is one of the mediators of the plant stress response to water deficit and a number of components of its signal transduction pathway have been identified (see Leung and Giraudat, 1998 for review). An important part of the ABA response is regulated at the level of transcription, and the analysis of ABA-responsive promoters has revealed a diversity of potential *cis*-acting regulatory elements (Busk and Pagès, 1998; Leung and Giraudat, 1998). One of the best characterized is the ABA-response-element (ABRE) which contains a G-box ACGT core motif (Guiltinan *et al.*, 1990). Additional *cis*-acting elements have been identified such as the Sph element (Hattori *et al.*, 1992) and the so-called "coupling element" (CE), which appear to be necessary for ABA-mediated induction (Shen *et al.*, 1996). One of the promoter units designated ABRC (ABA-Responsive Complexes), necessary and sufficient for ABA

induction of gene expression, consists of at least two ABA *cis*-elements such as those mentioned above (Vasil *et al.*, 1995). Recently, in the case of the *Cat1* gene, it has been shown that only one ABRE is sufficient for ABA-dependent gene expression (Guan *et al.*, 2000). Conserved motifs for DNA binding proteins such as MYC and MYB have also been involved in the expression of ABA-induced genes. In contrast to the ABA regulation via ABRE, the ABA-response mediated by MYC and MYB elements depends on protein synthesis (Iwasaki *et al.*, 1995; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Abe *et al.*, 1997).

It should be noted that although ABA treatment induces the expression of many stress genes, in some cases, ABA is not an essential mediator of stress responses (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Hong *et al.*, 1997). There are several ABA-independent pathways that have been identified in response to adverse environmental conditions. The dehydration response element (DRE) in *Arabidopsis* mediates transcription in response to desiccation, cold or high salt but not in response to ABA (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994; Busk and Pagès, 1998). Additionally, transcriptional factors that bind to some of these elements have been identified (Stockinger *et al.*, 1997).

Most of the information on the expression of *lea* genes comes from plants under stress conditions; however, some *lea* genes are expressed in different vegetative organs during the normal development of young seedlings (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1993; Iwasaki *et al.*, 1995; Rouse *et al.*, 1996). This is the case of the *Pvlea-18* gene from *Phaseolus vulgaris* L. whose transcript and protein levels increase not only in response to water deficit and ABA treatments, but is also developmentally regulated. The highest accumulation was detected in those regions with the most negative values of water and osmotic potentials, such as the growing region of hypocotyls. Moreover, it is located in the vascular cylinder and epidermal tissues (Colmenero-Flores *et al.*, 1999).

While the 5'*cis*-acting factors of drought responsive genes have been analyzed extensively, the role of 3'-regions during the dehydration response is unknown. In this study, we analyzed the *Pvlea-18* gene expression patterns during seedling normal development and in response to water deficit and ABA treatments in transgenic *Arabidopsis* plants, using *GUS*-transcriptional fusions containing both the 5'- and 3'-regulating regions of the *Pvlea-18* gene. Our results indicate that most of the *Pvlea-18* gene expression in response to dehydration is ABA-independent, and that DNA sequences downstream of the *Pvlea-18* gene are able to enhance its expression during seedling development and in the ABA-independent dehydration response. We also explored the expression patterns of the *Pvlea-18* gene during etiolated growth. Our

results suggest that, under these conditions, this gene is negatively regulated, particularly in roots, in contrast to the expression pattern observed during normal development.

## Materials and methods

### *Screening of the Genomic Library*

A common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genomic library, constructed in lambda-Dash II and kindly provided by H. Porta and M. Rocha (Instituto de Biotecnología-UNAM), was screened using the *Pvlea-18* complete cDNA as a probe (Colmenero-Flores *et al.*, 1997). From this screening a positive clone was isolated containing a 12 Kb genomic insert. Hybridization and washing conditions were performed at high stringency following the procedure described by Church and Gilbert (1984).

### *Subcloning and Sequencing of the Genomic Fragment*

Hybridization experiments using specific oligonucleotides allowed us to localize the complete *Pvlea-18* gene, including the promoter and the 3'-regions, in a *Bgl*II-*Eco*RI 6-Kb fragment of the genomic lambda insert. This DNA fragment was subcloned into pBluescript SK<sup>+</sup> (Stratagene). In order to obtain the nucleotide sequence of the *Pvlea-18* gene, this 6-Kb region was digested with *Bam*HI and the resulting fragments were further subcloned (Figure 1, A and B). Sequencing was performed using the Sequenase kit (United States Biochemical) and following the manufacturer instructions. The nucleotide sequence data will appear in the GeneBank Database under the accession number AF240774.

### *Plant Transformation*

The fragments containing the *Pvlea-18* gene promoter and the 3'-region, 2058 bp and 606 bp, respectively, were amplified using the Expand High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim) and the following oligonucleotides containing convenient restriction sites, which are showed in bold: 5'-ATCA**AAGCTT**CCCATATCCGTGGTCC-3' and 5'-CCA**ACTTTG**ACCCCTTCATTCATTCTCTT**CCTAGG**TCT-3' for the 5'-region, and 5'-CAAG**GAGCTC**CCTGAATTTACACCACCTCC-3' and 5'-CCTCAACGTTAC TACCTTACTCAAAC**CCTTAAG**TTAT-3' for the 3'-region. The amplified fragments were subcloned into the pKS<sup>+</sup> vector. Subsequently, the fragment corresponding to the promoter region of *Pvlea-18* was transcriptionally fused to the  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) reporter gene in the pBI121 plasmid vector (Clontech Laboratories, Inc.) with either the nopaline synthase transcriptional terminator (*nos*) (*Pvlea-18/GUS/nos*) or the 3'-region of the *Pvlea-18* gene (*Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'*) (Figure 1C). The resulting transcriptional fusion constructs, *Pvlea-18/GUS/nos* and *Pvlea-18/GUS/Pvlea-*

18-3', were independently transferred from *Escherichia coli* XL1-Blue into *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif by triparental mating using an *E. coli* strain containing plasmid pRK2013. Four-week-old *Arabidopsis thaliana* (Columbia ecotype) plants were transformed by infiltration with *A. tumefaciens* containing the constructs of interest, as described by Bechtold *et al.* (1993) and by Ye *et al.* (1999). Transgenic plants were selected in Murashige-Skoog (MS) medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with carbon and vitamins sources, and 100  $\mu$ g/ml kanamycin. They were grown in environmental controlled chambers at 24°C under a 16h light/8h dark cycle. T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> seeds were germinated in MS medium, supplemented with carbon and vitamins sources and 100  $\mu$ g/ml kanamycin, and homozygous lines were selected. Ten independent transformant lines were obtained for each chimeric gene.

#### *Genomic DNA Blot Analysis*

Genomic DNA from transgenic *Arabidopsis* T<sub>1</sub> plants was obtained accordingly to Dellaporta *et al.* (1983) and digested with *EcoRI* and *HindIII*, electrophoresed, and transferred onto nylon membranes (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham) (Sambrook *et al.*, 1989). Hybridizations were carried out using as probe the 2058 bp fragment containing the *Pv/ea-18* 5'-promoter region which was amplified by PCR as indicated above (see Fig. 1). Hybridizations and washes were performed at high stringency conditions according to Church and Gilbert (1984).

#### *Stress and Hormone Treatments*

*A. thaliana* (Columbia ecotype) plants were grown on germination medium (GM) agar plates (Valvekens *et al.*, 1988) at 24°C and 16h light/8h dark cycle for 3-4 weeks. In all experiments, plants were used just before bolting. *Arabidopsis* rosette plants were harvested from GM agar plates and dehydration was imposed by transferring them to a chamber at 24°C and 80% humidity, under dim light, until 30% of the fresh weight was lost. For ABA (Mixed synthetic isomers, Sigma-Aldrich) and giberellic acid (GA, Sigma-Aldrich) treatments, plants were treated with a 100  $\mu$ M final concentration of each hormone during 24 h under dim light (Iwasaki *et al.*, 1995; Jacobsen and Close, 1991). In the case of the 6-benzyl-aminopurine (6-BAP, ICN) treatment, a 10  $\mu$ M final concentration was applied for 12 h under dim light (Venglat and Sawhney, 1996). Whereas indolacetic acid (IAA, Sigma-Aldrich) was used at 4.5  $\mu$ M final concentration for 44 h in darkness (Takahashi *et al.*, 1995). In all cases, the phytohormones were applied by adding the corresponding solution to the solid growth medium and allowing it to diffuse

during the time indicated. At the end of the treatments, plants were processed for histochemical and fluorometrical quantification as described below.

#### *Fluridone Treatment*

The plants were grown in GM plates under the conditions described above and were subjected to fluridone treatment to inhibit ABA biosynthesis. To determine the optimal conditions for the fluridone treatment, plants were exposed to 1  $\mu\text{M}$  fluridone (98% analytical grade, Novartis, Mexico) for 24, 48, 72 and 96 h. The effect of fluridone was scored by phenotypical changes, by determination of endogenous ABA (Garcarrubio *et al.*, 1997), and by expression analysis of an *Arabidopsis lea* gene (*EM6*) which is induced by ABA and by dehydration (Wang *et al.*, 1999). Once the conditions for the fluridone treatment were established, plants were grown on GM agar plates for 3 weeks, and transferred to GM agar plates containing 1  $\mu\text{M}$  fluridone for 72 h. Subsequently, plants were subjected to dehydration as described above, and at the end of the treatment processed for histochemical and fluorometrical quantification.

#### *Histochemical and Fluorometrical Analysis of GUS activity*

For histochemical analysis, whole tissues or sections were incubated overnight in a solution containing 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-GLUC) (Research Organics, Inc.) and 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) at 37°C as previously described (Jefferson *et al.*, 1987). Fluorometrical analysis of GUS activity using the substrate, 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucuronide (Research Organics, Inc.) was carried out according to Jefferson *et al.* (1986) and was expressed as pmol of 4-methylumbelliferone per milligram of protein per minute. Protein concentration was determined by the Bradford method (Bradford, 1976). For microscopic analysis complete organs stained for GUS activity were embedded in LR white resin (Polyscience, Inc.), and then blocks were cut to generate 2-4  $\mu\text{m}$  sections and placed on slides.

#### *Light Treatments*

Transgenic seedlings were subjected to different light treatments as follows: (1) *Arabidopsis* seedlings were grown for 6 days under continuous red light, far-red light or blue light; (2) transgenic seedlings were germinated in the dark and after 5 days were exposed to white light (about 100  $\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) for 5 and 30 min, followed by darkness for 24 h; and (3) control plants were grown for 6 days with 16 h of light and 8 h of darkness cycles. The red and far red light sources consisted of fluorescent and incandescent bulbs providing 4-6  $\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$  (red) and 0.27-0.54  $\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$  (far red). The blue light source

consisted of a fluorescent bulb providing 1-2 mol cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>. After light treatments, plants were treated for histochemical and fluorometrical quantification. Transgenic *Arabidopsis* plants containing a *GUS* fusion with the promoter of the *CAB* gene (a nuclear gene known to be induced by light; Tobin and Silverthorne, 1985) were used as controls in these experiments. L. Herrera-Estrella (CINVESTAV-Irapuato) kindly provided these plants.

## Results

### *Structural characteristics of the Pvlea-18 gene.*

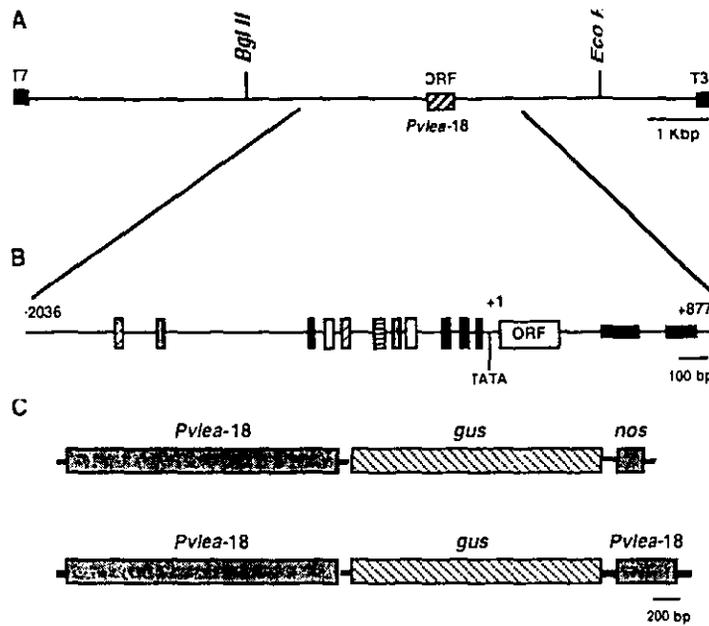
To characterize the *Pvlea-18* gene regulatory regions, a genomic clone was isolated, and the complete gene sequence determined as described in Materials and methods (Figure 1). Analysis of the genomic nucleotide sequence showed that the ORF is identical to the previously isolated cDNAs (Colmenero-Flores *et al.*, 1997), and that introns are not present in the *Pvlea-18* gene. Genomic hybridizations suggest that the *Pvlea-18* gene is present as a single copy in the *P. vulgaris* genome (data not shown).

Since the *Pvlea-18* transcript accumulates in response to ABA and dehydration treatments (Colmenero-Flores *et al.*, 1997), we examined the *Pvlea-18* 5'-upstream region for the presence of *cis*-acting elements involved in these responses. As shown in Figure 1 (panels B and D), the sequence analysis revealed several putative *cis*-acting elements: one ABRE at position -186 (Busk and Pagès, 1998); three G-box ACGT motifs at positions -73, -102 and -748 (Izawa *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 1996); two MYB recognition sites at positions -586 and -1485 (Biedenkapp *et al.*, 1988; Nakagoshi *et al.*, 1990), two MYC recognition sequences at position -401 and -1309 (Murre *et al.*, 1989) and one *as1* element at position -424 (Lam and Chua, 1991). In addition, general signals for eukaryotic gene expression were found, such as a TATA-motif and two putative CAAT-boxes, located at positions -353, and -641, respectively. Primer extension studies (data not shown) indicated that transcription starts at nucleotide in position +1, which defines a 5'-UTR of only 22 nucleotides (Figure 1D).

To investigate the effect of the 3'-region on the transcription of the *Pvlea-18* gene, we isolated and sequenced a 606 bp fragment downstream from the *Pvlea-18* ORF. From the analysis of the nucleotide sequence, two putative consensus polyadenylation signals that fulfill the characteristics described by Graber *et al.* (1999) were found between positions +415 to +494 and between positions +660 to +777 (Figure 1B and D)

### *Pvlea-18 gene expression is partially regulated by its 3'-region during dehydration.*

To study the transcriptional regulation of the *Pvlea-18* gene in response to water deficit as well as during development, two chimeric genes were constructed. In one, the *Pvlea-18* promoter region was transcriptionally fused to the *GUS* reporter gene with the *nos* 3'-terminator region (*Pvlea-18/GUS/nos*). In the other, the *nos* 3'-



**D**

```

-2036  CCGAATCCCAATCCCGTGGTCCACTATACACAGTGGGAAATCCTACTCATAACTCAGTGTGTAATAAGTATCTTTACTGCTGTAATAAAGTGGGAAACAAATTCGGAAAAATTTAGAT -1926
-1925  CAACAAATCAATTTAATTTTAAATTTATCACAGACGATAAATCATATTTTATTTGGATGGTAAAJAAGACGAAATAAATTCAGGTTACCTTTGATAGTGCATACTAAAGAT -1815
-1814  ACTCCAAACCCCTTAATTTTAAATTAACACATTTACTCTAACAAAACAAACACGCTGCTTTTTCCTTTTAAATTAACACCGGATCTCGGTTATGTTTATTAATTAAC -1764
-1763  ATTTATAATTTTTATTTTTTAAATGATGATTAATAAATATACAAAATTAAGAAATTAAGAAATAAATAATTTTATATAAAAAAATTTAATGACTTAATTTATAGTG -1593
-1592  TCTCTAATATTTTCTTATATGACACTGAAAGCACTATAGTTTAAAGATAAATTTTATCCTCTCGTAATTAATTAATAATTAACACTTGATGTAACATCTCAGTAACT -1482
-1481  ACTAAATCAATATTCATAAGATACACAAATATTAGATAATTAGTATCTTACGTTTAAAGTCTTTTAAATTAATAAATAAGTTCCTTAAAAAACAAATACTTTCCTATATAT -1371
-1370  ACACACATAAATATATATCTTCTCAACTTACTCTTGAAGAAAATTTCTGGCTACAGATCAACATGCTTTTATGTTAATACGATCATATGGATTAAAAAAAATAAACA -1260
-1259  AAAAACAACAACAACAACATGATGATTAATAGTCTTAAATTTAGCTAGATGCCAACATTAATTAATACTTCAAAATTTCTAATTCATGATGTTATTCAAAATCTC -1149
-1148  ATAAGATTATTTATAGGTTAAAGTTGAAAACAAGAGGATATATTTACTCATCGCTTTTTCATTCATTAATTAATTAACATATATTAATTTCTTTTATATGAAAT -1038
-1037  AGTCTTTATATAAGTCTCATCTTACTAAAGGTTTAAAGGCTGTGGCAGGCTTAAAJAATACATAGAGGGGAAATAAGTTGGAAATTAATAAGTCTGATTAATAAC -927
-926  AATAACTTAGGCTGTATATTTAGAAAATGGAAATCAGGTTTATATGTTTATCATATAGGATTCCTTCTACATTAAGAAAGAAAGAACTATGGCCAGTGCAGAGGC -816
-815  CCGTATCACTGTCTAGTGGCCAGTGGATTTCAACAACCTCGAGAGGTTATGAATATACATACAGTATACCTAACCTTGGTCAATTTATAAATGAAATATAGCGATCATATGCTGT -705
-704  GGTCTTTTCAGATCGGTAACTTCCAGACTGTCTTAAAGGCTGACTCTTCAAAAATTTGCCAATGGACATGGACACTTACTAGACTGCTCCCTTTTCTGATCT -594
-593  TAGTCTTCAACTATATAGAAATGGTCAAGCACTCTAAAGACATAAATATGGAAATAGCCACTTAAATCTGATTCCTAATGTCTTTCATTAATAGCTTAAANAACCA -483
-482  ATTTGGGTTTGTGTCCTCATATACTTAAGTGCAGATGAGAATGGCCTAGCCATCTGTGACGAATATGGGTTGGTTGAAACAGGTGAGTATTTTGGGAAAAGTTCTCAG -372
-371  AAAAGTCTTTAAATCCCAATGCATAGGCTTATATAGGTTGAATGCTGCAATTCAGTACTTCTTACACATGATAAAAGTACCCAAAATTTGGTAAATTAATTTATATTA -261
-260  TAAAAGGTGGAAATATTTAATAAATATAAAATAAGGTTTTCATAAATGGGGAACGAAACTCCAAACTACACGTTGGGCTGAGAAACATCTGGAGAAAGAGTTGT -150
-149  TGTGCCATGGATATTTAGAAACAGGAAAGTGTGTAAAGCTGCCACTTACTGTGAGATTTGTGGGATGGAGGACCTGTGTTAGAGTGAAGGAAAGGTGGAGAGGAGT -39
-38  GGAATAATAGAAGTATGCTTATATAAGAAAGGTTGAAAATTTGGGAAGTAAATTAAGAAAGATGGAGAGGAGAAAAGACAGAGACTGAAACAAGGCAAACTAAACCTTGAA -73
      M E K E K K T E S E Q K V N L E
-74  GGGCTTCCACAGAGGACAGCTCCCTATGTGAAATACAGGATTTGGAGGATTAATAGCAACAGGGTTATGGCACACAGGGCCATCAGGAACCAAGACTGTTGAGGTTGCT -184
  G L P T E D S P Y V K Y K D L E D Y K Q Q G Y G T Q G H Q E P K T G R G A
-185  GAGACTACTGAAGCACCAACTCTCTCTGGGCTGCAATTTCTCTAAGTCCCAAGCCACTGCAACTGCTGCCACTAATCAAAAGTGACTCCCTGAATTTACACCACTCTCT -295
  G A T E A P T L S G A A F S S K S Q A T A T G A T N H K *
-296  ACACCTGCCCTAATAAATCTATTATTACAGCTTTTAACTTCCAGTACTCTATTCTGCTTTTCTTTTGCATCATGACATGTTGGCTAAAACCTTTTGTGTGTGCAAA -406
-407  TTTAGATATGATGTTGTAGTGTGATACAAATGATCCAAATCATACTTTTTCTCTGTTACAGCTTCTCTCTGCTCTTAATTTGTTATGTTAATACGCTTTTACAAATA -517
-518  TGGAAAGCTAGTTTGGTTTGTATCTCTATTTTTTGGGGTCAATTTCACTTTTATGATACCATGATACAAATTTATCCATGTGCAGCGGATGCTACTACTTCTTTAT -628
-629  TATTCACTCTCTTTTAAAGCACTGTACCGCCGTGGAATATAGGTTTGGATTGGGATTTGCTTATGAACACAAAATTTCACTGCAAGAGTTAATAGCTCTCTTT -739
-740  TTTACCTTTTAACTACTAACACTGGACTCTTTTATGGAAGAACCTCTGTCTGAGAAAACACCTTTGATAGATGAAAAGAAAAGGAATATATAGTTTACAACTCTG -850
-851  GAGTGCATGATGAAAGAGTGGTGG

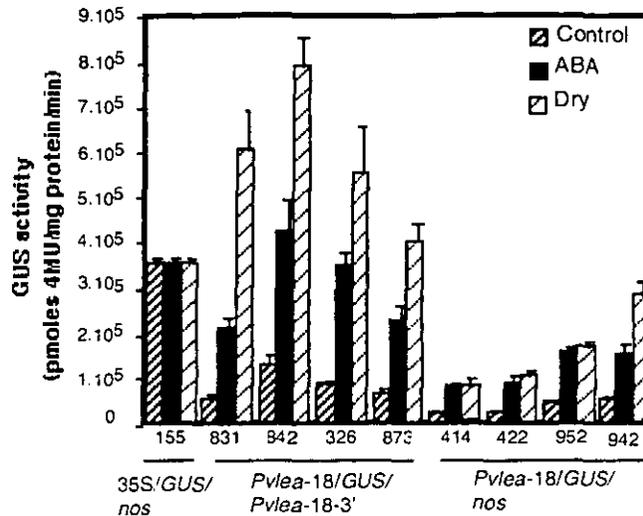
```

**Figure 1.** Diagram of the *Pvlea-18* gene structural organization. **(A)** Schematic representation of the 12 Kb genomic insert containing the complete *Pvlea-18* gene showing relevant restriction sites, the *Pvlea-18* ORF as well as the 5' and 3' sequences used in this analysis. **(B)** Localization of putative *cis*-acting elements present in the 5'-flanking region is indicated: open boxes: CAAT-box, filled boxes: ABRE and G-box ACGT motifs, horizontal lines box: as1, gray boxes: MYC and dashed boxes: MYB. Regions with putative polyadenylation signals found in the 3'-region are shown as filled horizontal rectangles. The consensus sequences considered here are: for ABRE, YACGTGGC (Busk and Pagès,

1998); for the G-Box ACGT motif, 8-10 base pairs with the core sequence ACGT (Izawa *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 1996); for as1 TGACG (Lam and Chua, 1991); for the MYC-binding motif, CANNTG (Murre *et al.*, 1989) and for the MYB recognition site, YAAC(G/T)G or (C/R) (Y/A)CAACYR (Biedenkapp *et al.*, 1988; Nakagoshi *et al.*, 1990). For polyadenylation signals the consensus sequences for UE, PE, U-rich, CS and U-rich elements described by (Graber *et al.*, 1999) were considered. **(C)** Structure of *Pvlea-18/GUS* fusion chimeric genes. **(D)** The nucleotide sequence corresponding to the *Pvlea18* 5' promoter region (-2036 to -1), 5'-UTR region (+1 to +22), 3' region (+270 to +877) and the corresponding ORF (+23 to +269) is shown. The 5' and 3' regions used for the chimeric constructs go from -2036 to +22 and from +270 to +877, respectively. Position +1 (↑) corresponds to the transcription initiation site determined by primer-extension experiments (data not shown), the downstream underlined sequence corresponds to the 5' UTR. The putative *cis*-elements described in **B** are doubly underlined. In the 3' region, putative polyadenylation signals are underlined. The nucleotide sequence data will appear in the GeneBank Database under the accession number AF240774.

terminator was replaced with the *Pvlea-18* 3'-region (*Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'*), so that we could investigate the role of *Pvlea-18* 3'-region in the dehydration response (Figure 1C). Arabidopsis plants were transformed with the chimeric genes and 10 independent lines were obtained for each construction. Southern blot analysis showed that 2 copies of the chimeric genes were integrated into the genome of each of the transgenic plants (data not shown).

To analyze the transcriptional regulation of the *Pvlea-18* gene in response to dehydration and ABA treatment, 8 independent transgenic plants were used to determine *GUS* expression. The results in Figure 2 and Table 1 show that the *Pvlea-18*-promoter region used in the fusions containing the *nos* 3'-terminator is able to mediate the induction of the *GUS* expression during water deficit conditions (4.5-fold-increase) and ABA treatment (3.5-fold-increase). Expression driven by the *Pvlea-18*-promoter region was also detected under well-irrigated conditions. When the *Pvlea-18* 3'-region was present in the gene fusion, instead of the *nos* 3' terminator, higher induction levels were detected even in non-treated plants. A greater enhancing effect was observed in response to dehydration (7.5-fold-increase) but not in response to ABA (3.6-fold-increase, Table 1), suggesting that the expression of the *Pvlea-18* gene during dehydration is partially modulated by an ABA-independent pathway.



**Figure 2.** Stable expression of *Pvlea-18/GUS* chimeric genes in transgenic *Arabidopsis* plants. T<sub>2</sub> generation plants from four different lines from each construction were grown in GM at 24°C under a 16h light/8h dark cycle. After 3 weeks, plants were subjected to dehydration or ABA treatment. Dehydration was imposed by removing plants from the growth medium and transferring them to a clean surface in a chamber at 24°C and 80% humidity, under dim light, until 30% of the fresh weight was lost. ABA treatment was applied by adding an ABA solution (100 μM final concentration) to the solid growth medium and allowed to diffuse during 24 h under dim light; control plants were maintained in GM medium for the time indicated for each condition. After treatment, plants were harvested and GUS activity determined. In this figure we show the results obtained from four representative lines. Numbers below bars identify the different lines analyzed. The standard error (SE) was obtained from fifteen different plants from each transgenic line (n=15), except for lines 831 and 952, for which nine different plants were examined (n=9). The differences in GUS activity between the different treatments for each line are significant according to Student's *t*-test ( $P < 0.05$ ), except for differences between ABA and Dry treatments of lines 414, 422 and 952.

The distribution of *GUS* expression in transgenic *Arabidopsis* plants containing either of the two constructs (*Pvlea-18/GUS/nos* or *Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'*) was followed by histochemical analysis (see Materials and Methods). Blue color was detected in different tissues of non-treated plants, and it was higher in those

Table 1. Fold induction of GUS activity recorded in *Arabidopsis* transgenic plants containing *Pvlea-18/GUS* chimeric genes

CONSTRUCTION	FOLD-INDUCTION*	
	ABA	Dry
<i>Pvlea-18/GUS/nos</i>	3.5 ( $\pm$ 1.01) <sup>a,c</sup>	4.5 ( $\pm$ 1.43) <sup>a,d</sup>
<i>Pvlea-18/GUS/Pvlea-18</i>	3.6 ( $\pm$ 1.01) <sup>b,c</sup>	7.5 ( $\pm$ 2.04) <sup>b,d</sup>

\* The levels of induction refer to the respective control without treatment.

The SD was obtained from four lines of each construction, n=16

<sup>a,c</sup> The difference between these values are no significant according to Student's *t*-test (P<0.05).

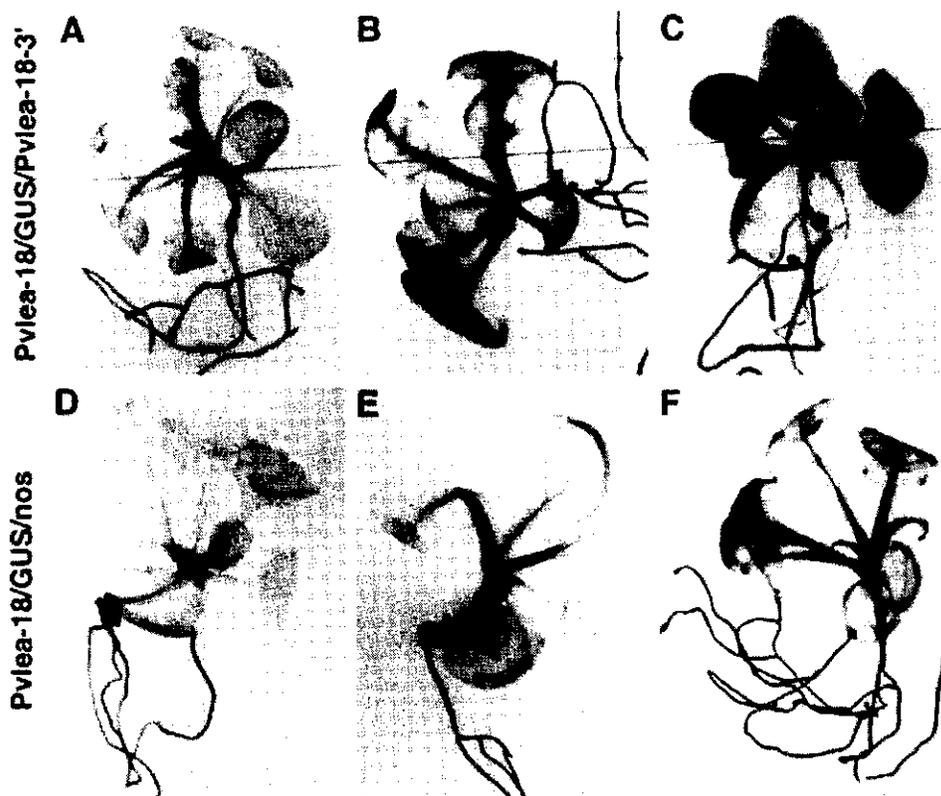
<sup>b,d</sup> The difference between these values are significant according to student's *t*-test (P<0.05).

plants containing the *Pvlea-18* 3'-region, which agrees with the fluorometric data (see Table 2 and Figure 3). Similarly, an increase in the GUS activity was detected in dehydrated and ABA treated plants. The highest GUS activity was observed in response to dehydration in those plants containing the *Pvlea-18* 3'-region. The spatial and temporal distribution of the GUS activity was not affected by the presence of the *Pvlea-18* 3' -region or by the different treatments (Figure 3).

Table 2. Specific GUS activity recorded in *Arabidopsis* transgenic plants.

CONSTRUCTION	GUS ACTIVITY AVERAGE*		
	(pmol 4-MU formed per mg protein per minute)		
	1 week	2 weeks	3 weeks
Wild type	4 ( $\pm$ 2)	6 ( $\pm$ 2)	12 ( $\pm$ 4)
<i>Pvlea-18/GUS/nos-L942</i>	84010 ( $\pm$ 2648)	38560 ( $\pm$ 1140)	44880 ( $\pm$ 1536)
<i>Pvlea-18/GUS/nos-L952</i>	65380 ( $\pm$ 1741)	28560 ( $\pm$ 823)	57450 ( $\pm$ 943)
<i>Pvlea-18/GUS/ Pvlea-18-3' -L823</i>	156100 ( $\pm$ 4003)	72560 ( $\pm$ 1234)	94270 ( $\pm$ 1256)
<i>Pvlea-18/GUS/ Pvlea-18-3' -L831</i>	144030 ( $\pm$ 3468)	53830 ( $\pm$ 965)	126040 ( $\pm$ 2456)

\* Values are means  $\pm$  SE. The standard error was obtained from two lines of each construction, n=50.



**Figure 3.** Histochemical localization of GUS activity in transgenic *Arabidopsis* plants transformed with either chimeric genes, *Pvlea-18/GUS/nos* or *Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'*. Plants were grown in GM at 24°C under 16h light/8h dark cycles and, after 3 weeks they were subjected to 100  $\mu$ M ABA treatment during 24h (**B** and **E**) and to dehydration until plants lost 30% of their fresh weight (**C** and **F**). Control plants were maintained in GM medium for the times indicated for each treatment (**A** and **D**). Plants were harvested and processed for histochemical localization of GUS activity. The T<sub>2</sub> lines showed in this figure are 942 for *Pvlea-18/GUS/nos* and 326 for *Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'*.

*Pvlea-18* gene presents both ABA-dependent and -independent responses during dehydration.

To explore the possibility that an ABA-independent pathway participates in the regulation of the *Pvlea-18* gene expression in response to dehydration, we analyzed the expression of this gene in dehydrated transgenic plants, previously treated or not with fluridone, an inhibitor of ABA biosynthesis (Walton and Li, 1995). The fluridone treatment was established not only by scoring phenotypical changes, but also by determination of endogenous ABA levels, and by expression analysis of a *lea* gene (*EM6*), which is induced by dehydration and ABA treatment in *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 1999). After a

72 h fluridone treatment, damage to seedlings or induction by dehydration of the ABA-regulated gene was not observed (data not shown). Determination of ABA content showed that during dehydration in the presence of the inhibitor, the endogenous ABA levels were significantly lower (3.7-fold-decrease) than those obtained from plants dehydrated in the absence of fluridone, and similar to those present in well-irrigated plants (22 ng ABA/g FW) (Table 3).

Table 3. ABA levels in *Arabidopsis* transgenic plants treated with fluridone.

CONSTRUCTION	ABA CONCENTRATION (ng/g fresh weight)			
	CONTROL		DRY	
	-F	+F	-F	+F
<i>Pvlea-18/GUS/nos</i>	19.5 ( $\pm$ 4.6) <sup>a,c,d</sup>	31.0 ( $\pm$ 8.0) <sup>a</sup>	63.5 ( $\pm$ 7.0) <sup>b,c</sup>	20.0 ( $\pm$ 2.5) <sup>b,d</sup>
<i>Pvlea-18/GUS/Pvlea-18</i>	24.5 ( $\pm$ 2.8) <sup>a,c,d</sup>	21.5 ( $\pm$ 1.5) <sup>a</sup>	67.5 ( $\pm$ 6.6) <sup>b,c</sup>	21.5 ( $\pm$ 3.6) <sup>b,d</sup>

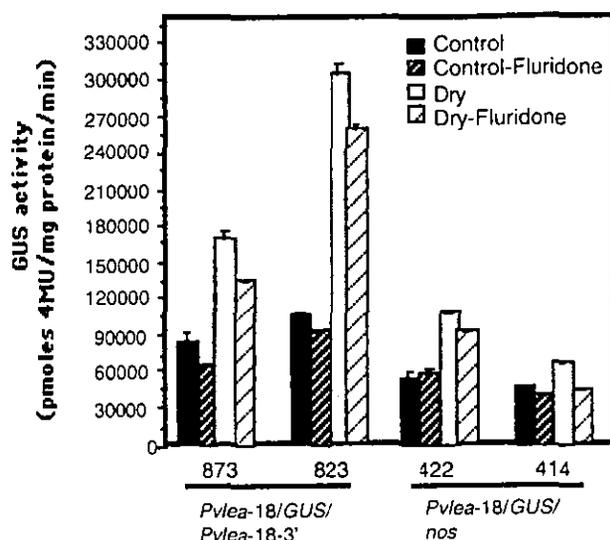
\*Values are means  $\pm$ SD n=4. F: fluridone (1 $\mu$ M)

<sup>a,d</sup> The difference between these values are statistically no significant according to Student's t-test (P<0.05).

<sup>b,c</sup> The difference between these values are statistically significant according to Student's t-test (P<0.05).

As shown in Figure 4, a significant small reduction (10%-25%) in GUS activity was observed when transgenic plants treated with fluridone were subjected to dehydration. All the transgenic lines that we analyzed (7), containing either of the two constructs (*Pvlea-18/GUS/nos* or *Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'*), showed a similar small decrease in the GUS activity, indicating that the *Pvlea-18* gene expression during dehydration is predominantly ABA-independent. The fact that dehydrated transgenic plants carrying the *Pvlea-18* 3'-region showed induction of GUS activity, regardless of the presence of fluridone, suggests that the *Pvlea-18* 3'-region enhances the ABA-independent expression during dehydration.

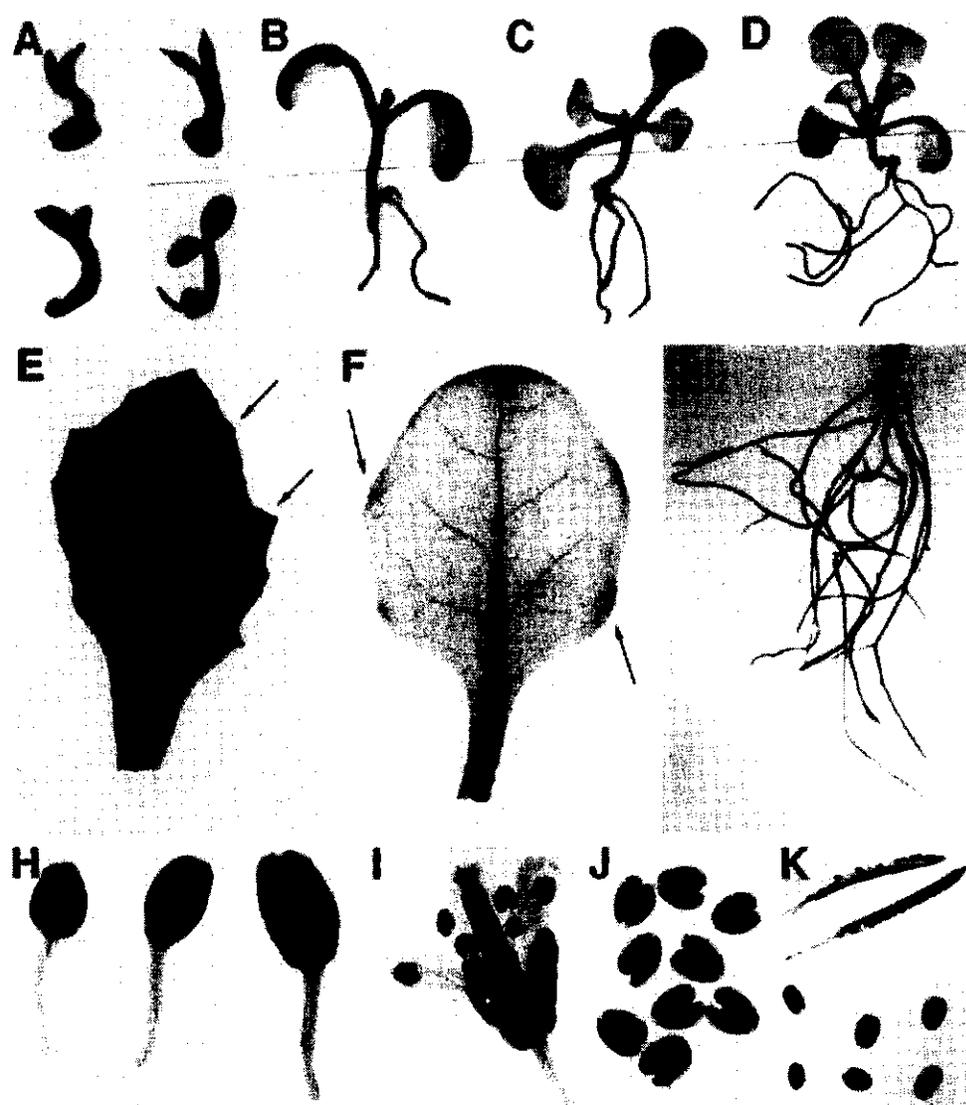
In addition, the results in Figure 4 show that the *Pvlea-18* gene expression in well-irrigated plants was not affected by fluridone treatment, suggesting that expression under these conditions does not depend on ABA regulation.



**Figure 4.** Stable expression of *Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'* region and *Pvlea-18/GUS/nos* chimeric genes in transgenic *Arabidopsis* plants. Plants were grown on GM agar plates for 3 weeks, at 24°C under a 16h light/8h dark cycle. Then, plants were transferred to GM agar plates containing 1 $\mu$ M fluridone (to inhibit ABA biosynthesis) and maintained under these conditions for 72 h. Subsequently, plants were subjected to dehydration as described above and, at the end of the treatment, processed for fluorometrical GUS quantification. The data obtained from two different representative transgenic lines from each construction are shown in this figure. The standard error (SE) was obtained from twenty-one different plants from each transgenic line (n=21). The difference in GUS activity between Dry and Dry-Fluridone treatments are significant according to Student's *t*-test ( $P < 0.05$ ).

*Pvlea-18* gene expression is differentially regulated during plant development.

Since important levels of GUS activity were detected in well-irrigated transgenic *Arabidopsis* plants (see sections above); we further characterized the *Pvlea-18* gene expression in different organs during development. Eight independent lines from each construction (*Pvlea-18/GUS/nos* and *Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'*) were subjected to histochemical and fluorometrical analysis of their GUS activity. In agreement with the data described above, the results from this analysis showed that the transgenic lines containing the *Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'* presented the highest GUS activities (Table 2). The increase in GUS activity, when compared to the transgenic lines that contain the construction lacking the *Pvlea-18* 3'-region, was approximately 2.1-fold. These accumulation levels were similar in all the developmental stages examined (1, 2 and 3 weeks; see Table 2). No effect of the *Pvlea-18* 3'-region on the *Pvlea-18* gene expression patterns was detected (data not shown).



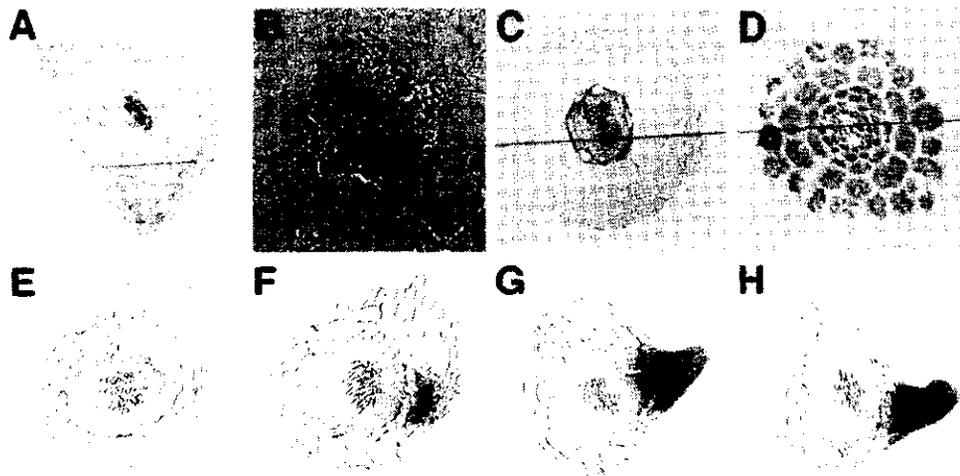
**Figure 5.** Histochemical localization of GUS activity in transgenic *Arabidopsis* plants transformed with the chimeric gene *Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'*. Plants were grown in GM at 24°C under 16h light/8h dark cycles. Plants were harvested at different times: 2-4 d (A), 8 d (B), 14 d (C) and 20 d (D), and processed for histochemical localization of GUS activity. Panels E to G show representative samples of GUS histochemical localization in young leaves (E), mature leaves (F) and roots (G) of mature transgenic *Arabidopsis* plants. Bottom panels show GUS activity in: sepals of young inflorescences (H), sepals and anthers of mature flowers (I), anthers and pollen grains (J) and siliques and mature seeds (K). Arrowheads indicate hydathodes in leaves (E and F). The results shown in this figure were obtained with the T<sub>2</sub> generation of the 326 transgenic line.

As shown in Figure 5A, the GUS activity in 1-4 dag *Arabidopsis* seedlings indicates that during these developmental stages the *Pvlea-18* gene is expressed in all

tissues at high levels. Once the embryonic leaves have expanded (approximately 8 dag) and until the rosette has formed (approximately 21 dag), GUS activity clearly concentrates in the root tissues and in the vascular cylinder of the shoot (Figure 5B - 5D). Also, GUS activity was detected in the apical region and hydathodes of leaves (Figure 5E and 5F). The highest activity was found in emerging leaves and in mature roots (Figure 5E and 5G). The same expression pattern is maintained even after 64 dag (data not shown). In flowers, the highest expression was detected in anthers, particularly in pollen grains, and in sepals (Figure 5H - 5J). Also, high GUS activity was observed in siliques and in seeds, where the highest expression occurred during the desiccation stage (Figure 5K).

A microscopic examination of the GUS activity distribution during the histochemical analysis of the transgenic *Arabidopsis* plants showed that the *Pvlea-18* promoter drives GUS expression in most cell types. High expression was detected in the vascular cylinder from different organs (Figure 6A - 6D) and particularly, in developing tissues such as protoxylem and protophloem (Figure 6B). In roots, although GUS expression was detected in most tissues, higher levels were observed in the elongating region (Esau, 1977) (Figure 6D). Additionally, a conspicuous high expression was observed in developing lateral roots, where an increase in GUS activity starts to be detected when the pericycle and cortical internal cells initiate their division. A more intense blue color was subsequently detected in all cells of the lateral root primordium (Figure 6E - 6H).

Since the *Pvlea-18* gene is expressed during normal plant development, we asked whether some phytohormone other than ABA was participating in its regulation. Therefore, transgenic *Arabidopsis* plants were subjected to treatments with auxin (IAA), cytokinin (6-BAP) and giberellin (GA) (see Materials and methods). Under the conditions tested, no effect was detected in response to any of the phytohormones we used (data not shown).

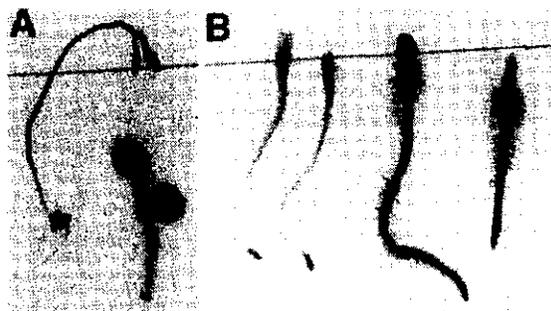


**Figure 6.** Histochemical localization of GUS activity in different tissues of transgenic *Arabidopsis* plants transformed with the chimeric gene *Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'*. Panels **A** and **B** show representative transverse sections of a mature leaf petiole. The highest GUS activity was detected in the vascular cylinder, particularly in cambium and developing cells (protoxylem). Panels **C** and **D** show representative transverse sections of a stem and a root, respectively, from 2 week-old *Arabidopsis* plants. In stems, GUS activity was mostly concentrated in the vascular cylinder (**C**), whereas in the elongating region of roots, GUS activity was high in all tissues (**D**). Panels **E** to **H** show GUS expression in representative transversal sections of a principal and an emerging lateral root found on the same plane. Differential distribution of GUS activity is observed during the emergence of the lateral root. The highest activity was detected in the emergent lateral root primordium, particularly in the dividing inner cortical cells as well as in the pericycle (**P**). **P**: Phloem; **C**: Cambium; **X**: Xylem. The  $T_2$  lines showed in this figure are 326 for *Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'* (**A** to **D**) and 422 for *Pvlea-18/GUS/nos* (**E-H**).

*Pvlea-18* gene expression is negatively regulated during etiolated growth.

In contrast to the high *GUS* expression levels observed in transgenic *Arabidopsis* grown under normal light conditions (16 h light/8 h dark) (see above), when transgenic plants were grown in darkness, lower *GUS* activity was detected in hypocotyls and roots (Figure 7A and 7B). This effect was more severe in roots where *GUS* activity was only observed in restricted regions of the apical and basal zones (Figure 7B). The possibility that this effect was the result of direct regulation by light on the expression of the *Pvlea-18* gene was tested by exposing 5 day etiolated plants to various light treatments. The light treatments were short or long exposures to white light as well as to continuous red, far red, or blue light. No induction of *GUS* activity could be detected by any of these treatments

indicating that the *Pvlea-18* gene was not regulated directly by light (data not shown) (see Materials and methods for details).



**Figure 7.** Histochemical localization of GUS activity in roots of transgenic Arabidopsis plants transformed with the chimeric gene *Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'*. **A.** Six day-old plants grown in darkness (left) and light (right), respectively. **B.** Roots of plants grown in darkness (left) and light (right), respectively. The results shown in this figure were obtained with the T<sub>2</sub> generation of the 326 transgenic line.

To further investigate this phenomenon, we carried out experiments in which transgenic Arabidopsis plants were germinated and grown under dark conditions for 5 days. Seedlings were harvested each 12 h and the GUS activity was histochemically detected. High expression of the *Pvlea-18* promoter was observed in roots 12, 24 and 36 h after germination (data not shown). After this point, the GUS activity decreased in a progressive manner, until almost no activity was detected in roots of 5 day seedlings suggesting a negative regulation on the *Pvlea-18* gene expression (Figure 7). Similar results were obtained for hypocotyls, although the decrease in GUS activity was not as severe as in roots (see Fig 7A). This effect was not detected in cotyledons (Figure 7A). It should be noted that transgenic plants containing either the *Pvlea-18/GUS/nos* or the *Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'* chimeric genes showed the same expression patterns in all the experiments described above.

## Discussion

*lea* genes encode a heterogeneous group of proteins, which have been classified in six families according to their sequence similarity (Ingram and Bartels, 1996; Colmenero-Flores *et al.*, 1997). Common characteristics of *lea* genes are their high expression during the last stage of seed development, at the onset of seed desiccation, and in response to water deficit conditions, during vegetative growth (Ingram and Bartels, 1996). While the expression of some of these genes during development and stress is mediated by ABA through different *cis*-elements and transcription factors, others show an ABA-independent dehydration response (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1993). In previous work, we have shown that both the *Pvlea-18* transcript and protein accumulate in dark grown bean seedlings not only in response to water deficit but also during development under optimal irrigation (Colmenero-Flores *et al.*, 1999). Expression in different tissues during the vegetative growth of well-irrigated plants has also been observed for two additional *lea* genes (Iwasaki *et al.*, 1995; Rouse *et al.*, 1996).

In this study, we present evidence, which indicates that the expression of the *Pvlea-18* gene is transcriptionally modulated in response to ABA, dehydration and during normal development. The analysis of the *GUS* gene expression in Arabidopsis plants, transformed with constructs containing the *Pvlea-18* promoter fused to the *GUS* reporter gene, showed that the *Pvlea-18* promoter drives expression patterns similar to those obtained for the *Pvlea-18* transcript and protein in bean plants (Colmenero-Flores *et al.*, 1997; Colmenero-Flores *et al.* 1999). In response to dehydration, Arabidopsis transgenic plants containing the *Pvlea-18/GUS/nos* fusion showed induction of *GUS* expression in most tissues of roots and shoots (Figure 3). ABA treatment also induced *GUS* activity with similar expression patterns although to lower levels when compared to water deficit conditions (Figure 3). During development, we observed high *GUS* expression in young elongating Arabidopsis seedlings, as well as in sepals, anthers, pollen grains, dry seeds and in the hydathodes of leaves. Highest expression was detected in roots and in the meristematic regions of stems when plants were grown under light conditions (16h light/8h dark cycle) (Figure 5). Similar to what is found for the *Pvlea-18* transcript and protein in *P. vulgaris* plants (Colmenero-Flores *et al.*, 1999), the histological analysis of the *GUS* expression in transgenic Arabidopsis showed that the *Pvlea-18* gene preferentially expresses in vascular tissues and in growing regions such as emerging lateral roots. An increase in *GUS* expression can be followed during the formation and emergence of lateral roots. The first signal is detected when the endodermis cells start to differentiate. The *GUS* activity then increases in the dividing

cells, which allowed to distinguish the emerging root (Figure 6 E-H). This expression pattern of the *Pvlea-18* promoter during development is consistent with the presence of an as1 element, at position -424, since it seems to confer expression principally in mature root, in embryonic tissues destined to become root, and in vascular tissues (Benfey and Chua, 1990). From the analysis of the *GUS* expression patterns obtained from the transgenic *Arabidopsis* plants, it was possible to conclude that the *Pvlea-18* gene is particularly expressed in organs or tissues which are exposed to low osmotic potentials such as desiccated seeds, pollen grains, vascular cylinders and hydathodes (McCully, 1994; Colmenero-Flores *et al.*, 1997). In addition, the fact that this gene is highly expressed in young elongating seedlings, roots and emerging lateral roots suggests that PvLEA-18 is a protein that may provide protection during the initial stages of development or in tissues that contend against constant or severe osmotic severe osmotic changes, as a preventive mechanism to allow the plant to produce additional adaptive responses.

For many plant genes involved in different processes, it has been shown that their 3'-region plays a regulatory role on gene expression. These regions may function at the level of transcription as enhancers (Dean *et al.*, 1989; Dietrich *et al.*, 1992; Larkin *et al.*, 1993; Fu *et al.*, 1995), or at the post-transcriptional level by modulating the mRNA stability or the rate of translation (Bailey-Serres and Dawe, 1996; Chan and Yu, 1998; Gutiérrez *et al.*, 1999). Therefore, the study of the 3' flanking regions has shown to be important in order to know the proper expression of a gene. Although regulation by promoter regions of many genes responsive to ABA and dehydration (including *lea* genes) has been analyzed extensively (Ingram and Bartels, 1996), the effect of the 3'-region on their expression has not been previously examined. We have demonstrated that the *Pvlea-18* 3'-region exhibits an enhancer effect on the *Pvlea-18* gene expression during development and dehydration but not in response to ABA. Since a stronger enhancing effect was observed only in response to water deficit, this suggested the participation of an ABA-independent pathway in the regulation of the *Pvlea-18* gene expression during dehydration. Eventhough a higher ABA sensitivity during water deficit can not be discarded, the fact that the enhancer effect exerted by the *Pvlea-18* 3'-region was maintained even in the presence of fluridone supports this assumption. As mentioned above, the enhancer effect was detected in response to dehydration but not in response to ABA. Therefore, one possibility is that this putative enhancer element interacts with additional components that participate in the regulation of the *Pvlea-18* gene in response to water deficit but not with those involved in the ABA-dependent regulation. Since there is evidence that ABA-dependent and ABA-independent pathways interact

and converge to activate some osmotic responsive genes (Ishitani *et al.*, 1997; Moller and Chua, 2000), it can be proposed that, under water deficit, induction of *Pvlea-18* gene expression may require the participation of both pathways through transcriptional regulators that interact with 5' and 3' *cis*-regulatory elements. The results shown here suggest that optimal *Pvlea-18* gene expression during dehydration requires the participation of both the 5' and 3' noncoding sequences. At present it is unclear whether the regulatory sequences downstream of the protein-coding region affect gene activity at the transcriptional or post-transcriptional level. A further study is required in order to define the precise mechanisms involved in this regulation.

ABA does not seem to play an important role in the response to dehydration of the *Pvlea-18* gene since the results from the experiments using fluridone indicated that its response is predominantly ABA-independent. However, the fact that this gene is able to respond to ABA treatment suggests that this phytohormone might be involved in the modulation of this gene during additional processes such as seed development. Consistent with these observations, the analysis of the *Pvlea-18* 5' region revealed the presence of one putative ABRE as well as of *cis*-elements involved in ABA regulation dependent on protein synthesis (MYC- and MYB-elements) (Figure 1B and D). Transient expression experiments using different deletions of the *Pvlea-18* promoter indicated that when the MYB-element, the CAAT-box and the G-box ACGT motif, located between positions -748 and -592, were removed, expression in response to ABA decreased by 50%. Since further deletions, closer to the translation initiation site, resulted in progressive loss of activity, this analysis did not allow us to define which of the putative *cis*-elements identified are functional in the ABA response of the *Pvlea-18* promoter (our unpublished results). On the other hand, it should be noted that while the dehydration response for *Pvlea-18* gene is ABA-independent, its 5'-region does not contain sequences similar to any of those considered as dehydration response elements (DREs) identified in *Arabidopsis* (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994).

Since most of the previous studies on the accumulation patterns of both the *Pvlea-18* transcript and protein in *P. vulgaris* were carried out using dark grown seedlings (Colmenero-Flores *et al.*, 1999), we also examined the *GUS* expression driven by the *Pvlea-18* promoter in transgenic *Arabidopsis* plants grown under dark conditions. The *Pvlea-18* promoter was initially highly expressed in elongating dark grown *Arabidopsis* seedlings. After 36 h in darkness, this expression began to decrease, most dramatically in roots. Similar transcript and protein accumulation patterns were observed in dark grown bean seedlings (Colmenero-Flores *et al.*, 1999). The progressive decrease in the *GUS* activity detected during etiolated growth indicates a negative regulation of the *Pvlea-18*

gene expression, even though higher ABA levels have been detected, compared to those obtained for light-grown seedlings (our unpublished results; Weatherwax *et al.*, 1996). Since the *Pvlea-18* promoter is not directly regulated by light, this transcriptional silencing can not be explained by the same repression mechanism that has been proposed to inhibit photomorphogenesis in darkness. Accordingly, the *Pvlea-18* promoter does not seem to be repressed during early stages of development as is the case of light-inducible genes (Von Amim and Deng, 1996; Khurana *et al.*, 1998). The identification of the factors involved in this regulatory mechanism awaits further investigation.

## **Acknowledgements**

We thank P. León, S. Reichler and J.L. Reyes-Taboada, for critical reading of the manuscript, R. M. Solórzano and L. López (Unit of Microscopy, IBt-UNAM) for technical assistance and microscopical analysis, E. Arroyo for plant maintenance and growth, P. Gaytán and E. López (Unit of Chemical Synthesis, IBt-UNAM) for oligonucleotide synthesis, E. Salas for assistance with image processing and J. Estévez, P. León and J.L. Cabrera for their invaluable assistance with transformation techniques. We are also grateful to A. Martínez, M.L. López and L. Herrera-Estrella for advice and support with light treatments, S. Cuéllar for assistance in the statistical analysis, V. H. Bustamante for excellent help in performing the primer-extension experiments and to Novartis (Mexico) for the generous gift of pure fluridone. This work was partially supported by a grant from CONACyT (26242-N). L.P.M-F was supported by a fellowship from COLCIENCIAS (Colombia).

## References

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D. and Shinozaki, K. 1997. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9: 1859-1868.
- Baker, J., Steele, C. and Dure III, L. 1988. Sequence and characterization of 6 *Lea* proteins and their genes from cotton. *Plant Mol Biol* 11: 277-291.
- Bailey-Serres, J. and Dawe, R.K. 1996. Both 5' and 3' sequences of maize *adh1* mRNA are required for enhanced translation under low-oxygen conditions. *Plant Physiol* 112: 685-695.
- Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. 1993. *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Acad Sci Paris Sci la Vie/Life Sci* 316: 1194-1199.
- Benfey, P.N. and Chua, N.-H. 1990. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 250: 959-966.
- Biedenkapp, H., Borgmeyer, U., Sipper, A.E. and Klemprauer, K.-H. 1988. Viral *myb* oncogene encodes a sequence-specific DNA binding activity. *Nature* 335: 835-837.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 278-293.
- Bray, E.A. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol* 103: 1035-1040.
- Bray, E.A. 1991. Regulation of gene expression by endogenous ABA during drought stress. In: W.J. Davies and H.G. Jones (Eds.). *Abscisic acid, physiology and biochemistry*, Bios Scientific Publisher, Lancaster LA1 4YQ, UK, pp. 81-96.
- Busk, P. K. and Pagès, M. 1998. Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol* 37: 425-435.
- Chan, M.T. and Yu, S.M. 1998. The 3' untranslated region of a rice alpha-amylase gene functions as a sugar-dependent mRNA stability determinant. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6543-6547.
- Church, G.M. and Gilbert, M. 1984. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1991-1995.
- Close, T. 1997. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant* 100: 291-296.
- Colmenero-Flores, J.M., Moreno, L.P., Smith, C.E. and Covarrubias, A.A. 1999. *Pvlea-18*, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiol* 120: 93-103.

- Colmenero-Flores, J.M., Campos, F., Garcarrubio, A. and Covarrubias, A.A. 1997. Characterization of cDNA clones responsive to water deficit from *Phaseolus vulgaris*: a new late embryogenesis abundant protein. *Plant Mol Biol* 35: 393-405.
- Dean, C., Favreau, M., Bond-Nutter, D, Bedbrook, J. and Dunsmuir, P. 1989. Sequences downstream of translation start regulate quantitative expression of two petunia *rbcS* genes. *Plant Cell* 1: 201-208.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J. 1983. A plant DNA Miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Reporter* 1: 19-22.
- Dietrich, R.A., Radke, S.E. and Harada, J.J. 1992. Downstream DNA sequences are required to activate a gene expressed in the root cortex of embryos and seedlings. *Plant Cell* 4: 1371-1382.
- Dure III, L. 1993. Structural motifs in Lea proteins. In: T.J. Close and E.A. Bray (Eds.). *Plant responses to cellular dehydration during environmental stress*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp. 91-103.
- Esau, K. 1977. *Anatomy of seed plants*. John Wiley & Sons, Inc., U.S.A. pp. 215-242.
- Fu, H., Kim, S.Y. and Park, W.D. 1995. High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato *Sus4* sucrose synthase gene require 5' and 3' flanking sequences and the leader intron. *Plant Cell* 7: 1387-1394.
- Galau, G.A., Hughes, D.W. and Dure, L. 1986. Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis abundant (*lea*) mRNAs. *Plant Mol Biol* 7: 155-170 .
- Garcarrubio, A., Legaria, J.P. and Covarrubias, A.A. 1997. Abscisic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta* 203 : 182-187.
- Graber, J.H., Cantor, C.R., Mohr and Smith, T.F. 1999. *In silico* detection of control signals: mRNA 3'-end-processing sequences in diverse species. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14055-14060.
- Guan, L.M., Zhao, J. and Scandalios, J.G. 2000. *Cis*-elements and *trans*-factors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant J* 22: 87-95.
- Guiltinan, M. J., Marcotte, W.R. and Quatrano, R.S. 1990. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* 250: 267-271.
- Gutiérrez, R:A., Macintosh, G.C. and Green, P.J. 1999. Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control. *Trends Plant Sci* 4: 429-438.
- Hattori, T., Vasil, V., Rosenkras, L., Hannah, L.C., McCarthy, D.R. and Vasil, I.K. 1992. The *viviparous-1* gene and abscisic acid activate the C1 regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes Dev* 6: 609-618 .
- Hong, S.W., Jon, J.H., Kwak, J.M. and Nam, J.H. 1997. Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 63: 531-535.

- Imai, R., Chang, L., Ohta, A., Bray, E.A. and Takagi, M. 1995. A *lea*-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Sacharomyces cerevisiae*. *Gene* 170: 243-248.
- Ingram, J. and Bartels, D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 377-403.
- Ishitani, M., Xiong, L., Stevenson, B. and Zhu, J.-K. 1997. Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid - dependent and abscisic acid - independent pathways. *Plant Cell* 9: 1935-1949.
- Izawa, T., Foster, R. and Chua, N.-H. 1993. Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J Mol Biol* 230: 1131-1144.
- Iwasaki, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 1995. Identification of a *cis* regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Mol Gen Genet* 247: 391-398.
- Jacobsen, J.V. and Close, T. 1991. Control of transient expression of chimaeric genes by gibberellic acid and abscisic acid in protoplast prepared from mature barley aleurone layers. *Plant Mol Biol* 16: 713-724.
- Jefferson R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. 1987. b-Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907.
- Jefferson, R.A., Burgess, S.M. and Hirsh, D. 1986. b-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *EMBO J* 5: 8447-8451.
- Khurana, J.P., Kochhar, A. and Tyagi, A.K. 1998. Photosensory perception and signal transduction in higher plants. *Molecular genetic analysis. Crit Rev Plant Sci* 17: 465-539.
- Lam, E. and Chua, N.-H. 1991. Tetramer of 21-base pair synthetic element confers seed expression and transcriptional enhancement in response to water stress and abscisic acid. *J Biol Chem* 266: 17131-17135.
- Larkin, J.C., Oppenheimer, D.G., Pollock, S. and Marks, M.D. 1993. *Arabidopsis GLABROUS1* gene requires downstream sequences for function. *Plant Cell* 5: 1739-1748.
- Leung, J. and Giraudat, J. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 199-222.
- McCully, M.E. 1994. Accumulation of high levels of potassium in the developing xylem elements in roots of soybean and some other dicotyledons. *Protoplasma* 183: 116-125.
- Moller, S.G. and Chua N.-H. 1999. Interactions and intersections of plant signaling pathways. *J Mol Biol* 293: 219-234.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

- Murre, C., McCaw, P.S. and Baltimore, D. 1989. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, *daugh-terless*, *myoD*, and *myc* proteins. *Cell* 56: 777-783.
- Nakagoshi, H.N., Nagase, T., Kanei-Ishii, C., Ueno, Y. and Ishii, S. 1990. Binding of the *c-myc* proto-oncogene product to the simian virus 40 enhancer stimulates transcription. *J Biol Chem* 265: 3479-3483.
- Rouse, D.T., Marotta, R. and Parish, R.W. 1996. Promoter and expression of an *Arabidopsis thaliana* dehydrin gene. *FEBS Lett* 381, 252-256.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual., Volume 2, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Shen, Q., Zhang, P. and Ho T.-H.D. 1996. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA-induction of gene expression in barley. *Plant Cell* 8: 1107-1119.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 1996. Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotechnol* 7: 161-167.
- Skriver, K. and Mundy, J. 1990. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2: 505-512.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J. and Thomashow, M.F. 1997. *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1035-1040.
- Swire-Clark, G.A. and Marcotte, R.W. 1999. The wheat LEA protein *Em* functions as an osmoprotective molecule in *Sacharomyces cerevisiae*. *Plant Mol Biol* 39: 117-128.
- Takahashi, Y., Sakai, T., Ishida, S. and Nagata, T. 1995. Identification of auxin-responsive element of *parB* and their expression in apices of shoot and root. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6359-6363.
- Tobin, E.M. and Silverthorne, J. 1985. Light regulation of gene expression in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* 36: 569-593.
- Valvekens, D., Van Montagu, M. and Van Lijsebettens, M. 1988. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5536-5540.
- Vasil, V., Marcotte, W.R. Jr, Rosenkrans, L., Cocciolone, S.M. and Vasil, I.K. 1995. Overlap of viviparous1 (VP1) and abscisic acid response elements in the *Em* promoter: G-box elements are sufficient but not necessary for VP1 transactivation. *Plant Cell* 7: 1511-1518.
- Venglat, S.P. and Sawhney, V.K. 1996. Benzylaminopurine induces phenocopies of floral meristem and organ identity mutants in wild-type *Arabidopsis thaliana* plants. *Planta* 3: 480-487.
- von Arnim, G.A. and Deng, X.W. 1996. A role for transcriptional repression during light control of plant development. *BioEssays* 18: 905-910.

- Walton, C.D. and Li, Y. 1995. Abscisic acid biosynthesis and metabolism. In: J. P. Davies (Ed.). Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 140-157.
- Wang, M.L., Belmonte, S., Kim, U., Dolan, M., Morris, J.W. and Goodman, H.M. 1999. A cluster of ABA-regulated genes of *Arabidopsis thaliana* BAC T07M07. *Genome Res* 9: 325-333.
- Weatherwax, S.C., Ong, M.S., Degernhardt, J., Bray, E.A. and Tobin, E.M. 1996. The interaction of light and abscisic acid in the regulation of plant gene expression. *Plant Physiol* 111: 363-370.
- Xu, D., Duan, X., Wang, B.M., Hong, B., Ho, D.T.-H. and Wu, R. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol* 110: 249-257.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 1993. Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol Gen Genet* 236: 331-340.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 1994. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6: 251-264.
- Ye, G.-N., Stone, D., Pang, S.-Z., Creely, W., González, K. and Hinchey, M. 1999. *Arabidopsis* ovule is target for *Agrobacterium in planta* vacuum infiltration transformation. *Plant J* 19: 249-257.
- Zeevaart, J.A.D. and Creelman, R.A. 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 439-473.

## MATERIALES Y METODOS

(no incluidos en el artículo)

### **Transformación transitoria de protoplastos con la fusión transcripcional *Pvlea-18/LUC/nos*.**

**Clonación del promotor del gen *Pvlea-18* en el plásmido pJD301.** Para la expresión transitoria en protoplastos se utilizó el plásmido pJD301, un derivado del pUC18 (5.2 Kb) que tiene la construcción *CaMV35S-luciferasa-nos*. En este plásmido se hicieron dos construcciones, en una se reemplazó el *CaMV35S* por el promotor del gen *Pvlea-18* (*Pvlea-18-luciferasa-nos*) y en la otra, además del promotor se sustituyó el terminador *nos* por la región 3' del gen *Pvlea-18* (*Pvlea-18-luciferasa-Pvlea-18-3'*). Con las dos se realizaron experimentos de transformación transitoria.

**Aislamiento de protoplastos de un cultivo de células embrionarias de cotiledón de frijol.** Debido a que la obtención de protoplastos a partir de hojas de plantas de frijol, es poco eficiente, en cuanto a número de protoplastos obtenidos, se hicieron protoplastos a partir de células de frijol en cultivo. Una membrana con RNA transferido, proveniente de una cinética de inducción de células embrionarias de cotiledón de frijol con 50  $\mu$ M de ABA en tiempos de 2h – 24h (proporcionada por Berenice García), se hibridó usando como sonda la región codificante del gen *Pvlea-18*. Las hibridaciones y lavados fueron realizados en condiciones de alta astringencia, siguiendo el procedimiento descrito por Church y Gilbert (1984).

Los protoplastos fueron aislados por digestión enzimática de la pastilla de células, obtenida de 50 ml de cultivo celular subcultivado por 3 días, modificando el protocolo descrito por León *et al.* (1991). La pastilla se incubó en obscuridad con agitación suave, por 3 horas en una solución de digestión que contenía 2% de celulasa (Onozuka RS, Yakult Pharmaceutical Co. Ltd., Japan), 0.5% de pectoliasa Y-23 (Seishin Pharmaceutical Co. Ltd. Japan), 1% de BSA (Fracción V, Research Organics, Inc.) en 50 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 12 mM de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  y 450 mM de manitol. Después de la incubación, la suspensión resultante fue filtrada a través de una gasa y luego a través de una membrana de nylon con poros de 20  $\mu$ m de poro. Los protoplastos que pasaron a través de esta membrana fueron lavados dos veces con bufer de lavado (20 mM de KCl y 450 mM de manitol) y colectados por centrifugación a 100 g por 3 minutos.

**Transferencia de DNA.** Los protoplastos aislados fueron resuspendidos en solución de lavado a una densidad de  $1,5 \times 10^6$  protoplastos/ml. La electroporación (Sistema de electroporación PG 200 PROGENETOR™ II de Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) se hizo mezclando 150 µl de suspensión de protoplastos, 40 µg de DNA derivado del plásmido pJD301 correspondiente (*35S-luciferasa-nos*; *Pvlea-18-luciferasa-nos*; *Pvlea-18-luciferasa-Pvlea-18-3'*) y 15 µg del plásmido control de transformación pUC (*35S-GUS*). La electroporación se llevó a cabo a una capacitancia de 1520 µF, tiempo de 12 msec y fuerza del campo 180 V.

**Tratamiento de Protoplastos con ABA.** Después de la electroporación, los protoplastos fueron transferidos a una caja de cultivo de 6 pozos e incubados con 1ml de bufer de incubación (20 mM de KCl, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 5 mM de MES y 450 mM de manitol) por una hora en obscuridad a 24 °C. Después de este tiempo, los protoplastos fueron incubados sin o con 100 µM de ABA por 16 horas en obscuridad a 24°C. Después de la incubación, los protoplastos fueron observados al microscopio para verificar su integridad y luego centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos en una centrífuga clínica. La pastilla se congeló a -70 °C.

La actividad de luciferasa fue detectada usando el substrato luciferin y el resultante de la reacción fue detectado en un luminómetro (Analytical Luminescence laboratory, Monolight 2010) donde los fotones emitidos son integrados en un período de 10 segundos y son expresados como unidades luz (lu)/10 sec. Las lecturas de fondo que dió el luminómetro estuvieron entre 100 y 200 lu/10seg.

**Transformación transitoria de células de tabaco con diferentes deleciones de la fusión transcripcional *Pvlea-18/GUS/nos*.**

**Generación de deleciones de la región promotora del gen *Pvlea-18*.** A partir de la región promotora de 2058 pb, clonada en el vector para expresión transitoria pJD301 y que incluye la región 5' no transcrita (5'-UTR) se hicieron 4 deleciones. Para este fin, se diseñaron oligonucleótidos para generar deleciones a partir de las posiciones -1010, -463, -219 y -170 a los cuales se les introdujo el sitio de restricción *Hind* III. Luego, utilizando un oligonucleótido de la posición -3 a +20 se hicieron las amplificaciones por PCR utilizando el sistema Expand High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim). Estas deleciones fueron clonadas en *Hind* III-*Sal* I.

**Transformación transitoria de células de tabaco por la técnica de biobalística.** Con los plásmidos que portaban las deleciones -1010, -463, -219 y -170, se

transformaron células en suspensión de tabaco (NT) por la técnica de biobalística. Para el bombardeo se usaron células NT de cuatro días, en fase logarítmica temprana. El bombardeo se hizo de acuerdo a la metodología descrita por Russell *et al.* (1992). Las células fueron pretratadas con 100  $\mu$ M de ABA por 8 horas antes de ser colectadas por filtración en discos de papel filtro. El papel portando las células fue colocado en una caja con medio sólido con o sin 100  $\mu$ M de ABA 16 horas antes del bombardeo. Una vez bombardeadas las células con los respectivos plásmidos, se dejaron recuperar por cuatro días antes de ser cosechadas. Las células fueron raspadas del papel filtro usando una espátula, mezcladas con el buffer del kit para detección de luciferasa (Promega) y congeladas a -70. Luego, las muestras fueron maceradas con un politrón, congeladas en hielo seco, centrifugadas, y el sobrenadante se utilizó para cuantificar la actividad de luciferasa en el luminómetro (Analytical Luminescence laboratory, Monolight 2010). Como control de inducción por ABA se usó el gen quimérico *CDeT27-45/GUS* (promotor de un gen de *Craterostigma plantagineum* fusionado al gen de la  $\beta$ -Glucuronidasa inducible hasta 10 veces por ABA) (Michel *et al.*, 1993).

### **Purificación de DNA y análisis tipo Southern.**

El DNA de plantas de frijol o de *Arabidopsis* se purificó utilizando una modificación del método descrito por Dellaporta *et al.* (1983). El tejido fue macerado en nitrógeno líquido e incubado por 10 min a 65°C, en bufer de extracción (100mM Tris-HCl pH 8, 50mM EDTA, 500 mM NaCl, 10mM beta-mercaptoethanol, 1.3% SDS). Posteriormente, fue incubado por 30 minutos en hielo con 0.3 volúmenes de 5M de acetato de potasio y luego centrifugado por 20 min a 18000 rpm. El DNA fue precipitado con isopropanol y tratado con RNAsa (10 mg/ml), después de lo cual se precipitó de nuevo con 3 volúmenes de isopropanol y 0.1 volumen de acetato de sodio 3M.

El DNA se digirió independientemente con dos enzimas de restricción, *EcoR* I y *Hind* III y con la mezcla de éstas. Las transferencias se llevaron a cabo en geles de 0.8% (w/v) de agarosa en los que se aplicaron 10  $\mu$ g de RNA total, de acuerdo a Maniatis *et al.* (1982). El DNA se transfirió a una membrana de nylon (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham), la cual se hibridó y lavó en condiciones de alta astringencia, de acuerdo al procedimiento descrito por Church y Gilbert (1984). Los filtros fueron expuestos sobre films Kodak XAR a -80°C.

### **Aislamiento de RNA y análisis tipo Northern.**

El RNA total fue purificado utilizando el método descrito por Logemann *et al.* (1987). El RNA se disolvió en agua libre de RNAsas y su concentración se determinó espectrofotométricamente a 260 nm. Los experimento tipo Northern se llevaron a cabo utilizando geles de 1.5% (w/v) de agarosa que contenían formaldehído y en los que se aplicaron 10 µg de RNA, de acuerdo a Maniatis *et al.* (1982). El RNA se transfirió a una membrana de nylon (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham) y se hibridó y lavó a alta astringencia siguiendo el procedimiento descrito por Church y Gilbert (1984). Los filtros fueron expuestos a films Kodak XAR a -80°C.

### **Marcaje de sondas.**

Para los experimentos tipo Southern con DNA de frijol se utilizó como sonda el cDNA del gen *Pvlea-18*. Para los experimentos tipo Southern con DNA de *Arabidopsis* se utilizó como sonda un fragmento de 2 kb correspondiente a la región promotora del gen *Pvlea-18*. Las sondas fueron marcadas con estuche para marcaje "random primer" universal (Dupont) usando ( $\infty$ -<sup>32</sup>P)dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham).

### **Respuesta del gen *Pvlea-18* a algunas hormonas involucradas en procesos de crecimiento.**

Con el fin de determinar los factores que regulan la expresión del gen *Pvlea-18* durante el desarrollo, plantas de 4 semanas después de germinadas crecidas en medio GM, fueron tratadas en condición de hidroponía con las hormonas ácido indolacético (IAA) (4,5 µM por 24 horas en oscuridad), ácido giberélico (100 µM por 44 horas) y 6-benzil-aminopurina (BAP) (1µM por 12 horas). Después del tratamiento, las plantas completas fueron sometidas a tinción histoquímica y a cuantificación fluorométrica.

### **Cuantificación de ácido abscísico (ABA).**

Para la determinación del ABA endógeno se utilizó el estuche distribuido Phytodetek (Agdia) y se siguió el protocolo descrito por Garcarrubio *et al.* (1997). Para la extracción del ABA, el tejido macerado en nitrógeno líquido se incubó con bufer de extracción (1% PVPP, 10 mM HCl en metanol puro) durante 12 horas a 4°C

en agitación. Posteriormente, se centrifugó a 8000 g por 10 min y al sobrenadante se le ajustó el pH a 7.0 con una solución 1 mM de Tris, pH 7.4. El metanol fue evaporado en un concentrador con vacío. El volumen de la muestra colocado en la placa de ELISA fue de 100  $\mu$ l y cada muestra se analizó por duplicado.

La prueba usada para la detección de ABA utiliza un anticuerpo monoclonal contra ABA que es sensible en un rango de 0.16-100 picomoles ABA/ml. La prueba usa un método de unión competitiva al anticuerpo que permite medir las concentraciones de ABA en los extractos de las plantas. El ABA marcado con fosfatasa alcalina se adiciona junto con el extracto de la planta a las microceldas cubiertas con anticuerpo de la placa de ELISA. Entonces se da una reacción competitiva de unión entre la cantidad conocida del ABA marcado y el ABA presente en la muestra. Se lava el ABA marcado no pegado y luego se adiciona el sustrato. El color amarillo producido es inversamente proporcional a la cantidad de hormona en la muestra. Las muestras se leen a 405 nm.

#### **Tratamiento con cicloheximida.**

Plantas de *Arabidopsis* transformadas con las dos construcciones, *Pvlea-18/GUS/nos* y *Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'*, fueron sujetas a tratamiento con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas. Las plantas fueron crecidas en medio GM por 3 semanas y fueron tratadas en condición de hidroponía con: 1) 100  $\mu$ M de ABA, 2) 100  $\mu$ M de ABA y 10  $\mu$ M de cicloheximida, 3) 10  $\mu$ M de cicloheximida (Sigma-Aldrich) y 4) sin ninguno de estos dos compuestos. Los tratamientos se hicieron por 24 horas bajo luz difusa, después de lo cual las plantas fueron procesadas para análisis fluorométrico.

#### **Experimento de determinación del sitio de inicio de la transcripción (“primer extensión”).**

Para determinar el sitio de inicio de la transcripción se aisló RNA total a partir de plántulas de frijol de 6 días, sometidas a un estrés hídrico de  $-0.32$  Mpa por 72 horas (Logemann *et al.*, 1987). 30  $\mu$ g del RNA aislado fue hibridado con 100 ng del oligonucleotido 5' GTCTTTTCTCCTTCTCC 3' marcado con  $\gamma^{32}$ P en buffer de hibridación (0.3 M NaCl; 0.03 M Tris-HCl, pH 8). La hibridación se realizó calentando a 90 °C por 3 minutos y dejando enfriar lentamente hasta 40 °C. Para la extensión se adicionaron 35U de inhibidor de RNAsa, 0.5 mM de DTT y 0.15 mM de dNTPS y se

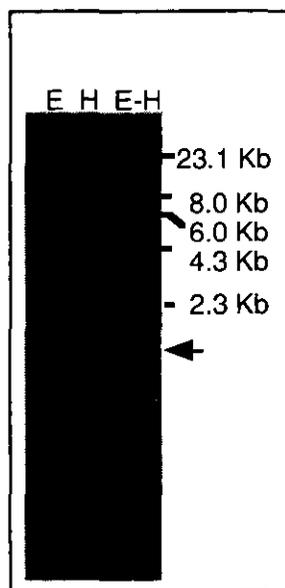
incubó por 90 minutos a 47°C con 4 U de transcriptasa inversa (SUPERSCRIP<sup>TM</sup> Rnase H, GIBCO BRL). Después de la precipitación el producto de extensión fue resuspendido en 10 µl de agua bidestilada y fue analizado en un gel de secuencia del 6 % (Maniatis *et al.*, 1982).

## RESULTADOS ADICIONALES

En esta sección se presentan experimentos que no fueron incluidos en el artículo o bien, aquellos que se mencionan como datos no mostrados en el artículo.

### El gen *Pvlea-18* está presente en el genoma de frijol en una sola copia.

Para determinar el número de copias del gen *Pvlea-18* en el genoma de las plantas de frijol, se hizo un experimento tipo Southern. El DNA se digirió independientemente con dos enzimas de restricción, *Eco* RI y *Hind* III. Como sonda se utilizó el cDNA del gen *Pvlea-18*. Los resultados muestran que el gen *Pvlea-18* se encuentra en el genoma de frijol en una copia ya que en las digestiones sencillas



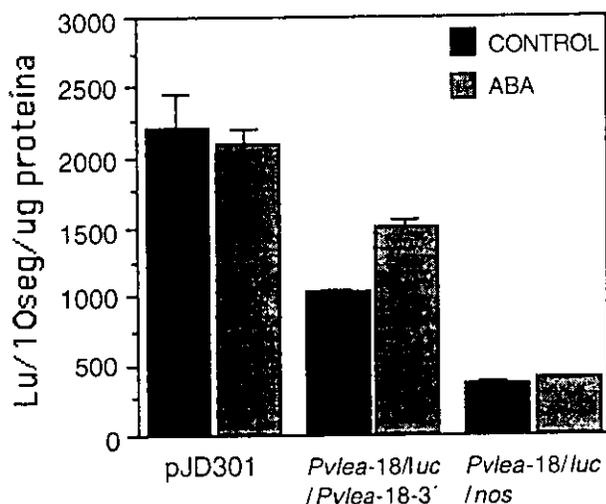
**Figura 1** Southern blot de DNA de plantas de frijol digerido independientemente con las enzimas *Eco* RI (E) y *Hind* III (H).

sólo fue posible detectar una banda de hibridación en condiciones de alta astringencia. En las dobles digestiones se observaron dos bandas cuyos pesos sumados corresponden al peso de la banda obtenida en la digestión simple. Estos resultados indican la presencia de una sólo copia del gen *Pvlea-18* en el genoma de frijol (Figura 1).

## EXPERIMENTOS DE EXPRESION TRANSITORIA

**El gen *Pvlea-18* no se induce por ABA en experimentos de expresión transitoria en protoplastos de células embrionarias de cotiledón de frijol.**

Para la expresión transitoria en protoplastos, se utilizó el plásmido pJD301, que tiene la construcción *CaMV35SW-luciferasa-nos*. En este plásmido se hicieron dos construcciones: en una se reemplazó el *CaMV35S-W* por el promotor del gen *Pvlea-18* (*Pvlea-18/luciferasa/nos*) y en la otra, además del promotor, se sustituyó el terminador *nos* por la región 3' del *Pvlea-18* (*Pvlea-18/luciferasa/ Pvlea-18-3'*).



**Figura 2.** Expresión transitoria del gen quimérico *Pvlea-18/luc* en protoplastos de células embrionarias de cotiledón de frijol. Los protoplastos transformados fueron analizados después de ser incubados por 16 horas en 100  $\mu$ M de ABA (barras negras) o sin ABA (barras grises). En cada columna los datos representan el promedio de al menos seis experimentos independientes. Las barras de error representan el error estándar. El plásmido pJD301, que contiene el gen luciferasa (*luc*) dirigido por el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (*CaMV*) se usó como control.

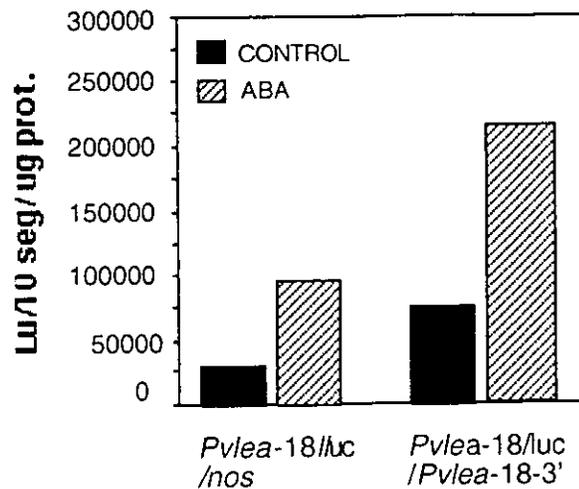
Se obtuvieron protoplastos a partir de un cultivo de células embrionarias de cotiledón de frijol (León *et al.*, 1992). En estas células, por un ensayo tipo Northern, se detectó la inducción del gen *Pvlea-18* con ABA 50  $\mu$ M. Esto demostró que en este cultivo celular el gen *Pvlea-18* mantiene la respuesta a ABA.

Los protoplastos fueron transformados con la construcción que contiene la región de 2058 pb correspondiente a la región promotora del gen *Pvlea-18*. En los

experimentos realizados se detectó la expresión de los dos genes quiméricos en los protoplastos, tanto en condiciones control como en los tratados con ABA; sin embargo, no fue posible detectar la inducción esperada de la expresión del gen *Pvlea-18* por ABA (Figura 2). Como control se usó el gen quimérico *CDeT27-45/GUS* (promotor de un gen de *C. plantagineum* el cual se ha reportado como inducible por ABA hasta 10 veces en plantas transgénicas de tabaco). Este gen se fusionó al gen de la  $\beta$ -Glucuronidasa y después del tratamiento con ABA, tampoco fue posible detectar la inducción esperada; ya que sólo se notó una inducción de aproximadamente 1X. Hemos hipotetizado que la ausencia de respuesta a ABA podría deberse a una alteración en el sistema de percepción o internalización de ABA; ya que otras posibilidades como la integridad de la región promotora fueron descartadas. Aún así, fue posible notar que la expresión observada es mayor en la construcción que tiene las regiones 5' y 3' del gen *Pvlea-18* que en la que tiene el terminador *nos* (Figura 2).

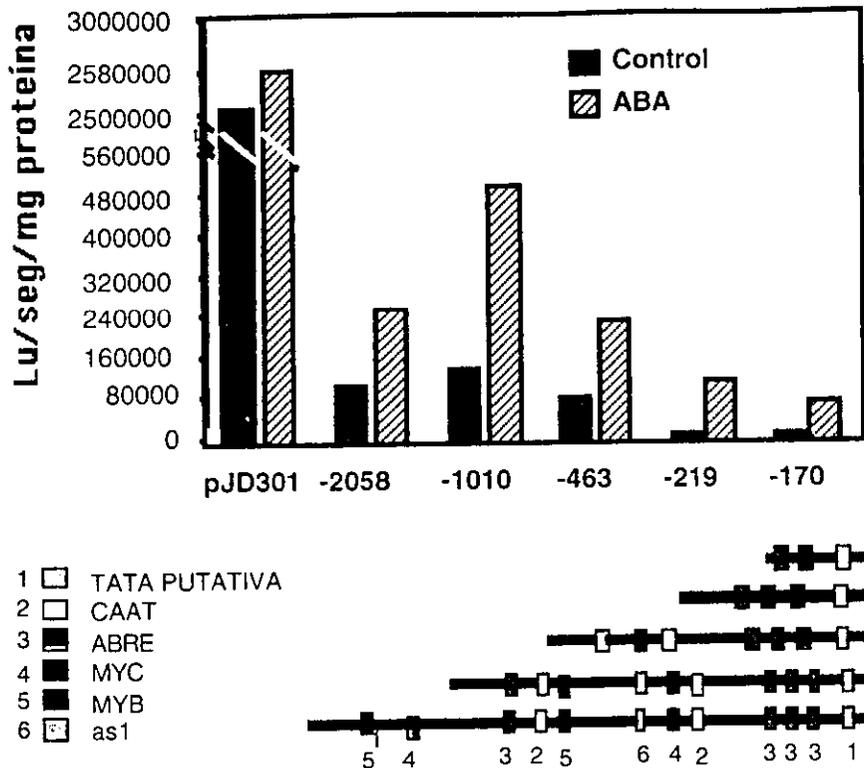
#### **El gen *Pvlea-18* se induce por ABA en experimentos de expresión transitoria en células de tabaco.**

Dada la baja inducción en respuesta a ABA en los protoplastos de frijol, también se llevaron a cabo estudios de expresión transitoria en células de tabaco. En estos se utilizaron los plásmidos con las construcciones ya descritas para los experimentos de expresión transitoria en protoplastos y diferentes deleciones de una de estas (*Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'*) como se muestra en las figuras 3 y 4. En los experimentos de transformación con los dos genes quiméricos se observó una inducción de la expresión del gen reportero por ABA de 5 a 8 veces, no observándose diferencias entre las células transformadas con las dos construcciones. La expresión observada en células no tratadas es mayor en la construcción que tiene las regiones 5' y 3' del gen *Pvlea-18*, que en la construcción con el terminador *nos* (Figura 3).



**Figura 3.** Las células de tabaco bombardeadas con diferentes deleciones del promotor fueron analizadas después de 3 días de incubación con ABA 100  $\mu$ M (barras rayadas) o sin ABA (barras negras).

Con la finalidad de definir con más detalle los elementos de la región promotora involucrados en la regulación del gen *Pvlea-18*, las células fueron transformadas con la construcción *Pvlea-18/luciferasa/Pvlea-18-3'* y construcciones que incluyen diferentes deleciones la región promotora. (Figura 4). En la primera deleción (-1010), se observó un incremento de la expresión del gen reportero del 20% en la condición control y 50% en respuesta a ABA respecto a las células transformadas con la región promotora completa.



**Figura 4.** Las células de tabaco bombardeadas con diferentes deleciones del promotor fueron analizadas después de 3 días de incubación con ABA 100  $\mu$ M (barras amarillas) o sin ABA (barras rojas). Todas las construcciones deletadas tiene en terminador 3' del gen *Pvlea-18*. Diferentes deleciones de la región promotora de 2058 pb del gen *Pvlea-18* usadas en los experimentos de expresión transitoria en células de tabaco fueron hechas por PCR.

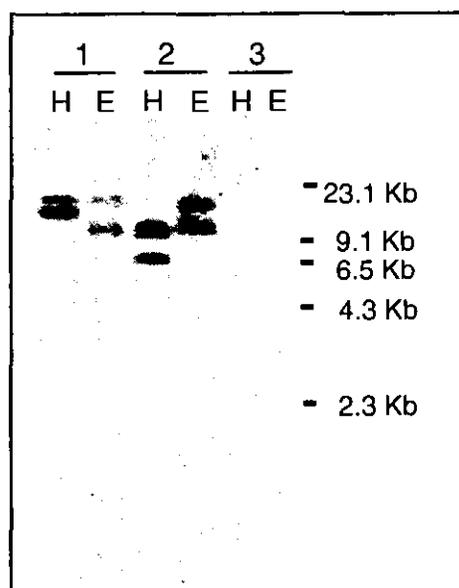
En las deleciones restantes se observó una tendencia hacia la disminución de la expresión (Figura 4). Cuando se deleta el elemento MYB, la caja CAAT y un núcleo de caja G localizados entre  $-748$  y  $-592$ , la expresión del gen reportero en condición control disminuye en un 30% y en respuesta a ABA en un 50% respecto a la deleción anterior. Deleciones posteriores, cerca al sitio de inicio de la transcripción, resultan en una pérdida progresiva de la actividad tanto en la condición control como en respuesta a ABA. En la última deleción probada ( $-170$ ) también se observa una disminución notoria de la expresión en la condición control aunque sigue presentándose respuesta alta a ABA. En esta deleción se elimina un elemento conocido como "strong ABRE" que es una caja G, pero quedan aún dos cajas tipo

ABRE ubicadas en la posiciones -102 y -73 respecto al inicio de transcripción, lo cual explicaría la respuesta remanente a ABA .

## EXPERIMENTOS DE EXPRESION ESTABLE

Dos copias de los genes quiméricos *Pvlea-18/GUS/nos* y *Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'* se integraron al genoma de cada planta de *Arabidopsis*.

Para determinar el número de copias de los transgenes insertadas en el genoma de las plantas transformadas (vease materiales y métodos y resultados en artículo), se hizo un experimento tipo Southern usando como sonda un fragmento de 2 kb de DNA, correspondiente a la región promotora del gen *Pvlea-18*.

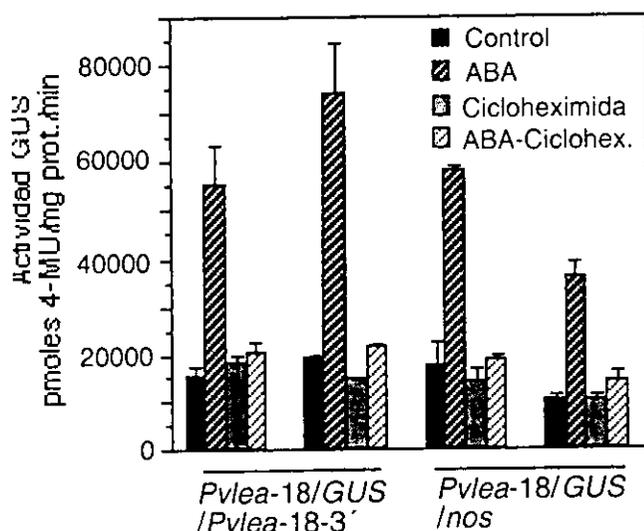


**Figura 5.** Southern blot de plantas de *Arabidopsis* transformadas con las construcciones *Pvlea-18/GUS/nos* (1), *Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'* (2) y *35S/GUS/nos* (3). El DNA fue digerido con las enzimas *Hind* III (H) y *EcoR* I (E).

Las plantas transgénicas que contienen las dos construcciones presentaron en promedio dos copias del transgen. La figura 5 muestra una planta transgénica representativa de cada transgen.

## La inducción del gen *Pvlea-18* por ABA es dependiente de la síntesis de proteínas.

El gen *Pvlea-18* responde a ABA, en plantas tanto de frijol como de *Arabidopsis*. De acuerdo a la literatura, los genes que responden a ABA pueden ser incluidos en dos grupos: los que para su inducción requieren de la síntesis de proteínas y los que son independiente de ésta. Con el fin de determinar a que grupo



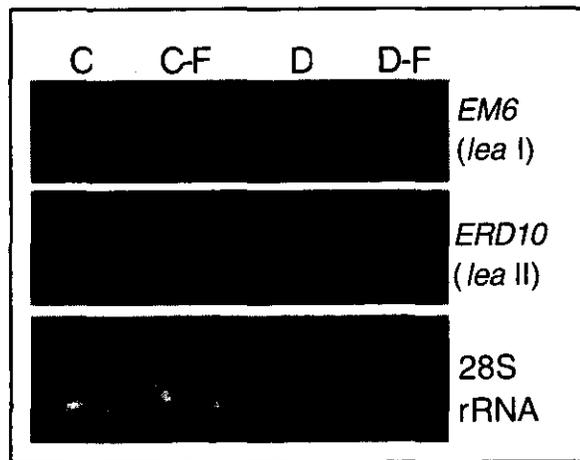
**Figura 6.** Expresión estable de los genes quiméricos *Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'* y *Pvlea-18/GUS/nos* en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Las plantas fueron crecidas en medio de crecimiento GM por 3 semanas a 24 °C bajo condiciones de 16h luz/8h oscuridad (véase materiales y métodos en artículo). Posteriormente las plantas fueron sometidas por 24 horas a tratamiento en hidroponía con 100  $\mu$ M de ABA (barras negras con rayas blancas); 10  $\mu$ M de cicloheximida (barras grises); 100  $\mu$ M de ABA y 10  $\mu$ M de cicloheximida (barras blancas con rayas negras) o con agua (barras negras). Los datos fueron obtenidos de dos líneas transgénicas independientes representativas para cada construcción como se muestra en la figura. Para cada línea se analizaron 9 plantas y las barras de error representan el error estándar.

pertenece el gen *Pvlea-18*, se realizaron experimentos usando un inhibidor de la síntesis de proteínas (Figura 6). Se observó que en las plantas con cualquiera de las dos construcciones (*Pvlea-18/GUS/nos* y *Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'*) hay una inducción semejante por ABA, como ya se había observado en otros experimentos. Sin embargo, en las plantas que fueron tratadas simultáneamente con ABA y el

inhibidor de la síntesis de proteínas, no se aprecia inducción. Esto sugiere que la inducción por ABA del gen *Pvlea-18* es dependiente de la síntesis *de novo* de proteínas. En las plantas tratadas sólo con cicloheximida, se observaron los mismos niveles de inducción de *GUS* que en las no tratadas. lo cual indica que la expresión del gen durante el desarrollo normal no depende de la síntesis *de novo* de proteínas.

### **Niveles de mRNA de dos genes *lea* inducidos por ABA en plantas de *A. thaliana* sometidas a tratamiento con fluridona.**

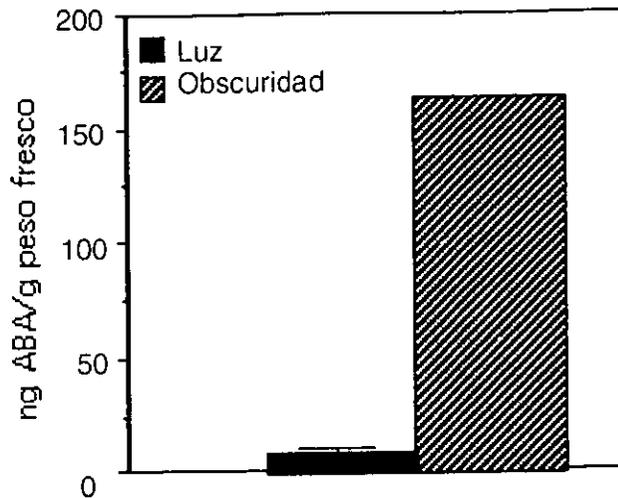
Con la finalidad de verificar el efecto de la fluridona en los experimentos mostrados en la Figura 4, sobre la biosíntesis de ABA, se analizó la expresión de dos genes *lea* de *Arabidopsis* (*EM6* y *ERD10*) que se inducen por ABA y deshidratación. Para el *EM6*, que corresponde a un gen *lea* de la familia I, se observó que se induce durante deshidratación pero no en plantas que han sido tratadas previamente con fluridona, donde se ha inhibido la síntesis *de novo* de ABA (Figura 7). Esto indica que su respuesta durante deshidratación se da a través de una vía dependiente de ABA. Para el *ERD10*, un gen *lea* de la familia II, se observó un comportamiento similar al del gen *Pvlea-18*. Este gen se induce por deshidratación, tanto en plantas tratadas con fluridona como en plantas no tratadas. Esto indica que su respuesta durante deshidratación es independiente de ABA. La respuesta diferencial de estos dos genes, en plantas tratadas con fluridona, indica que la fluridona afectó la síntesis de ABA y, en consecuencia tiene efecto sobre la transcripción de genes que responden a deshidratación.



**Figura 7.** Patrones de expresión de dos genes *lea* en plantas de *Arabidopsis* tratadas con fluridona. Los RNAs totales fueron extraídos a partir de plantas completas de 3-4 semanas: en ausencia de tratamiento (C); tratadas con fluridona (C-F); deshidratadas (D) o tratadas con fluridona y posteriormente deshidratadas (D-F).

### **Las plantas de *Arabidopsis* presentan altos niveles de ABA durante el crecimiento etiolado**

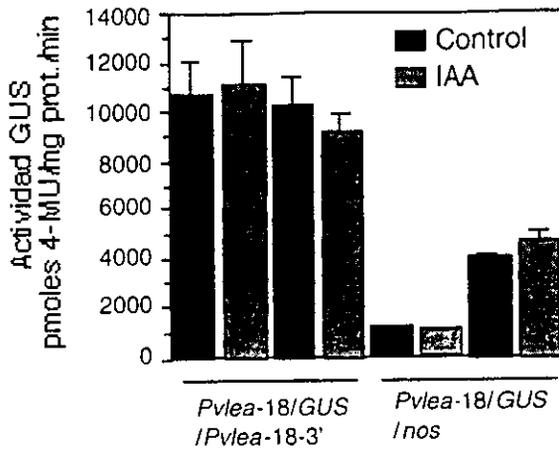
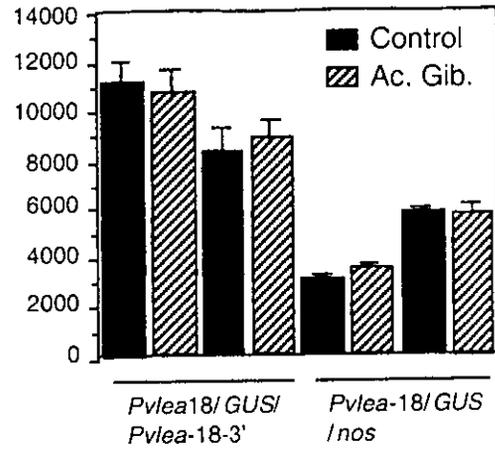
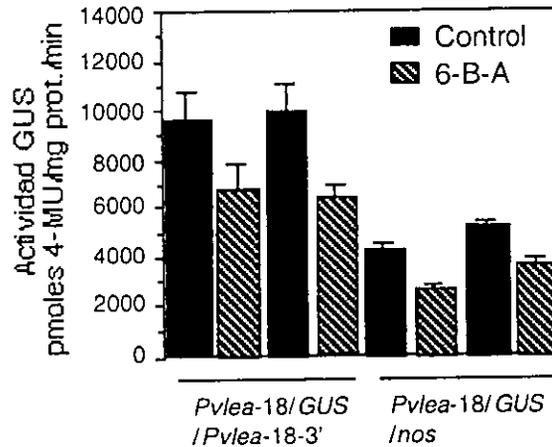
Cuando las plantas de *Arabidopsis* fueron crecidas en condiciones etioladas, la actividad de GUS disminuyó, tanto en el hipocotilo como en la raíz. Esto se observa en la figura 7A y 7B del artículo. Con el fin de determinar el papel de ABA en la regulación negativa, que se presenta durante el crecimiento en obscuridad, se cuantificaron los niveles de ABA en plántulas de 6 días después de germinadas. Se observó que durante el crecimiento etiolado los niveles de ABA aumentaron 21.8 veces (Figura 8).



**Figura 8** Niveles de ácido abscísico en plantas de *Arabidopsis* de 6 días después de germinadas. Las plantas fueron crecidas en condiciones de 16h luz/8h obscuridad (barra negra) o en obscuridad continua (barra rayada). La cuantificación se hizo con un anticuerpo monoclonal usando la técnica de ELISA utilizando el estuche distribuido por Agdia. Cada barra representa el promedio de 25 plantas y las barras de error representan el error estándar.

**Durante el desarrollo normal el gen *Pvlea-18* no está regulado por las hormonas IAA, ácido giberélico y 6-Benzil aminopurina.**

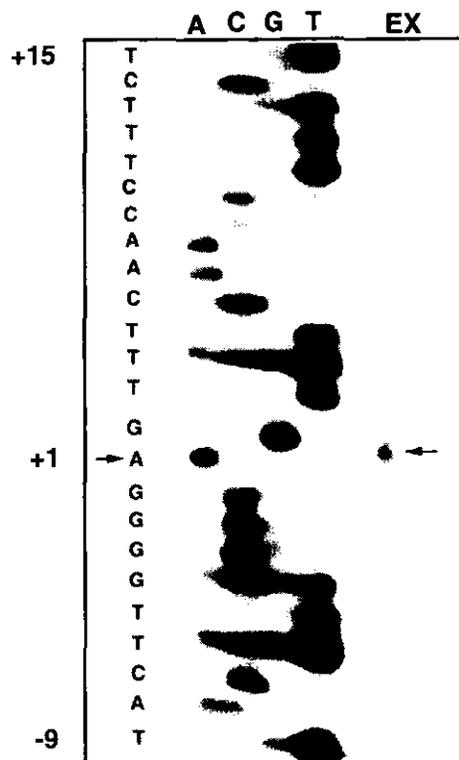
Con el fin de determinar los factores que regulan la expresión del gen *Pvlea-18* durante desarrollo, plantas de 4 semanas después de germinadas crecidas en medio GM, fueron tratadas en condición de hidroponía con las hormonas ácido indolacético (IAA) (4,5  $\mu$ M por 24 horas en obscuridad), ácido giberélico (100  $\mu$ M por 44 horas) y 6-benzil-aminopurina (BAP) (1 $\mu$ M por 12 horas). Después del tratamiento, las plantas completas fueron sometidas a tinción histoquímica y a cuantificación fluorométrica. Bajo las condiciones usadas, no se observó regulación de la expresión del gen reportero por ninguna de las tres hormonas (Figura 9). Los bajos niveles de expresión en las plantas tratadas con 6-benzyl -aminopurina se deben a que esta hormona induce senescencia en plantas de *Arabidopsis*. Estos resultados se mencionan en el artículo como datos no mostrados.

**A****B****C**

**Figura 9.** Expresión estable de los genes quiméricos *Pvlea-18/GUS/Pvlea-18-3'* y *Pvlea-18/GUS/nos* en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Las plantas fueron crecidas en medio de crecimiento GM por 3 semanas a 24 °C bajo condiciones de 16h luz/8h oscuridad (vease materiales y métodos en artículo). Posteriormente las plantas fueron sometidas por 24 horas a tratamiento en hidroponía, con las hormonas ácido indolacético (IAA) 4,5  $\mu$ M por 24 horas en oscuridad (A), ácido giberélico 100  $\mu$ M por 44 horas (B) y 6-Benzil-Aminopurina (BAP) (1 $\mu$ M por 12 horas) (C). Los datos fueron obtenidos de dos líneas transgénicas independientes, representativas para cada construcción como se muestra en la figura. Para cada línea se analizaron 12 plantas y las barras de error representan el error estandar.

## Determinación del sitios de inicio de transcripción.

Para establecer el sitio de inicio de la transcripción un oligo complementario a la secuencia entre las posiciones +25 y +42 se hibridó con



**Figura 10.** Determinación del sitio de inicio de la transcripción del gen *Pvlea-18*. Un oligo de 18 pb fue hibridado con RNA total obtenido de plántulas de frijol de 6 días deshidratadas durante 72 horas.

RNA total aislado de plántulas deshidratadas de frijol y se extendió con transcriptasa reversa. El experimento dió como resultado en todos los casos la extensión de un solo producto. De acuerdo con estos resultados el sitio de inicio de la transcripción para el gen *Pvlea-18* se encuentra a 22 pb hacia arriba del codón de iniciación de la traducción (Figura 10), lo cual define una región líder en el transcrito de tan sólo 22 nucleótidos.

## DISCUSION

Los genes *lea* codifican para un grupo heterogéneo de proteínas que han sido clasificadas en seis familias con base en su similitud de secuencia. Estas proteínas tienen una alta expresión durante los últimos estados del desarrollo de la semilla, y en tejidos vegetativos en respuesta a estrés hídrico. A pesar de que su función aún se desconoce, la regulación de su expresión se ha estudiado en muchos casos. Esta información ha evidenciado que la expresión de algunos de estos genes durante el déficit hídrico es mediada por ABA, a través de diferentes elementos en *cis* y factores de transcripción. Sin embargo, se sabe que algunos genes *lea* se regulan, durante déficit hídrico, de una manera independiente de ABA. Esto ha sugerido la existencia de una vía de transducción independiente de ABA, entre la señal inicial de estrés hídrico y la expresión específica de genes (Yamaguchi-Shinozaki, 1993). Un gran número de genes *lea* presentan altos niveles de expresión durante estrés o en respuesta a ABA, pero muy poca o ninguna inducción durante el desarrollo. Los genes que se expresan en plantas crecidas en condiciones de no estrés lo hacen principalmente en órganos y estructuras que sufren desecación, tales como el polen y las semillas. Sin embargo, recientemente existen datos que indican que algunos genes *lea* presentan expresión durante el desarrollo, en estructuras no relacionadas con desecación (Iwasaki *et al.*, 1995; Rouse *et al.*, 1996).

En este trabajo se demuestra que la expresión del gen *Pvlea-18* en respuesta a deshidratación y durante el desarrollo normal se regula principalmente a nivel transcripcional. Los patrones de expresión del gen, observados en las plantas transgénicas, son similares a los encontrados para la proteína y el transcrito del gen en plántulas de frijol (Colmenero-Flores *et al.*, 1997; Colmenero-Flores *et al.*, 1999). Esto indica que la región 5' de 2058 pb que incluye la región 5'-UTR de 22 pb y la región 3' de 600 pb usadas en las construcciones contienen los elementos en *cis* involucrados en la expresión del gen durante desarrollo y en respuesta a deshidratación. Cabe anotar que estos resultados también muestran que *Arabidopsis* es un buen modelo para el estudio de la expresión del gen *Pvlea-18* dada la fidelidad de su expresión respecto a la expresión observada en plantas frijol.

En *Arabidopsis*, durante el desarrollo, se observó una alta expresión en plantas en elongación, así como en pétalos, anteras, granos de polen, semillas secas e hidátodos de las hojas. La expresión más alta se detectó en raíces y tejidos meristemáticos del tallo, cuando las plantas fueron crecidas en condiciones normales de luz. Datos similares a éstos fueron hallados en frijol para la proteína y el transcrito

(Colmenero-Flores *et al.*, 1999). En *Arabidopsis* se observó un incremento significativo en la expresión durante la formación de raíces laterales, donde la primera señal se detecta cuando las células de la endodermis empiezan a diferenciarse. Puesto que esta regulación del gen durante el desarrollo normal no puede estar dada por ABA, una hormona de estrés, cuyos efectos tienen que ver con el detenimiento o retardamiento del crecimiento, indagamos el posible papel de otras hormonas relacionadas a procesos de crecimiento y desarrollo como son las auxinas, giberelinas y citokinas. No obstante, ninguna de estas hormonas parece tener un papel en la regulación del gen. Por otra parte, el patrón de expresión del gen durante el desarrollo correlaciona significativamente con la presencia del elemento en *cis as1* en la región promotora del gen *Pvlea-18*, el cual parece conferir expresión principalmente en raíces maduras, en tejidos embrionarios destinados a raíz y en tejidos vasculares (Benfey y Chua, 1990). Hasta ahora no se sabe que factores regulan la expresión vía *as1*, sólo se ha descrito para el elemento *as1* presente en el virus del mosaico del coliflor una regulación a través de ácido salicílico, una hormona relacionada con la respuesta de las plantas a patógenos. De esta manera, la regulación del gen podría estar mediada por elemento *as1* y depender de factores diferentes o adicionales a las hormonas.

Para muchos genes de plantas involucrados en diferentes procesos, se ha encontrado que la región 3' participa en la regulación de la expresión (Dean *et al.*, 1989; Dietrich *et al.*, 1992). Por lo tanto, el estudio de la región 3' ha mostrado ser importante para conocer los niveles apropiados de expresión de un gen. Aunque los factores en *cis* de genes que responden a deshidratación (incluyendo los genes *lea*) han sido analizados extensivamente, el papel de la región 3' durante la respuesta a deshidratación no ha sido previamente estudiado. En este trabajo se demuestra que la región 3' del gen *Pvlea-18* tiene un efecto aumentador específico en la expresión del gen durante el desarrollo y en respuesta a deshidratación, aunque no se determina si la regulación por la región 3' es a nivel transcripcional o postranscripcional. Por un lado, podría ser que la región 3' esté involucrada en la regulación transcripcional del gen, a través de la presencia de secuencias que permitan la unión de proteínas que a su vez interactúen con los factores de transcripción específicos, confiriéndole mayor estabilidad al complejo de inicio de la transcripción como se ha sugerido para algunos genes de plantas (Dean *et al.*, 1989; Larkin, *et al.*, 1993; Fu *et al.*, 1995). De otro lado, la región 3' podría estar ejerciendo una regulación postranscripcional, incrementando la estabilidad del mensajero (Chan and Yu., 1998) o la tasa de traducción (Lui and Redmond, 1998).

Independiente del tipo de regulación que se esté presentando, es el primer gen tipo *lea* para el que se demuestra que la región 3' tiene una función en la regulación. Estos datos indican que el análisis de la regulación de un gen de respuesta a deshidratación, así como a otros estímulos, debe incluir el análisis de la región 3', pues en algunos genes un porcentaje importante de la regulación puede estar dado por esta región, como sucede para el gen *Pvlea-18*. Estudios posteriores serán necesarios para determinar el mecanismo específico involucrado en la regulación del gen *Pvlea-18*.

Este efecto aumentador no se observa en respuesta a ABA, lo cual sugiere que en la respuesta a deshidratación está involucrada una vía independiente de ABA. Estos datos están apoyados por la poca disminución de la expresión del gen observada en plantas deshidratadas tratadas previamente con fluridona, un inhibidor de la biosíntesis de ABA (Figura 4, artículo). Sin embargo, no se puede descartar la existencia de una alta sensibilidad a ABA durante el déficit hídrico. Como ya se mencionó puesto que el efecto aumentador fue detectado en respuesta a deshidratación pero no a ABA, podría ser que el elemento aumentador putativo interactúe con componentes adicionales que participen en la regulación del gen *Pvlea-18* en respuesta al estrés hídrico pero no con aquellos involucrados en la regulación dependiente de ABA. Puesto que se ha demostrado que las vías dependientes e independientes de ABA pueden interactuar y converger para activar algunos genes que responden a estrés osmótico (Ishitani *et al.*, 1997; Moller and Chua, 1999), podría plantearse que la expresión del gen *Pvlea-18* bajo condiciones de estrés hídrico requiere la participación de la dos vías, a través de factores transcripcionales que interactúan tanto con elementos de la región 5' como con la 3'. Estos resultados muestran que la función combinada de elementos de las regiones 5' y 3' no codificante es crítica en la regulación de la expresión del gen *Pvlea-18* durante deshidratación.

Como lo demuestran los resultados ya mencionados, ABA no parece tener un papel importante en la respuesta del gen *Pvlea-18* a deshidratación. Sin embargo, el hecho de que este gen sea capaz de responder a tratamientos de ABA, sugiere que muy probablemente esta fitohormona está involucrada en la modulación del gen durante procesos adicionales, como el desarrollo de la semilla durante la fase tardía, donde se sabe que ABA se acumula. Consistente con estas observaciones, el análisis de la región promotora muestra la presencia de varios elementos tipo ABRE, así como de elementos en *cis* involucrados en la regulación mediada por ABA y dependiente de la síntesis de proteínas como MYC y MYB (Figura 1, artículo).

Experimentos de inhibición de la síntesis de proteínas mostraron que la respuesta a ABA es completamente dependiente de la síntesis de proteínas (Figura 6, resultados adicionales). Sin embargo, esto no permite determinar que tipo de factores son funcionales durante la respuesta a ABA, pues se han descrito como dependientes de la síntesis de proteínas tanto elementos tipo ABRE como elementos tipo Myc y Myb. De otro lado, aunque la respuesta del gen durante deshidratación es independiente de ABA, la región promotora no presenta secuencias similares a las hasta ahora descritas, como elementos de respuesta a deshidratación (DRE) en *Arabidopsis* (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994). Esto sugiere que la respuesta independiente de ABA puede estar dada por un nuevo elemento en *cis* tipo DRE o por la región 3'.

En experimentos de expresión transitoria en células de tabaco, usando diferentes deleciones de la región promotora, se observó, en la primera deleción (-1030), un incremento cercano al 50% en la expresión del gen en respuesta a ABA (Figura 4, resultados adicionales). Esto sugiere la posible presencia de un elemento represor de la expresión en respuesta a ABA ubicado en la región comprendida entre -2036 y -1010. En la segunda deleción (-463) se observó una reducción en la respuesta a ABA en un 50%, en esta se deletan una caja CAAT, un elemento Myb y un núcleo de caja G. Debido a los resultados obtenidos, es posible que alguna de estas secuencias esté involucrada en la respuesta a ABA; sin embargo no es posible concluirlo a partir de este experimento, pues podría tratarse de otra secuencia ubicada en la región eliminada. En posteriores deleciones se observó un decremento en la respuesta a ABA, que no permite definir cual o cuales de los elementos putativos de respuesta a ABA son funcionales. En la última deleción probada (-170) continúa habiendo una respuesta de 3.0 veces a ABA, lo cual sugiere que los elementos presentes en esta región (una caja G y dos núcleos de caja G) podrían estar involucrados de una manera importante en la respuesta a ABA.

Cuando se germinaron las plantas de *Arabidopsis* en condiciones etioladas, se observó una alta expresión en las plántulas hasta las 36 horas después de germinadas. A partir de este punto la expresión disminuyó, especialmente en raíces. Un comportamiento similar se observó en plantas de frijol crecidas en obscuridad, donde el transcrito desaparece en la raíz el día 5° después de la imbibición (Colmenero-Flores *et al.*, 1999). La disminución progresiva de la actividad de GUS detectada durante el crecimiento etiolado, indica una regulación negativa de la expresión del gen, la cual, como se demuestra en este trabajo, no se da directamente por la luz. Esta regulación se da no obstante los altos niveles de ABA

presentes en las plantas etioladas (Figura 8, resultados adicionales), los cuales ya habían sido reportados en otros trabajos (Weatherwax *et al.*, 1996). Esto podría sugerir, bien que los niveles de ABA presentes en obscuridad no son suficientes para inducir a expresión del gen *Pvlea-18* o que el ABA presente en las plantas etioladas se encuentra compartimentalizado y no disponible para cumplir su papel como señalizador. Sin embargo, varios genes regulados por ABA presentan un comportamiento diferente. Así, los genes *NPR* y el gen *Em* de trigo que codifica para una proteína LEA del grupo I están regulados por luz negativamente, de manera que en condiciones de obscuridad se incrementa su expresión y esto se ha asociado al incremento de ABA bajo estas condiciones (Weatherwax *et al.*, 1996). Esto indica que en condiciones de obscuridad el ABA no está completamente compartimentalizado y la ausencia de inducción del gen *Pvlea-18* podría deberse a que los niveles de ABA disponibles no son suficientes para inducir su expresión.

A partir del análisis de los patrones de expresión de GUS en *Arabidopsis*, es posible concluir que el gen *Pvlea-18* se expresa durante el desarrollo particularmente en órganos o tejidos que están expuestos a bajos potenciales osmóticos donde el gen estaría cumpliendo la misma función que durante estrés (McCully, 1994; Colmenero-Flores *et al.*, 1999). También, el hecho de que el gen esté altamente expresado en plantas en regiones de crecimiento y meristemas, sugiere que la PvLEA-18 es una proteína que proporciona protección en los estados iniciales de desarrollo o en tejidos que tienen que contener contra un cambio osmótico severo o constante. En estas situaciones, podría funcionar como parte de un mecanismo preventivo que proporciona a la planta protección, en especial en los tejidos que durante el estrés hídrico pueden sufrir un daño severo e irreversible, como son los tejidos meristemáticos. Esta protección constitutiva le permitiría a la planta amortiguar el estrés, mientras ésta produce respuestas adaptativas adicionales. Parece ser que varios genes podrían tener una función similar y aunque no se han estudiado exhaustivamente sus patrones de expresión durante el desarrollo en *Arabidopsis* se ha reportado un gen, el *Xero2/Iti30*, que presenta patrones de expresión muy similares al gen *Pvlea-18* durante desarrollo y por tanto podría tener una función semejante. La expresión durante el desarrollo también indica que muchos genes que se expresan durante estrés, tienen funciones específicas durante el desarrollo, probablemente asociadas con las que dichos genes tienen durante un determinado estrés.

En conclusión, en este trabajo se demuestra que el gen *Pvlea-18* está regulado por un complejo mecanismo transcripcional, puesto que su expresión es

modulada no sólo durante desarrollo y bajo crecimiento etiolado, sino en respuesta a deshidratación. En estas condiciones, la región 3' parece ser necesaria para obtener un nivel óptimo de expresión. También se muestra que, aunque el gen *Pvlea-18* responde a aplicaciones exógenas de ABA, su respuesta a deshidratación es en su mayor parte independiente de ABA, sugiriendo que esta hormona modula la expresión del gen durante procesos adicionales, como la maduración de la semilla.

## CONCLUSIONES

- \* La región promotora de 2058 pb del gen *Pvlea-18*, usada en este análisis, permite la expresión de este gen durante el desarrollo y en respuesta a deshidratación y a ABA.
- \* La expresión del gen *Pvlea-18*, es regulada principalmente a nivel transcripcional, en respuesta a deshidratación y durante el desarrollo,
- \* Los patrones de expresión del gen *Pvlea-18* en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, en respuesta a deshidratación y durante el desarrollo, son semejantes a los observados en plantas de frijol, lo cual valida el uso de ésta planta como modelo para estudiar los factores que regulan este gen.
- \* El gen *Pvlea-18* se expresa durante el desarrollo normal, particularmente en órganos o tejidos que están expuestos a bajos potenciales osmóticos como semillas secas, polen, cilindro vascular e hidátodos. Además se expresa en plantas en elongación, en raíces y raíces emergentes.
- \* Los patrones de expresión del gen *Pvlea-18* durante el desarrollo son consistentes con la presencia del elemento *as1*.
- \* La región 3' del gen *Pvlea-18* presenta un efecto durante el desarrollo y en respuesta a deshidratación, que se da principalmente a través de una vía independiente de ABA.
- \* El gen *Pvlea-18* es negativamente regulado durante el crecimiento etiolado y esta regulación no depende directamente de la luz y es independiente de ABA.

## PERSPECTIVAS

### **1. Caracterización del papel específico de la región 3' del gen *Pvlea-18* en la regulación del gene *Pvlea-18* en condiciones de desarrollo normal y durante la respuesta a deshidratación.**

En este trabajo se demostró el papel de la región 3' del gen *Pvlea-18*, como regulador positivo en la expresión de este gen durante desarrollo y en respuesta a deshidratación; sin embargo, no se determinó el mecanismo por el cual la región 3' ejerce esta regulación. Debido a la importancia de esta regulación, resulta interesante averiguar la razón por la cual la región 3' del gen *Pvlea-18* es necesaria para obtener los niveles adecuados de expresión de este gen. La regulación conferida por la región 3' puede ser a nivel transcripcional o postranscripcional. Para determinar a cual de estos niveles tiene lugar la regulación, se pueden realizar experimentos de "run-on" para medir la tasa de transcripción *de novo* sin tener el fondo del mRNA acumulado. Esto permitirá determinar si existe una diferencia a nivel de la tasa de transcripción del gen entre las plantas transformadas, con la construcción que tiene el terminador de la nopalina sintasa y las que tienen el terminador del gen *Pvlea-18* en condiciones de desarrollo normal y en respuesta a deshidratación.

De otro lado, para probar el efecto aumentador conferido por la región 3' del gen *Pvlea-18* ésta podría ser colocada como terminador de otro gen en una construcción y por un experimento de expresión transitoria en protoplastos se podría determinar si tiene un efecto aumentador en comparación con la misma construcción con una región terminadora diferente. Sin embargo, los resultados de este experimento deben verse con cuidado pues una ausencia del efecto aumentador solo podría indicar que es necesaria una interacción específica entre la region 3' y 5' de este gen para obtener dicho efecto.

### **2. Determinación de factores que regulan la expresión del gen durante desarrollo.**

Debido a que la presencia del elemento *as1* en la región promotora del gen *Pvlea-18* correlaciona con los patrones de expresión del gen, sería importante determinar qué factores regulan su expresión a través de este elemento. Puesto que

las hormonas probadas hasta ahora no mostraron estar implicadas en esta regulación, resulta interesante probar el posible papel de otras hormonas como el ácido salicílico. De otro lado, también sería interesante determinar la funcionalidad del elemento *as1* haciendo mutaciones para demostrar su participación en la regulación del gen *Pvlea-18*.

### **3. Identificación de los elementos en *cis* que permiten la expresión del gen *Pvlea-18* en respuesta a deshidratación.**

Ya que en este trabajo se demostró que la respuesta del gen *Pvlea-18* durante deshidratación es en su mayor parte independiente de ABA, sería interesante determinar los elementos en *cis* que están mediando dicha respuesta. Esto podría hacerse en primer lugar generando deleciones de la región promotora y transfiriéndolas a plantas de *Arabidopsis* vía *Agrobacterium*, con el fin de determinar la ubicación de él o de los factores involucrados en la regulación. Una vez identificada la región, podría disectarse más detalladamente para identificar posibles elementos implicados en la regulación. Finalmente, para comprobar la participación de dichos elementos en la regulación, podrían hacerse experimentos de ganancia de función, en los cuales la regulación conferida por el supuesto elemento en *cis* sea probada en un promotor mínimo.

### **4. Determinar si otros genes *lea* tienen el mismo tipo de regulación que el gen *Pvlea-18* durante el crecimiento etiolado.**

Puesto que hasta ahora no se han reportado otros genes *lea* que presenten una regulación negativa durante el crecimiento etiolado, sería interesante determinar la presencia de este mecanismo de regulación en otros genes y poder asociarla con características particulares de estos genes, como su posible función. Esto podría hacerse para genes homólogos al *Pvlea-18*, como los que ya han sido detectados en plantas de *Arabidopsis* dentro de un proyecto que se desarrolla en el laboratorio.

## BIBLIOGRAFIA

- Abe, H., Yamaguchi-Shinosaki, K., UraO, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., and Shinosaki, K. (1997). Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9, 1859-1868.
- Baker, J., Steele, C., and Dure III, L. (1988). Sequence and characterization of 6 *Lea* proteins and their genes from cotton. *Plant Mol Biol* 11, 277-291.
- Benfey, P.N. and Chua, N.-H. 1990. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 250: 959-966 .
- Bohnert, H. J., and Jensen, R. G. (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *TIBTECH* 14, 89-97.
- Bray, E. A. (1991). Regulation of gene expression by endogenous ABA during drought stress. In *Abscisic Acid, physiology and biochemistry.*, W. J. Davies and H. G. Jones, eds. (Lancaster LA1 4YQ, UK: Bios Scientific Publisher), pp. 81-96.
- Bray, E. A. (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol* 103, 1035-1040.
- Bray, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2, 48-54.
- Busk, P. K., Jensen, A. B., and Pagés, M. (1997). Regulatory elements *in vivo* in the promoter of the abscisic acid responsive gene *rab17* from maize. *Plant J* 11, 1285-1295.
- Busk, P. K., and Pagés, M. (1998). Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol* 37, 425-435.
- Chan, M.T. and Yu, S.M. (1998). The 3' untranslated region of a rice alpha-amylase gene mediates sugar-dependent abundance of mRNA. *Plant J* 15: 685-695.

- Chandler, M. P., and Robertson, M. (1994). Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol* 45, 113-141.
- Church, G.M. and Gilbert, M. 1984. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1991-1995 .
- Close, T.J., Fenton, R.D., Yang, A., Asghar, R., DeMason, D.A., Crone, D.E., Meyer, N.C. and Moonan, F. (1993). Dehydrin: the protein. In *Plant responses to cellular dehydration during environmental stress*, T. J. Close and E. A. Bray, eds. (Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists), pp. 104-118.
- Colmenero-Flores, J. M., Campos, F., Garcíarrubio, A., and Covarrubias, A. A. (1997). Characterization of cDNA clones responsive to water deficit from *Phaseolus vulgaris* : a new late embryogenesis abundant protein. *Plant Mol Biol* 35, 393-405.
- Colmenero-Flores, J. M., Moreno, L. P., Smith, C. E., and Covarrubias, A. A. (1999). *Pvlea-18*, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiol* 120, 93-103.
- Covarrubias, A.A. and Garcíarrubio, A. (1994). Molecular characterization of the response to water deficit in *Phaseolus vulgaris* L. In *Phaseolus* beans advanced biotechnology research network, Roca, W.M., Mayer, J.E., Pastor-Corrales, M. A. and Tohme, J. eds. (International Center for Tropical Agriculture), pp. 341-350.
- Cutler, J. A., and Krochko, E. J. (1999). Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science* 4, 472-478.
- Dean, C., Favreau, M., Bond-Nutter, D, Bedbrook, J. and Dunsmuir, P. 1989. Sequences downstream of translation start regulate quantitative expression of two petunia *rbcS* genes. *Plant Cell* 1: 201-208.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J. (1983). A plant DNA Miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Reporter* 1: 19-22.

Dietrich, R.A., Radke, S.E. and Harada, J.J. (1992). Downstream DNA sequences are required to activate a gene expressed in the root cortex of embryos and seedlings. *Plant Cell* 4: 1371-1382.

Dure III, L. (1993). Structural motifs in *Lea* proteins. In *Plant responses to cellular dehydration during environmental stress*, T. J. Close and E. A. Bray, eds. (Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists), pp. 91-103.

Dure, L., Crouch, M., Harada, J., Ho, T.-H. D., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T., and Sung, Z. R. (1989). Common amino acid sequence domains among the *Lea* proteins of higher plants. *Plant Mol Biol* 12, 475-486.

Fu, H., Kim, Y.S, and Park, W.D. (1995). High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato *Sus4* sucrose synthase gene require 5' and 3' flanking sequences and the leader intron. *The Plant Cell* 7, 1387-1394.

Galau, G. A., Hughes, D. W., and Dure, L. (1986). Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis abundant (*lea*) mRNAs. *Plant Mol Biol* 7, 155-170.

Garcarrubio, A., Legaria, J.P. and Covarrubias, A.A. 1997. Abscisic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta* 203 : 182-187.

Giraudat, J., Parcy, F., Bertauche, N., Gosti, F., J., L., Morris, P. C., Bouvier-Durand, M., and Vartanian, N. (1994). Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Mol Biol* 26, 1557-1577.

Guan, L.M., Zhao, J. and Scandalios, J.G. 2000. *Cis*-elements and *trans*-factors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant J* 22: 87-95.

Guiltinan, M. J., Marcotte, W. R., and Quatrano, R. S. (1990). A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* 250, 267-271.

Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, P. D., and Somero, G. N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217, 1214-1217.

Zeevaart, J. A. D., and Creelmen, R. A. (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39, 439-473.

Zhang, L., Ohta, A., Takagi, M., and Imai, R. (2000). Expression of plant group 2 and group 3 *lea* genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins. *J Biochem* 127, 511-616.