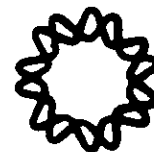




5-  
2 ef.  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

03088



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA FAMILIA GENICA  
QUE CODIFICA PARA LA BETAINA ALDEHIDO  
DESHIDROGENASA (BADH) *Amaranthus hypochondriacus* L.

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA**

**PRESENTA**

**JUAN PORFIRIO LEGARIA SOLANO**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

CUERNAVACA, MORELOS, MEXICO  
AGOSTO DE 1998.

265568



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.

Dicen que no tienen canto  
los ríos que son profundos,  
mas yo pensé en este mundo  
que el que tiene mas hondura,  
canta mejor por ser hondo  
y hace miel de su amargura.

Si el río es ancho y profundo,  
cruza.....quien sabe nadar.

Canto popular

**Dedico esta tesis a la memoria de mi padre y a la grandeza  
de mi madre**

**Esta tesis se realizó en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, en el Departamento de Biología Molecular de Plantas, bajo la dirección del Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente y con el apoyo de CONACYT y DGAPA/UNAM.**

**Para mi hijo Juan Uriel por sus muchas enseñanzas.**

## RECONOCIMIENTOS

Al jurado revisor de la presente tesis, integrado por los doctores Mario Soberón Chávez, Gabriel Iturriaga de la Fuente Gladys Cassab López, Rosario Muñoz-Clares, Patricia León Mejía, Jaime Padilla Acero y Georgina Gurrola Briones.

Al Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente por haberme recibido en su laboratorio y por el apoyo que me brindó para la realización de esta tesis.

A la Dra. Georgina Ponce Romero, a quien me une una gran amistad, por su estímulo y por el apoyo constante que me proporcionó durante mi trabajo en el laboratorio.

Con mucho cariño para Rosa Irene y Juan Uriel, fuentes siempre de estímulo, por darle sentido a la vida.

A la "negra" con mucho cariño y agradecimiento.

Al Dr. Abel Muñoz Orozco del Colegio de Postgraduados de Chapingo, por su ejemplo constante y por los muchos estímulos.

A mis hermanos y sobrinos por los muchos días felices.

A todos mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular de Plantas, por sus críticas constructivas y muchas veces acertadas ideas.

A todos aquellos con quienes he compartido un fragmento de vida y que de algún modo han contribuido a mi formación tanto académica como humana.

## RESUMEN

En el presente trabajo se aislaron el gen completo *ahybadh4* (*Amaranthus hypochondriacus* betaína aldehído deshidrogenasa), una clona genómica parcial (*ahybadh28*) diferente a *ahybadh4* y un ADNc (*ahybadh17*) que codifican para al menos dos isoformas de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH; EC 1.2.1.8) de *Amaranthus hypochondriacus* L. El gen *ahybadh4* se extiende a lo largo de 9 kb y contiene 15 exones con un marco de lectura abierta (ORF) de 501 aminoácidos, una región promotora de 1.3 kb y una región 3' no traducida de 0.3 kb. La proteína codificada por el ADNc (AHYBADH17) mostró 10 sustituciones de aminoácidos y fue un aminoácido más corta que AHYBADH4. La secuencia deducida de aminoácidos de la AHYBADH4 de amaranto mostró un 98% de identidad a nivel de aminoácidos con AHYBADH17, 39% de identidad con la BADH de *E. coli*, y 83, 83, 62, 70 y 70% de identidad con las secuencias reportadas para espinaca, remolacha, sorgo, arroz y cebada, respectivamente. Los posibles sitios activo y péptido de tránsito para dirigir la proteína a cloroplasto están muy conservados entre las diferentes secuencias deducidas de la BADH de plantas. El análisis en gel tipo Southern y de las secuencias de clonas aisladas sugirió que la BADH está codificada al menos por tres genes en el genoma de amaranto. Finalmente, el análisis de la expresión de *ahybadh* en hojas de amaranto mostró que el ARNm para la BADH está presente en hojas de plantas bajo condiciones normales y se incrementa de manera rápida luego de exposición a tratamientos con ácido abscísico (ABA) y estrés osmótico (PEG 17.5% (p/v), NaCl 0.5 M).

VoBo

  
Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente  
Asesor de tesis



# INDICE GENERAL

CONTENIDO	PAGINA
<b>I. PRESENTACION</b> .....	1
<b>II. INTRODUCCION</b> .....	4
1. El ajuste osmótico.....	5
2. La glicina betaína.....	10
3. Biosíntesis de la glicina betaína.....	12
4. Biología molecular de la síntesis de glicina betaína.....	14
5. Patrón de expresión de los genes BADH.....	16
6. El amaranto.....	18
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	20
<b>IV. MATERIALES Y METODOS</b> .....	21
1. Material vegetal.....	21
2. Contenido relativo de agua (CRA).....	21
3. Cepas.....	22
4. Material de laboratorio.....	22
5. Manipulación del ADN.....	23
6. Secuenciación del ADN y análisis informático de datos.....	23
7. Hibridación de los ácidos nucleicos.....	24
8. Extensión de primero.....	25
9. Clonación de ADNc por RT-PCR.....	26
<b>V. RESULTADOS</b> .....	28
1. Aislamiento y caracterización molecular de la clona genómica <i>ahybadh4</i> de amaranto que codifica para la BADH.....	28
2. Comparación de la BADH de amaranto con otras secuencias reportadas.....	48
3. Estructura de la región 5' del gen <i>ahybadh4</i> .....	56

**CONTENIDO****PAGINA**

4. Obtención del ADNc <i>ahybadh 17</i> por RT-PCR.....	61
5. Obtención de la clona genómica parcial <i>ahybadh28</i> .....	61
6. Determinación del número de copias del gen <i>ahybadh</i> en el genoma de amaranto.....	68
7. Expresión del gen <i>ahybadh 17</i> en respuesta a estrés osmótico y ácido abscísico.....	68
<b>VI. DISCUSION.....</b>	<b>73</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>84</b>
<b>VIII. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>86</b>
<b>IX. REFERENCIAS.....</b>	<b>88</b>

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA	PAGINA
1. Respuesta de las plantas al déficit hídrico.....	6
2. Patrón de restricción de la clona genómica <i>ahybadh4</i> .....	29
3. Patrón de restricción de la clona genómica <i>ahybadh4</i> .....	30
4. Fragmentos de la clona genómica <i>ahybadh4</i> que hibridaron con la sonda de ADNc de la BADH de espinaca.....	31
5. Patrón de restricción de la subclona de 1.5 kb de <i>ahybadh4</i> ....	32
6. Patrón de restricción de las subclonas de 4.3 y 2.2 kb de <i>ahybadh4</i> .....	33
7. Deleciones consecutivas de la clona <i>ahybadh4</i> .....	34
8. Mapeo del extremo N-terminal de la clona genómica <i>ahybadh4</i> .....	36
9. Determinación de la región 5' del gen <i>ahybadh4</i> .....	37
10. Mapeo del extremo 5' de la clona genómica <i>ahybadh4</i> .....	38
11. Ubicación de la región promotora del gen <i>ahybadh4</i> .....	39
12. Mapa de restricción de la clona genómica <i>ahybadh4</i> .....	40
13. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen <i>ahybadh4</i> .....	41
14. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de las BADHs.....	50
15. Dendograma de relaciones entre proteínas BADH.....	52
16. Comparación de la estructura de <i>ahybadh4</i> y <i>osbadh</i> .....	53
17. Posible sitio activo de las BADHs de plantas.....	54
18. Ruta de síntesis y transporte de las proteínas BADH.....	58
19. Mapeo del sitio de inicio de la transcripción.....	59
20. Cajas consenso de la región promotora de <i>ahybadh4</i> .....	60
21. Síntesis y subclonación del ADNc <i>ahybadh17</i> .....	62
22. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de <i>ahybadh17</i> .....	63
23. Comparación de secuencias de aminoácidos de <i>ahybadh4</i> y <i>ahybadh17</i> .....	65
24. Comparación de sitios de restricción entre las clonas genómica y ADNc.....	66
25. Secuencia parcial de nucleótidos y aminoácidos de <i>ahybadh28</i> .....	67
26. Comparación de secuencias del penúltimo intrón de <i>ahybadh4</i> y <i>ahybadh28</i> .....	67
27. Southern blot genómico de ADN de amaranto.....	69

28. Inducción de <i>ahybadh17</i> por estrés salino.....	71
29. Inducción de <i>ahybadh17</i> por estrés osmótico y ABA.....	72
Tabla I. Osmolitos compatibles que acumulan algunas especies de plantas.....	7
Tabla II. Solutos compatibles y perturbadores.....	9
Tabla III. Genes involucrados en la síntesis de osmolitos compatibles.....	10
Tabla IV. Comparación de secuencias de las proteínas BADH.....	51
Tabla V. Comparación de posibles péptidos de tránsito.....	55
Tabla VI. Comparación de secuencias C-terminal de las BADHs....	57

## TABLA DE ABREVIATURAS

<b>aa</b>	aminoácido(s)
<b>ABA</b>	ácido abscísico
<b>ADNc</b>	ADN complementario a ARN mensajero
<b>BADH</b>	betaína aldehído deshidrogenasa
<b>bp</b>	pares de bases
<b>CDH</b>	colina deshidrogenasa
<b>CMO</b>	colina monooxigenasa
<b>CRA</b>	contenido relativo de agua
<b>dNTP</b>	dideoxinucleótido(s)
<b>DTNB</b>	ácido 5-5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico)
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>EDTA</b>	ácido etiléndiaminotetraacético
<b>GB</b>	glicina betaína
<b>IPTG</b>	isopropil $\beta$ -tiogalactopiranosido
<b>kb</b>	kilobase(s)
<b>kD</b>	kilodalton
<b>LB</b>	medio Luria-Bertani
<b>MPa</b>	MegaPascal
<b>Mr</b>	Masa relativa
<b>NAD<sup>+</sup></b>	nicotínamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
<b>nt</b>	nucleótido(s)
<b>ORF</b>	marco de lectura abierta
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEG</b>	polietilenglicol
<b>RT</b>	transcriptasa reversa

## RESUMEN

En el presente trabajo se aislaron el gen completo *ahybadh4* (*Amaranthus hypochondriacus* betaína aldehído deshidrogenasa), una clona genómica parcial (*ahybadh28*) diferente a *ahybadh4* y un ADNc (*ahybadh17*) que codifican para al menos dos isoformas de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH; EC 1.2.1.8) de *Amaranthus hypochondriacus* L. El gen *ahybadh4* se extiende a lo largo de 9 kb y contiene 15 exones con un marco de lectura abierta (ORF) de 501 aminoácidos, una región promotora de 1.3 kb y una región 3' no traducida de 0.3 kb. La proteína codificada por el ADNc (AHYBADH17) mostró 10 sustituciones de aminoácidos y fue un aminoácido más corta que AHYBADH4. La secuencia deducida de aminoácidos de la AHYBADH4 de amaranto mostró un 98% de identidad a nivel de aminoácidos con AHYBADH17, 39% de identidad con la BADH de *E. coli*, y 83, 83, 62, 70 y 70% de identidad con las secuencias reportadas para espinaca, remolacha, sorgo, arroz y cebada, respectivamente. Los posibles sitios activo y péptido de tránsito para dirigir la proteína a cloroplasto están muy conservados entre las diferentes secuencias deducidas de la BADH de plantas. El análisis en gel tipo Southern y de las secuencias de clonas aisladas sugirió que la BADH está codificada al menos por tres genes en el genoma de amaranto. Finalmente, el análisis de la expresión de *ahybadh* en hojas de amaranto mostró que el ARNm para la BADH está presente en hojas de plantas bajo condiciones normales y se incrementa de manera rápida luego de exposición a tratamientos con ácido abscísico (ABA) y estrés osmótico (PEG 17.5% (p/v), NaCl 0.5 M).

## SUMMARY

In the present work, a complete genomic clone containing the *ahybadh4* gene (*Amaranthus hypochondriacus betaine aldehyde dehydrogenase*), one partial genomic sequence (*ahybadh28*) and one complementary DNA (*ahybadh17*) which encode at least two betaine aldehyde dehydrogenase (BADH; EC 1.2.1.8) isoforms were isolated from the plant *Amaranthus hypochondriacus* L. The *ahybadh4* gene spans 9 kilobases (kb), contains 15 exons with an open reading frame (ORF) of 501 amino acids (aa), a 1.3 kb promoter region and a 3' untranslated region (UTR) of 0.3 kb. The cDNA-encoded protein (AHYBADH17) has 10 amino acid substitutions and is one amino acid shorter than AHYBADH4. The deduced amino acid sequence of AHYBADH4 showed a 98% identity to AHYBADH17, 39% to *E.coli* BADH and 83, 83, 62, 70 and 70% to reported sequences from spinach, sugarbeet, sorghum, rice and barley, respectively. The putative active site of BADH and transit peptide for protein targeting to the chloroplast are conserved among the different plant BADH deduced sequences. Southern blot and sequence analysis suggest the presence of at least three *ahybadh* genes in the amaranth genome. Finally, analyses of *ahybadh* expression in amaranth leaves showed that BADH mRNA is present in non-treated amaranth leaves and increased under short-term exposure to abscisic acid (ABA) and osmotic stress treatments (17.5% PEG (w/v), 0.5 M NaCl).

## I. PRESENTACION

Durante la evolución, los seres vivos han estado sujetos a la presión de selección debida al estrés en un ambiente cambiante o durante la colonización de nuevos nichos ecológicos. El estrés osmótico, ya sea como producto de la escasez de agua, de la salinidad de los suelos o de bajas temperaturas, representa uno de los estreses más severos, limitante del crecimiento y productividad de las plantas (Boyer, 1982). Para contrarrestar los efectos del estrés osmótico las plantas y otros organismos han desarrollado varias estrategias adaptativas. A nivel celular, el tipo de adaptación más común consiste en la acumulación de solutos compatibles con el metabolismo, conocidos como osmolitos (Handa *et al.*, 1983; Le Rudulier *et al.*, 1984; Rhodes y Hanson, 1993; Truper y Galinski, 1990; Yancey *et al.*, 1982). Dichos solutos incrementan la presión osmótica de la célula y estabilizan la estructura de las proteínas y consecuentemente, mantienen el contenido de agua de la célula bajo condiciones de déficit hídrico (Delauney y Verma, 1993; McCue y Hanson, 1990; Pollard y Wyn Jones, 1979; Yancey *et al.*, 1982; Zaccai y Eisenberg, 1990). Los solutos compatibles más conocidos son algunos disacáridos como la sacarosa y la trehalosa; los polioles como el manitol, pinitol y sorbitol; aminoácidos como la prolina; y los compuestos cuaternarios de amonio tales como la glicina betaína (GB) (Yancey *et al.*, 1982; Rhodes y Hanson, 1993; Ingram y Bartels, 1996).

La GB está presente en bacterias, cianobacterias, algas, animales y varias familias de plantas superiores pero ausente en muchas especies cultivadas importantes tales como el arroz y el jitomate (McCue y Hanson, 1990). Estudios genéticos realizados en bacterias y



plantas han mostrado que la presencia de GB correlaciona con la tolerancia al estrés osmótico (Styrvoid *et al.*, 1986; Grumet y Hanson, 1986; Saneoka *et al.*, 1995). Por lo que aquellas plantas de importancia agronómica que carecen de la vía de síntesis del osmolito podrían ser susceptibles de manipulación genética (McCue y Hanson, 1990).

En las plantas, la GB se sintetiza a partir de dos pasos enzimáticos que involucran la oxidación de la colina. El primer paso es catalizado por la enzima colina monooxigenasa (CMO) dependiente de ferredoxina, en el que se forma el intermediario betaína aldehído; y el segundo paso consiste en la oxidación de la betaína aldehído a glicina betaína por la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH), que utiliza preferentemente como cofactor al NAD<sup>+</sup> (Brouquisse *et al.*, 1989; Burnet *et al.*, 1995). En *E. coli*, el primer paso es catalizado por una colina deshidrogenasa (CDH) y la conversión a glicina betaína es realizada tanto por la CDH como por la BADH (Landfald y Strom, 1986; Lamark *et al.*, 1991). La BADH de plantas es una proteína dimérica con monómeros de 60 kD, localizada en el estroma del cloroplasto (Weigel *et al.*, 1986; Arakawa *et al.*, 1987). A la fecha existen reportes del aislamiento de los genes de la BADH de *E. coli* (Boyd *et al.*, 1991) y arroz (Nakamura *et al.*, 1997) y los ADNc de espinaca (Weretilnyk y Hanson, 1990), remolacha (McCue y Hanson, 1992), cebada (Ishitani *et al.*, 1995), sorgo (Wood *et al.*, 1996) y el ADNc parcial de arroz (Nakamura *et al.*, 1997). En dichas plantas la actividad de la enzima y la transcripción son inducidos por estrés hídrico, salinidad o frío en paralelo a un incremento en los niveles de glicina betaína.

Trabajos previos han mostrado que las hojas del amaranto acumulan glicina betaína en respuesta a estrés hídrico (Gamboa *et al.*, 1991).

También se ha demostrado que la actividad de la BADH se incrementa rápidamente en respuesta a dicho estrés (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994).

Interesados en el estudio de las bases moleculares del ajuste osmótico en *A. hypochondriacus*, y como un primer paso, se reporta en ésta tesis el aislamiento del gen completo de la BADH y su ADNc, así como el análisis de los patrones de expresión del ARNm de la BADH durante 24 horas de exposición a diferentes condiciones de estrés osmótico ó ABA exógeno.

## II. INTRODUCCION

Las plantas están expuestas generalmente a diversos estreses incluyendo temperaturas extremas, anaerobiosis, radiación alta y déficit hídrico. Para contrarrestar los efectos del estrés osmótico, las plantas han desarrollado mecanismos adaptativos que pueden ser clasificados dentro de cuatro categorías (McCue y Hanson, 1990). Tres de estas adaptaciones -caracteres del desarrollo (por ejemplo tiempo de floración), estructurales (patrones de sistemas radiculares o presencia de ceras en las hojas) y mecanismos fisiológicos (eficiencia en el uso del agua)-, involucran interacciones de genes complejas y los productos génicos que controlan estos caracteres no han sido identificados. La cuarta categoría involucra respuestas metabólicas tales como la alteración del metabolismo fotosintético (Cushman *et al.*, 1990, 1992) y la acumulación de solutos compatibles. Lo último puede deberse a un número pequeño de productos génicos, algunos de los cuales pueden identificarse mediante los cambios inducidos en los niveles de ARN mensajero y proteínas en plantas sometidas al estrés osmótico (Singh *et al.*, 1985; Winicov *et al.*, 1989).

Las numerosas respuestas al déficit hídrico son controladas por un arreglo de genes con funciones diferentes. Conforme se pierde el agua de la célula vegetal, se inician una serie de procesos reguladores que ajustan el metabolismo a las nuevas condiciones. La inhibición del crecimiento y las alteraciones en las vías de desarrollo resultan también en cambios en la expresión de los genes. Algunos de los genes inducidos por el déficit hídrico codifican para productos que probablemente protegen el

funcionamiento de la célula. Los genes tipo *lea* codifican para “proteínas de embriogénesis tardía” y se presume que protegen a las estructuras de la célula de los efectos de la pérdida de agua. Las funciones que se predicen a partir de la secuencia de aminoácidos de las proteínas LEA incluyen el secuestro de iones, la protección de otras proteínas o membranas y la renaturalización de las proteínas (Dure, 1993). Además se han identificado otras proteínas como los inhibidores de proteasas, las proteínas de almacenamiento vegetativo, las ATPasas que regulan el potencial osmótico y compartimentalización de iones, los canales de agua o acuaporinas (Chrispeels y Maurel, 1994; Bohnert *et al.*, 1995) y muchas otras como se muestra en la Figura 1.

La respuesta bioquímica mejor caracterizada de la célula vegetal ante el estrés osmótico es la acumulación de solutos orgánicos, osmolitos u osmoprotectores, fenómeno conocido más comúnmente como ajuste osmótico (Aspinall y Paleg, 1981; Delauney y Verma, 1993; Rhodes y Hanson, 1993).

## **II.1. EL AJUSTE OSMOTICO**

El mantenimiento del potencial hídrico total durante el déficit hídrico puede adquirirse mediante el ajuste osmótico. Una reducción en el potencial hídrico de la célula por debajo del potencial hídrico externo, resulta en una reducción en el potencial osmótico, lo cual permite el movimiento del agua al interior de la célula. El potencial osmótico dentro de la célula se hace más negativo por la acumulación de osmolitos (solutos compatibles) en el citoplasma.



**Figura 1 .** Respuestas de las plantas al déficit hídrico. Los cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares ayudan a la planta a mantener el metabolismo y restauran las condiciones que permiten el crecimiento bajo estrés (Tomado de Bohnert *et al.*, 1995).

Los osmolitos ú osmoprotectores son descritos como sustancias no tóxicas y compatibles con el metabolismo celular que se acumulan cuando la planta se somete a bajos potenciales de agua (Borowitzka y Brown, 1974) Tabla I.

AZUCARES	AMINOACIDOS	DERIVADOS DE AMINOACIDOS	METILAMINAS
Glucosa	Prolina	<b>Compuestos de aminas</b>	Betaína
Fructosa		<b>cuaternarias</b>	
Sacarosa		Colina-O-sulfato	
Trehalosa		$\beta$ -alanina-betaína	
Pinitol		Glicina betaína	
Manitol		Prolina betaína	
Fructanos		Hidroxiprolina-betaína	
		<b>Compuestos de sulfonio</b>	
		<b>terciario</b>	
		Dimetilsulfonio-propionato	

**Tabla I.** Osmolitos compatibles que acumulan algunas especies de plantas. Tomado de Yancey *et al.*, 1982; Rhodes y Hanson, 1993; Bohnert *et al.*, 1995.

No solo las plantas, sino también las bacterias, los hongos y los animales han convergido en la selección de ciertos osmolitos que poseen la propiedad de no alterar la estructura y función de las macromoléculas cuando se acumulan a altas concentraciones (Yancey *et al.*, 1982).

Algunos autores proponen que los solutos compatibles no contribuyen de manera sustancial a la reducción del potencial osmótico y que posiblemente su función se ejerza a nivel de compatibilidad de los solutos con la estructura y función de las macromoléculas (Wyn Jones *et al.*, 1977; Wyn Jones, 1984). La compatibilidad de los osmolitos resulta de la ausencia de efectos perturbadores sobre las interacciones macromolécula-solvente (Yancey *et al.*, 1982), ya que los solutos se **excluyen** de la superficie de las proteínas y su esfera de hidratación inmediata, estabilizando la estructura de las proteínas (Rhodes y Hanson, 1993). Además, se ha propuesto que los solutos compatibles, incluyendo a la GB, pueden alterar las propiedades termodinámicas de las membranas, estabilizándolas por la **interacción directa** que ejercen con alguna parte de la fosfatidilcolina de los fosfolípidos, incrementando el área de esas moléculas, haciéndolas más fluidas y permitiendo la formación de una fase cristalina líquida (Rudolph *et al.*, 1986; Rhodes y Hanson, 1993). Se han estudiado diversos osmolitos con capacidad para crioproteger a la enzima fosfofructocinasa (PFK). Todos los que se excluían de la enzima resultaron ser estabilizadores, mientras que aquellos que se le unieron no la estabilizaron (Tabla II).

COMPUESTO	GRADO DE ESTABILIZACION (% de la actividad inicial)	MODO DE INTERACCION
Glicerol	70	Exclusión
Etilén glicol	100	Exclusión
Glucosa	50	Exclusión
Sacarosa	90	Exclusión
Inositol	40	Exclusión
Glicina	50	Exclusión
Prolina	50	Exclusión
Urea	0	Unión

**Tabla II.** Solutos compatibles y perturbadores. Tomado de Crowe *et al.*, 1990.

Se propone que algunos osmolitos protegen mejor que otros frente a un determinado tipo de estrés y que ello puede ser una de las razones de la diversidad de osmolitos que existen en la naturaleza: la  $\beta$ -alanina-betaína se acumula preferentemente en especies que crecen en suelos salinos, las prolinabetaínas en plantas que se desarrollan en ambientes áridos y la colina-o-sulfato se acumula en especies vegetales que viven en suelos ricos en sales de sulfato (Hanson *et al.*, 1994). El sorbitol, el manitol, el mio-inositol y la prolina son amortiguadores efectivos de radicales libres (Bohnert *et al.*, 1995). Es probable que el tipo de osmolito acumulado



dependa del tipo de metabolismo de la especie en cuestión.

Se han caracterizado varios ADNc que responden a déficit hídrico y estrés osmótico que participan en la biosíntesis de osmolitos compatibles (Tabla III).

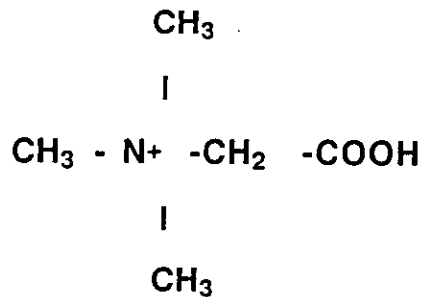
GEN	ESPECIE	OSMOLITO	REFERENCIA
Betaína Aldehído deshidrogenasa	Espinaca	Glicina betaína	Weretilnik y Hanson, 1990
	Remolacha	Glicina betaína	McCue y Hanson, 1992
	Cebada	Glicina betaína	Ishitani <i>et al.</i> , 1995
	Sorgo	Glicina betaína	Wood <i>et al.</i> , 1996
	Arroz	Glicina betaína	Nakamura <i>et al.</i> , 1997
Colina monooxigenasa	Espinaca	Glicina betaína	Ratnasabapathiet <i>al.</i> , 1997
	Remolacha	Glicina betaína	Russell <i>et al.</i> , 1998
Sacarosa-fosfato sintasa $\beta$ -pirrolin-carboxilato sintasa	<i>C. plantagineum</i>	Sacarosa	Ingram y Bartels, 1996
	<i>A. thaliana</i>	Prolina	Yoshida <i>et al.</i> , 1995
Inositol-o-metil transferasa	<i>M. crystallinum</i>	D-pinitol	Vernon <i>et al.</i> , 1993
Colina sulfotransferasa	Plumbaginaceae	Colina-o-sulfato	Rivoal <i>et al.</i> , 1994

**Tabla III.** Genes involucrados en la síntesis de osmolitos compatibles.

## II.2. LA GLICINA BETAÍNA

El soluto compatible GB (N,N,N-trimetil glicina) es un compuesto cuaternario de amonio cuya fórmula estructural consiste de un

átomo de nitrógeno sustituido completamente por grupos metilo, lo que crea una carga positiva permanente sobre el átomo de nitrógeno.



La glicina betaína es considerada uno de los osmoprotectores más eficientes (Le Rudlier *et al.*, 1984); se requieren bajas concentraciones de menos de 1 mM, para conferir un efecto protector a las plantas de cebada (Ishitani *et al.*, 1993). En contraste, se han generado plantas transgénicas de tabaco portando la enzima manitol-1 fosfato deshidrogenasa de *E. coli*, pero su habilidad para contender con altas concentraciones de NaCl requiere de la acumulación de altas concentraciones de manitol (100 mM) en el citoplasma de la célula vegetal (Tarszynski *et al.*, 1993).

La GB se localiza principalmente en el citoplasma, cloroplasto y peroxisoma de las células vegetales (Robinson y Jones, 1986; Scroppe-Meier y Kaiser, 1988; Nakamura *et al.*, 1997). Entre las funciones que se le han atribuido, podemos mencionar las siguientes: (a) protección parcial de enzimas aisladas contra la inhibición causada por NaCl y KCl (Wyn Jones y Storey, 1981; Manetas *et al.*, 1986; Rhodes y Hanson, 1993); (b) compartimentalización de iones (Ahmad *et al.*, 1988); (c) estabilización de

membranas (Jolivet *et al.*, 1983; Rudolph *et al.*, 1986); (d) protección de cloroplastos aislados, evitando la pérdida de la actividad fotosintética durante el almacenamiento por congelación (Rhodes y Hanson, 1993).

### II.3. BIOSINTESIS DE LA GLICINA BETAINA

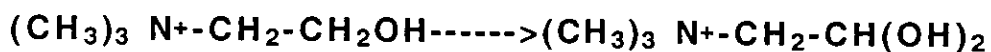
En varias familias de plantas que acumulan GB, se han hecho estudios *in vivo* con trazadores radioactivos (Weigel *et al.*, 1986) y se confirmó que la GB se sintetiza por dos pasos de la oxidación de la colina, vía el intermediario inestable betaína aldehído:

**CMO**

**BADH**

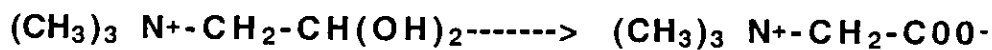
Colina---->Betaína aldehído---->Glicina betaína

Las enzimas mediando ambos pasos se han estudiado en las familias Chenopodeaceae (espinaca y remolacha) y Gramineae (cebada y otros cereales). El primer paso es catalizado por la colina monooxigenasa (CMO), una enzima dependiente de ferredoxina (Brouquisse *et al.*, 1989). La enzima convierte colina a la forma hidratada (*gem-diol*) del aldehído, que es la forma dominante en solución acuosa (más del 99%):



La CMO es una enzima soluble localizada en el estroma del cloroplasto (Brouquisse *et al.*, 1989). El poder reductor para la reacción es generado fotosintéticamente, y la oxidación de la colina se promueve por luz *in vivo* y en cloroplastos aislados (Hanson *et al.*, 1985; Weigel *et al.*, 1988). El sustrato colina es ubicuo en la naturaleza y su biosíntesis está bajo control por retroalimentación en las plantas (McCue y Hanson, 1990). La CMO ha sido purificada de espinaca, es un homodímero con subunidades de Mr semejante a 45 kD, cuya actividad tiene un pH óptimo de 8.0 y es estimulada por Mg<sup>2+</sup> (Brouquisse *et al.*, 1989; Burnet *et al.*, 1995).

El segundo paso en la síntesis de GB es catalizado por la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) con fuerte preferencia por NAD<sup>+</sup> en lugar de NADP<sup>+</sup> (Arakawa *et al.*, 1990; Weretilnyk y Hanson, 1989). En hojas de espinaca el 90% de la actividad reside en el estroma de los cloroplastos y el resto aparentemente en una enzima citosólica (Weigel *et al.*, 1986).



La BADH de espinaca es un dímero con subunidades de Mr semejante a 60 kD, tiene un pH óptimo de 8.5 y es sustrato específica, mostrando poca actividad en presencia de otros aldehídos pequeños (Arakawa *et al.*, 1987; Weretilnyk y Hanson, 1989). A diferencia de la BADH de espinaca, las enzimas de amaranto y remolacha muestran alta afinidad por sustratos como la betaína aldehído y los aldehídos con carga positiva como el dimetilsulfoniopropionaldehído, el aminopropionaldehído y el aminobutiraldehído (Vojtechová *et al.*, 1997; Trossat *et al.*, 1997).

En *E. coli*, la vía de biosíntesis de GB es similar a la de plantas, salvo que el primer paso se realiza por una colina deshidrogenasa (CDH) unida a membrana que es capaz de catalizar no sólo la oxidación de colina a betaína aldehído sino también el segundo paso a GB (Landfald y Strom, 1986; Lamark *et al.*, 1991).

#### II.4. BIOLOGIA MOLECULAR DE LA SINTESIS DE GLICINA BETAINA

Existen reportes del aislamiento de los genes de la BADH de *E. coli* y de arroz (Boyd *et al.*, 1991; Nakamura *et al.*, 1997), así como los ADNc de espinaca (Weretilnyk y Hanson, 1990), remolacha (McCue y Hanson, 1992), cebada (Ishitani *et al.*, 1995) sorgo (Wood *et al.*, 1996) y una secuencia parcial de arroz (Nakamura *et al.*, 1997).

Las bacterias tales como *E. coli* no producen colina pero pueden tomarla efectivamente del ambiente (Styrvoid *et al.*, 1986). La CDH tiene un Mr de 62 kD y es codificada por el gen *betA* ; y la BADH tiene un Mr de 53 kD y está codificada por el gen *betB* (Lamark *et al.*, 1991).

En espinaca, la BADH está codificada por un sólo gen nuclear (Weretilnyk y Hanson, 1990), mientras que en cebada y sorgo parece ser codificada por una familia pequeña de genes (Ishitani *et al.*, 1995; Wood *et al.*, 1996). La secuencia deducida de aminoácidos (aa) de la BADH de espinaca muestra un 37% de identidad con la BADH de *E. coli* (Boyd *et al.*, 1991) y 83, 70 y 67% con las BADHs de remolacha (McCue y Hanson, 1992), cebada (Ishitani *et al.*, 1995) y sorgo (Wood *et al.*, 1996), respectivamente. El ADNc de la BADH de espinaca codifica para una proteína de 497 residuos aa y tiene una Mr de 60 kD; el ADNc de la remolacha codifica para un polipéptido de 500 aa con una Mr de 61 kD; el

ADNc de cebada codifica para 505 aa que resultan en una Mr de 63 kD; y el ADNc de sorgo contiene un ORF de 494 aa con una Mr de 53.6 kD.

En la secuencia deducida de aminoácidos de las BADHs reportadas se detectó una región de diez aminoácidos Val-Thr-Leu-Glu-Leu-Gly-Gly-Lys-Ser-Pro altamente conservada entre las aldehído deshidrogenasas, así como también una cisteína localizada a 34 residuos del decapeptido, posiblemente involucrados en la unión al cofactor NAD<sup>+</sup> y en catálisis, que han sido bien caracterizados en varias deshidrogenasas (Weretilnyk y Hanson, 1990). Por lo anterior, se postula que estos residuos pueden formar parte del sitio activo de la proteína.

Si bien las clonas aisladas de espinaca y remolacha presumiblemente codifican para enzimas cloroplásticas, ellas carecen de un péptido de tránsito típico. La comparación de las secuencias deducidas y determinadas indica que sus péptidos de tránsito contienen a lo más ocho residuos o que el péptido de tránsito puede estar ausente (Rathinasabapathi *et al.*, 1994), lo cual contrasta con los 30-50 residuos que comúnmente presentan los péptidos de tránsito de las proteínas dirigidas a cloroplasto (Keegstra *et al.*, 1989; Berry-Lowe y Schmidt, 1991).

Rathinasabapathi *et al.* (1997) clonaron y secuenciaron el ADNc codificando para la colina monooxigenasa (CMO) de espinaca. Tiene una longitud de 1622 pb y codifica para un ORF de 440 aa que incluye un péptido de tránsito a cloroplasto de 60 residuos. La CMO presenta grandes regiones con similitud a proteínas Fe-S tipo Rieske, en particular con las oxigenasas de bacterias. Los niveles de expresión de la CMO en hojas de espinaca se incrementan en respuesta a estrés salino. Los investigadores concluyen que la CMO de espinaca es una nueva clase

de oxigenasas de plantas, inducible por estrés ya que en contraste con otras oxigenasas de plantas la CMO de espinaca no comparte elementos con la enzima P450, no se encuentra unida a membrana, no es sensible a CO, su espectro óptico no es el de una proteína hemo y no existen en los bancos secuencias que presenten homología significativa con la secuencia de la CMO de espinaca.

## II.5. PATRON DE EXPRESION DE LOS GENES BADH

En las diversas plantas donde se ha caracterizado el gen o el ADNc de la BADH se ha observado una expresión basal del transcrito, que se induce bajo condiciones de estrés osmótico. Por ejemplo, los niveles de ARNm y de actividad enzimática de la BADH se incrementan aproximadamente dos veces en hojas de plantas de espinaca sometidas a estrés por 200 mM de NaCl, mientras que en hojas y raíces de plantas de remolacha sometidas al mismo estrés aumentan 3 y 4 veces respectivamente (McCue y Hanson, 1992; Weretilnyk y Hanson, 1990). En cebada se reportó un incremento en los niveles de GB y actividad de la BADH en hojas y raíces en respuesta a salinidad (Arakawa *et al.*, 1992). Los niveles de ARNm de la BADH en cebada se elevan 8 veces por efecto de estrés salino (300 mM de NaCl durante 48 horas) y el gen se regula a nivel transcripcional por estrés hídrico (PEG al 20% (p/v) durante 48 horas) y ABA (100  $\mu$ M durante 96 horas)(Ishitani *et al.*, 1995). Además, se reportó que la BADH en sorgo se regula a nivel transcripcional por efecto del estrés hídrico, observándose un incremento de 2 a 3 veces en los niveles de ARNm luego de someter a las plantas a 23 días de sequía (Wood *et al.*, 1996). Por otro lado, Nakamura *et al.* (1997) reportan que el gen BADH de

arroz se expresa de manera constitutiva a bajos niveles, pero puede ser inducido durante el estrés salino, si bien a niveles inferiores a aquellos alcanzados en cebada (Ishitani *et al.*, 1995).

Finalmente, estudios previos han demostrado que en hojas de amaranto la GB se acumula bajo estrés hídrico (PEG al 8% (p/v) durante 10 horas) (Gamboa *et al.*, 1991). Recientemente se ha encontrado en esta planta que la actividad de la BADH se incrementa en respuesta al déficit de agua (PEG al 17% (p/v) durante 4 horas)(Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994).

La BADH de amaranto presenta una masa molecular nativa de 125 kD con subunidades de 63 kD determinadas ambas en geles de poliacrilamida nativo y desnaturalizante, respectivamente. El pH óptimo de la enzima es de 8.0 (Valenzuela Soto y Muñoz-Clares, 1994). Por otro lado Valenzuela-Soto (1997), comparó enzimas BADH de plantas silvestres y cultivadas de amaranto, detectando que ambas enzimas poseen una masa molecular nativa de 125 kDa. La enzima de las plantas silvestres presentó 2 subunidades diferentes de masa molecular igual a 63 y 70 kD, mientras que las cultivadas mostraron 2 subunidades de 63 kD. Durante el electroenfoque la enzima de las plantas silvestres migró como 3 bandas con un pI de 4.93, 4.85 y 4.78, mientras que la proteína de las plantas cultivadas tuvo solo 2 bandas. También la enzima de las plantas silvestres mostró una mayor resistencia a altas temperaturas. Se concluye que dichas diferencias pueden estar relacionadas con la regulación de la actividad enzimática y/o mayor capacidad de adaptación a un ambiente más agresivo (Valenzuela-Soto, 1997).



## II.6. EL AMARANTO

El amaranto se cultiva en México desde el año 4000 A.C aproximadamente, según constan restos de semillas encontrados en una zona arqueológica en Tehuacán, Puebla. Fue un cultivo importante para la nutrición de los pueblos Azteca, Maya e Inca. Se utilizó para la preparación de ofrendas que se comían durante las ceremonias religiosas, por lo que su cultivo se prohibió durante el coloniaje español (Trinidad *et al.*, 1986).

El amaranto es una planta con metabolismo del tipo C4 y acumula glicina betaína en las hojas maduras en respuesta al déficit hídrico (Gamboa *et al.*, 1991). La planta es muy resistente a la sequía, dado que a potenciales hídricos de -1 MPa o a un contenido relativo de agua (CRA) de 60%, es capaz de producir semilla. También muestra una recuperación rápida (15 minutos aproximadamente) luego de eliminado el estrés (Valenzuela-Soto, 1994). Cuando el déficit de agua es elevado (un CRA de menos del 50%), la planta deja de sintetizar GB y acumula prolina (Gamboa *et al.*, 1991). Su importancia agronómica se debe a que tanto la semilla como la hoja contienen una gran concentración de proteína de alta calidad, superior a la de la soya y pescado, debido a su alto contenido de lisina (Downtown, 1973) y en aminoácidos con azufre (Valadés-Rodríguez *et al.*, 1993). Algunas de las características mencionadas le confieren al amaranto un gran potencial como germoplasma para el mejoramiento de cultivares de interés agrícola que sean sensibles al déficit de agua.

Muchas de las plantas de interés económico normalmente son sensibles a la sequía o al estrés osmótico dado que no han desarrollado mecanismos de defensa. La transferencia de la maquinaria enzimática involucrada en la síntesis del osmolito glicina betaína es una posibilidad

que permitiría la obtención de plantas de interés agrícola de alto rendimiento y tolerantes al déficit de agua, lo que podría contribuir a aminorar en parte el grave problema alimentario que padecen países como el nuestro.

### III. OBJETIVOS

El presente trabajo constituye parte de un proyecto ambicioso que en sus orígenes se propuso la caracterización a nivel bioquímico y molecular de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa de hojas de amaranto y llegar a entender el papel que esta enzima juega en la tolerancia al estrés hídrico y osmótico. Se pretende contribuir al esclarecimiento del mecanismo molecular que confiere al amaranto tolerancia al estrés hídrico y osmótico y en el futuro utilizar dicho conocimiento para transplantar a especies de importancia económica como el maíz y el frijol entre otros, genes que potencialmente confieran tolerancia a la sequía, tales como el que codifica para la betaína aldehído deshidrogenasa.

#### **OBJETIVO GENERAL:**

1. Estudiar la estructura y regulación de la expresión del gen de la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) de *Amaranthus hypochondriacus* L.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Aislar el gen completo de la BADH y determinar su secuencia de nucleótidos.
2. Determinar el sitio de inicio de la transcripción.
3. Obtener el ADN complementario de la BADH.
4. Determinar el número de copias presentes del gen BADH en el genoma de amaranto.
5. Determinar el patrón de expresión del gen en hojas de amaranto tratadas con ABA, déficit de agua y salinidad.

## IV. MATERIALES Y METODOS

### IV.1. MATERIAL VEGETAL

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron semillas de *Amaranthus hypochondriacus* L. cv. Azteca donadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) y propagadas bajo condiciones de invernadero en Cuernavaca, México. Las semillas se germinaron y crecieron en macetas conteniendo el sustrato vermiculita e irrigadas con solución MS (Murashige y Skoog, 1962), bajo condiciones controladas (temperatura de 24 °C y 16 horas de luz, con un promedio de 50% de humedad relativa) en cámaras de crecimiento e irrigadas diariamente. Se cortaron hojas maduras de plantas de seis semanas de edad y se sometieron a tratamientos con ABA 100 µM, NaCl 0.5 M, PEG 17.5 % (PEG 17.5% (p/v) es equivalente a un potencial hídrico de -1.0 MPa; Money, 1989 ) y con agua como control, durante 0, 1, 2, 6 y 24 horas.

### IV.2. DETERMINACION DEL CONTENIDO RELATIVO DE AGUA

Para cada uno de los tratamientos se determinó el contenido relativo de agua (CRA, RWC) que define la cantidad de agua que los tejidos tienen almacenada, en relación con la máxima cantidad que pueden almacenar. Se cuantifica como  $100\% \times (\text{Peso fresco}) - (\text{Peso seco}) / (\text{Peso túrgido}) - (\text{Peso seco})$ . Con un sacabocados se cortaron discos de hojas de los diferentes tratamientos y se pesaron para obtener el peso fresco, después se colocaron en cajas de Petri con agua destilada y se dejaron

saturar dentro de una cámara durante 4 horas. Luego se sacaron de la caja de Petri y se eliminó el exceso de agua en la superficie utilizando papel secante y se pesó nuevamente para obtener el peso túrgido. Finalmente, los discos se secaron en una estufa a 70 °C durante 24 horas y se determinó el peso seco (Larqué-Saavedra y Trejo, 1990).

### **IV.3. CEPAS**

El banco genómico de amaranto fue plateado en *E. coli* KW251(mcrA-mcrCB-EcoKR-EcoBM+) y la cepa XL1-Blue MRF' $\Delta$ (mcrCB)183  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 sup44 thi-1 recA1 gyrA96 re1A1 lac(F'proAB lacI $\phi$ Z $\Delta$ M15, Tn10, Tetr))(Sambrook *et al.*, 1989) se utilizó para transformar subclonaciones y construcciones.

### **IV.4. MATERIAL DE LABORATORIO**

Se utilizaron reactivos grado analítico de la casa comercial Baker o Sigma (Phillipsburg, NJ y St. Louis MO, EEUU). Las enzimas de restricción y de modificación fueron de Boehringer-Mannheim (Mannheim, Alemania). El kit de Sequenase Version 2.0 que se utilizó para determinar la secuencia de nucleótidos fue de United States Biochemical Corporation (Cleveland, Ohio, EEUU). La M-MLV transcriptasa reversa que se empleó fue la SuperScript II de GIBCO BRL (Gaithersburg, MD, EEUU). El bacteriófago auxiliar VCS-M13 utilizado para obtener ADN de cadena sencilla fue de STRATAGENE (La Jolla, CA, EEUU). Los vectores pBluescript KS (+/-) y pGEM3zf(+) fueron de STRATAGENE y PROMEGA (La Jolla, CA y Madison WI, EEUU), respectivamente.

#### **IV.5. MANIPULACION DEL ADN**

Las técnicas de ADN recombinante tales como la transformación de bacterias, aislamiento de ADN de plásmidos, bacteriófago lambda, digestión del ADN con enzimas de restricción o tratamiento del ADN con enzimas de modificación se llevaron a cabo de acuerdo a procedimientos estándar (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **IV.6. SECUENCIACION DEL ADN Y ANALISIS INFORMATICO DE DATOS**

Las delecciones consecutivas (Henikoff, 1984) de los insertos de las clonas seleccionadas fueron creadas con las enzimas Exonucleasa III y Nucleasa S1. Se purificó ADN de cadena doble (Seto, 1990) y ADN de cadena sencilla utilizando el bacteriófago auxiliar VCS-M13, para luego determinar su secuencia de nucleótidos por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) utilizando el kit de Sequenase Versión 2.0 (Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra). Las clonas de ADNc obtenidas por RT-PCR se mandaron secuenciar al Sequencing Laboratory, Queen's University, Kingston, Canadá, donde se utilizó el método de terminación con dideoxinucleótidos marcados por fluorescencia empleando un secuenciador automático. Los alineamientos de la secuencia de ADN y las secuencias de proteínas se analizaron usando el programa de computo Gene Works versión 2.4 (Intelligenetics, EEUU).

#### IV.7. HIBRIDACION DE LOS ACIDOS NUCLEICOS

Para rastrear el banco genómico de amaranto (construido por la Dra. June Simpson, CINVESTAV, Irapuato) se transfirieron las placas del bacteriófago lambda GEM-11 a una membrana de nylon N+ (Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra) que se trató siguiendo el método convencional para desnaturalizar ADN (Sambrook *et al.*, 1989). El filtro se hibridó con el ADNc de espinaca (Weretilnyk y Hanson, 1990), marcado por "random priming" con el isótopo  $^{32}\text{P}$  (Feinberg y Vogelstein, 1983). Las condiciones de hibridación fueron 2X SSC (1X SSC= NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM) a 65 °C. El filtro se lavó 3 veces, durante 20 minutos cada lavado, a 2X SSC y 50 °C. Los Southern y Northern se realizaron de acuerdo a protocolos estándar (Sambrook *et al.*, 1989), con las siguientes modificaciones. Para el Southern genómico, el ADN fue fraccionado sobre un gel de agarosa al 0.8% (p/v) en buffer TBE (1X TBE= Tris-borato 0.090 M y EDTA 0.002 M) y transferido a una membrana de nylon Hybond N+. El filtro se hibridó usando como sonda el ADNc de amaranto marcado por "random priming" con el isótopo  $^{32}\text{P}$  (Feinberg y Vogelstein, 1983), usando 5X SSPE (1X SSPE= NaCl 16.8 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM y EDTA 1 mM) a 65 °C. El filtro se lavó 3 veces, durante 15 minutos cada lavado, dos a 1X SSPE y una a 0.5X SSPE a la misma temperatura.

Para el gel tipo Northern se utilizó un gel de agarosa al 1.2% (p/v) en un buffer de MOPS-formaldehído y se transfirió a una membrana de nylon Hybond N+. Las condiciones de hibridación fueron 5X SSPE a 65 °C utilizando la misma sonda que para el Southern genómico. Al filtro se le dieron tres lavados sucesivos, de 15 minutos cada uno, con 1X SSPE, 1X SSPE y 0.1X SSPE, respectivamente, a 65 °C.

La abundancia del transcrito y la proteína en los autorradiogramas se determinó con un densitómetro láser. Las muestras control (no tratadas) se consideraron como el 100% y a las muestras tratadas se les asignó valores relativos luego de comparar con los valores de las muestras control. Además, los filtros fueron rehibridados con un fragmento del ARN ribosomal 28S de *Phaseolus vulgaris* (proporcionado por el Dr. José M. Colmenero, Instituto de Biotecnología, UNAM) y se estandarizaron los niveles relativos de los transcritos con respecto a la hibridación con la última sonda.

#### IV.8. EXTENSION DE PRIMERO

Un oligonucleótido P1 (5'-CGCGAAGGTACACGGATCGCC) que aparee su extremo 3' al segundo codón de la secuencia codificadora del gen *ahybadh4*, fue marcado con la T4 polinucleótido cinasa, de acuerdo al protocolo de Sambrook *et al.* (1989). El oligonucleótido P1 marcado con una actividad específica de  $5 \times 10^5$  d.p.m.  $\mu\text{g}^{-1}$  se hibridó durante toda la noche contra 10  $\mu\text{g}$  de ARN total a 30 °C en una solución de Pipes 40 mM pH 6.7, EDTA 1 mM, NaCl 0.4 M y 80% (p/v) de formamida. Posteriormente de la hibridación se adicionó a la reacción dNTPs 1 mM, buffer de primera cadena 1X M-MLV RT( Tris-HCl 50 mM, pH 8.3; KCl 75 mM;  $\text{MgCl}_2$  15 mM), 50 unidades de RNAsina, y 400 unidades de M-MLV transcriptasa reversa y se incubó a 42 °C durante 90 minutos. Enseguida se trató la muestra con RNAsa A, se extrajo con fenol-cloroformo y se precipitó con etanol en presencia de acetato de amonio 2M. Los productos de la extensión se analizaron en un gel de poliacrilamida al 6 % (p/v) y urea 8 M, utilizando como referencia la secuencia del extremo 5' de la clona genómica.



#### IV.9. CLONACION DE ADNc POR RT-PCR

Se extrajo ARN total de hojas de amaranto tratadas con PEG al 20% (p/v) durante 12 horas, de acuerdo a un método conocido (Schuler y Zielinski, 1989).

La primera cadena se sintetizó usando M-MLV SuperScript II ARNasa H- transcriptasa reversa de acuerdo a instrucciones del fabricante (GIBCO BRL, Gaithersburg, EEUU). En un tubo Eppendorf se añadieron 5 µg de ARN total y 2 pmol del oligonucleótido RV (5'-CGCGGATCCTCAAGGAGACTTGTACCATCCCC), en un volumen final de 12 µL de agua. Se incubó a 70 °C durante 10 minutos e inmediatamente después se colocó en hielo. Posteriormente se adicionaron 4 µL de buffer de primera cadena 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3; KCl 375 mM; MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 2 µL de DTT 0.1 M y 1 µL de dNTPs 10 mM. El contenido se mezcló suavemente y se incubó a 42 °C durante 2 minutos. Se añadieron 200 unidades de SuperScript II, se mezcló pipeteando suavemente y se incubó a 42 °C durante 50 minutos. La reacción se inactivó por calentamiento a 70 °C. Finalmente, para eliminar el ARN complementario al ADNc, se añadieron 2 unidades de ARNasa H de *E. coli* y se incubó a 37 °C durante 20 minutos.

Para la segunda cadena se utilizaron oligonucleótidos específicos conteniendo sitios BamHI, correspondiendo al extremo N- terminal (FW) (5'-GCGGGATCCGGCGATCCGTGTACCTTCGC) y al extremo C- terminal (RV) (5'-CGCGGATCCTCAAGGAGACTTGTACCATCCCC) de la secuencia codificadora de la clona genómica. Se amplificó el fragmento de ADNc por PCR, usando un ciclo a 94 °C durante 5 minutos, 40 ciclos a 94 °C, 1 minuto; 55 °C, 2 minutos; y 72 °C, 3 minutos. Finalmente, 1 ciclo a 72 °C

durante 5 minutos. Se digirió el producto de PCR con la enzima BamHI y se fraccionó en un gel de agarosa al 1% para purificar la banda de ADN antes de clonarla en el vector pBluescript KS(+) como una fusión traduccional con  $\beta$ -galactosidasa.

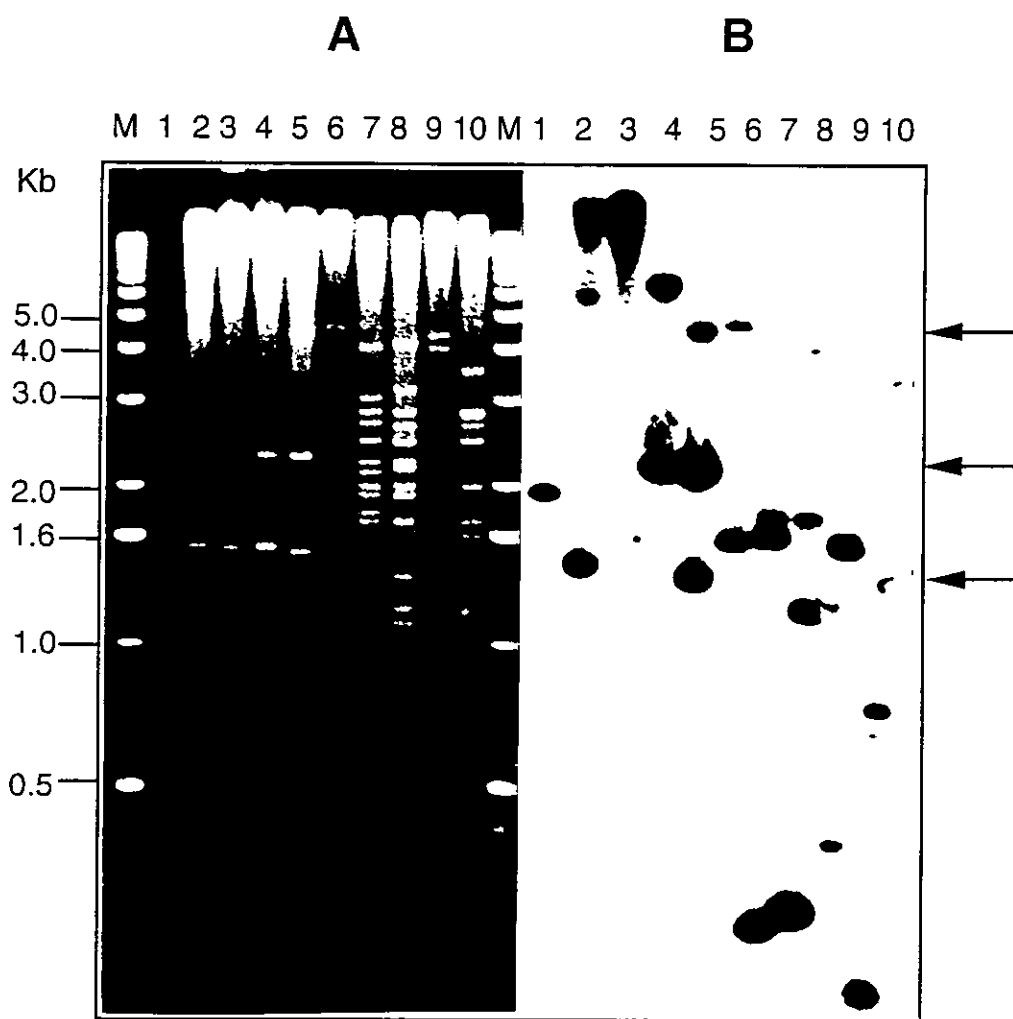
## V. RESULTADOS

### V.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA CLONA GENOMICA AHYBADH4 DE AMARANTO QUE CODIFICA PARA LA BADH

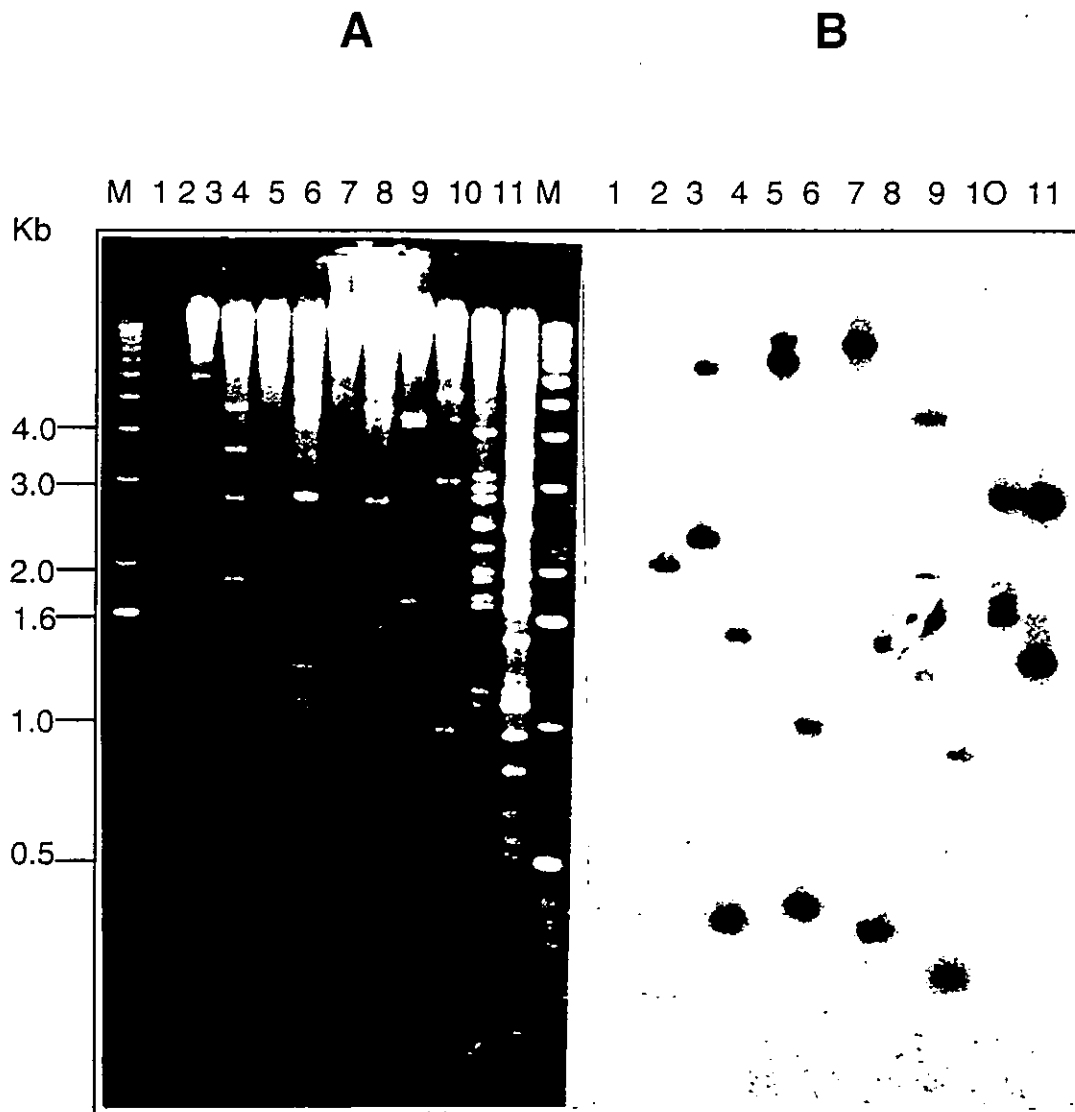
Para aislar el gen de la BADH de amaranto, se procedió a hacer un rastreo del banco genómico de amaranto utilizando como sonda el ADNc de la BADH de espinaca proporcionada por el Dr. A. Hanson (Weretylnik y Hanson, 1990). Se rastrearon 300,000 recombinantes y de los seis aislamientos originales se obtuvieron placas puras. Las seis clonas se caracterizaron por digestión con diferentes enzimas de restricción y por Southern. Una clona, que se denominó lambda *ahybadh4* mostró un inserto de aproximadamente 15 kb conteniendo una región de ADN que hibridaba con la sonda. Las Figuras 2 y 3 muestran el patrón de restricción y el Southern de la clona genómica *ahybadh4* luego de digerir con distintas enzimas de restricción e hibridar con el ADNc de la BADH de espinaca. La digestión de la clona *ahybadh4* con las enzimas de restricción *SacI/SalI* hibridó con la sonda en 3 fragmentos bien definidos (Figura 2, carril 5), que se pudieron reordenar en un mapa de restricción (Figura 4) de acuerdo también al patrón de digestión obtenido con varias enzimas de restricción. Se purificaron las bandas de 1.5, 2.2 y 4.3 kb y se procedió a clonaras en ambas orientaciones en el vector pBluescript KS- para luego mapearlas de nuevo y detectar los fragmentos que portaban región codificadora por hibridación con la sonda de ADNc de espinaca (Figuras 5 y 6).

Una vez subclonados los fragmentos de 1.5, 2.2 y 4.3 kb que hibridaban con la sonda, se procedió a realizar deleciones consecutivas (Figura 7) para luego obtener la secuencia de nucleótidos (Figura 13).

Dado que los tres fragmentos subclonados no portaban la secuencia



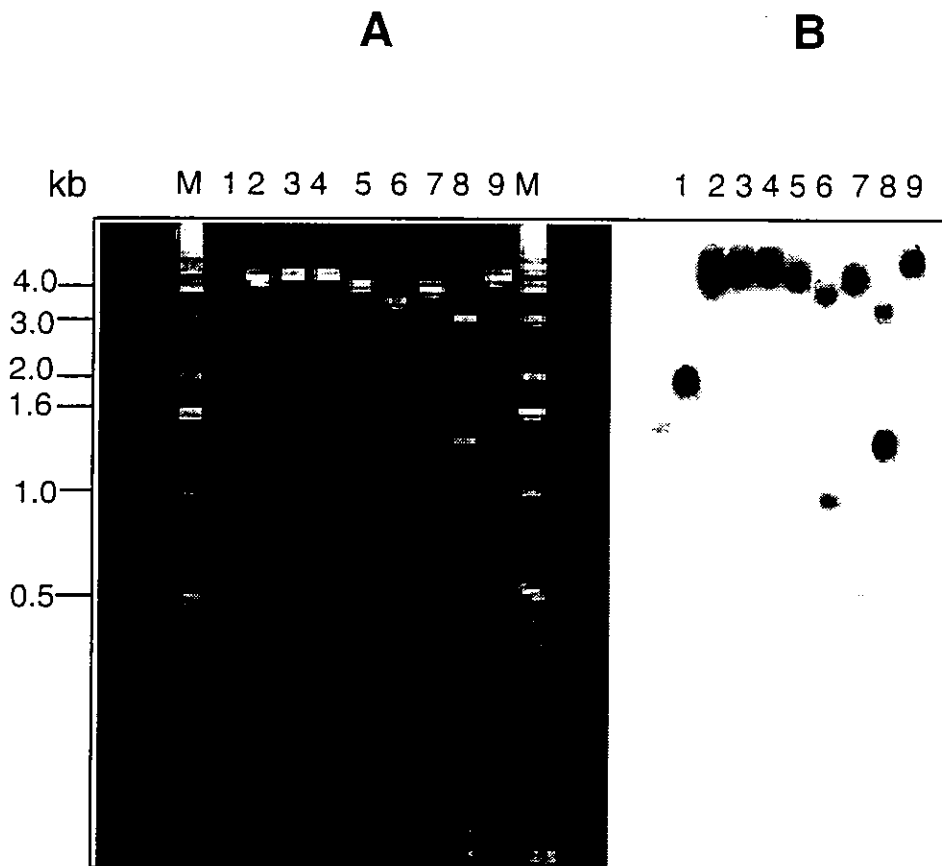
**Figura 2 .** Patrón de restricción de la clona genómica *ahybadh4*. Electroforesis en gel de agarosa (A) y Southern blot (B) de la clona genómica *ahybadh4* de *Amaranthus hypochondriacus* L. El ADN se digirió con diferentes enzimas de restricción: 1, control positivo ADN BADH de espinaca; 2, digestión con la enzima de restricción Hind III; 3, Kpn I; 4, Sac I/Kpn I; 5, Sac I/Sal I; 6, Sac I/ Xba I; 7, Sac I/Pst I; 8, Sal I/ Pst I; 9, Sal I/Xba I; 10, Xba I/Pst I.



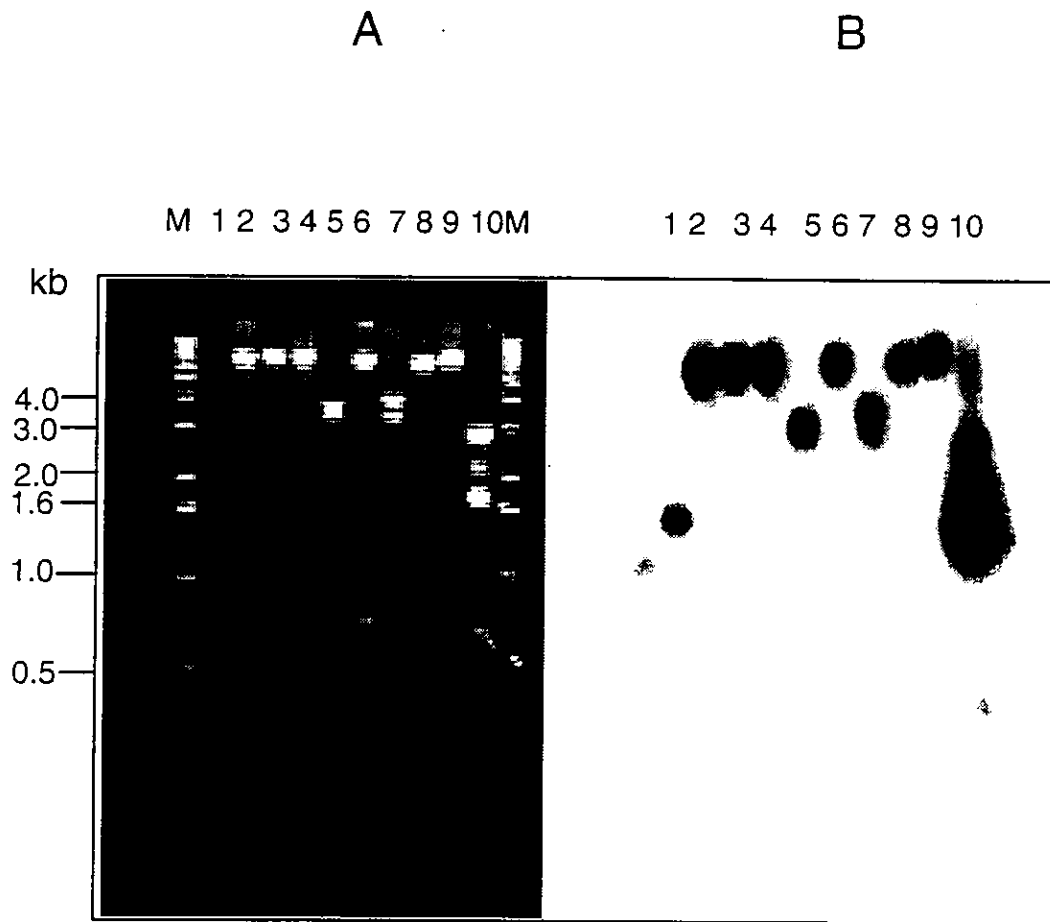
**Figura 3 .** Patrón de restricción de la clona genómica *ahybadh4*. Electroforesis en gel de agarosa (A) y Southern blot (B) de la clona genómica *ahybadh4* de *Amaranthus hypochondriacus* L. El ADN se digirió con diferentes enzimas de restricción: 1, control positivo ADN BADH de espinaca; 2, Sac I; 3, Sac I/ Hind III; 4, Sal I; 5, Sal I/ Hind III; 6, Xho I; 7, Xho I/Hind III; 8, Xba I; 9, Xba I/Hind III; 10, Pst I; 11, Pst I/Hind III.



**Figura 4.** Fragmentos de la clona genómica *ahybadh4* que hibridaron con la sonda de ADNc de la BADH de espinaca. La sonda hibridó con tres fragmentos (de izquierda a derecha) de 4.3 kb *SacI/SalI*, de 1.5 kb *SalI/SacI* y de 2.2 kb *SacI/SacI*.

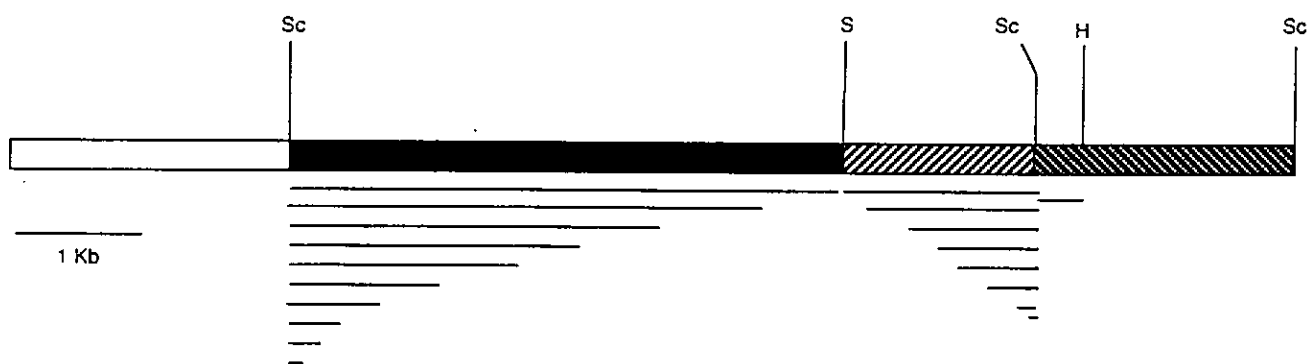


**Figura 5.** Patrón de restricción de la subclona de 1.5 kb de *ahybadh4*. Electroforesis en gel de agarosa (A) y Southern blot (B). El ADN se digirió con las enzimas: 1, control positivo ADNc BADH de espinaca; 2, XhoI; 3, SacI/EcoRI; 4, SacI/BamHI; 5, SacI/HindIII; 6, SacI/XbaI; 7, SalI/XbaI; 8, SalI/PstI; 9, KpnI.



**Figura 6.** Patrón de restricción de las subclonas de 4.3 y 2.2 kb de *ahybadh4*. Electroforesis en gel de agarosa (A) y Southern blot (B). El ADN se digirió con las enzimas: 1, control positivo ADNc BADH de espinaca; 2, XhoI; 3, SacI/EcoRI; 4, SacI/BamHI; 5, SacI/HindIII; 6, SacI/XbaI; 7, Sall/XbaI; 8, Sall/PstI; 9, KpnI; 10, fragmento de 2.2 kb digerido con SacI/XbaI.



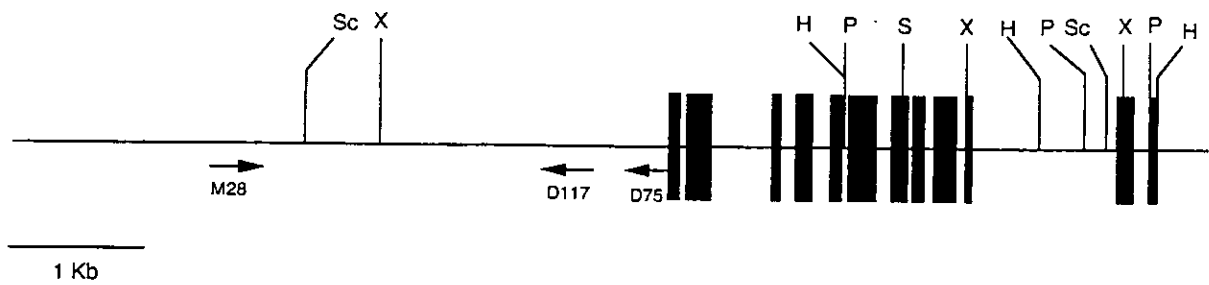


**Figura 7.** Deleciones consecutivas de la clona genómica *ahybadh4*. Se muestran las deleciones que se realizaron a los fragmentos de 1.5 kb *SacI/SalI* y 4.3 kb *SalI/SacI* con las enzimas Exonucleasa III/Nucleasa S1, así como el fragmento *SacI/HindIII* de 0.4 kb ubicado en el extremo 3' de la clona.

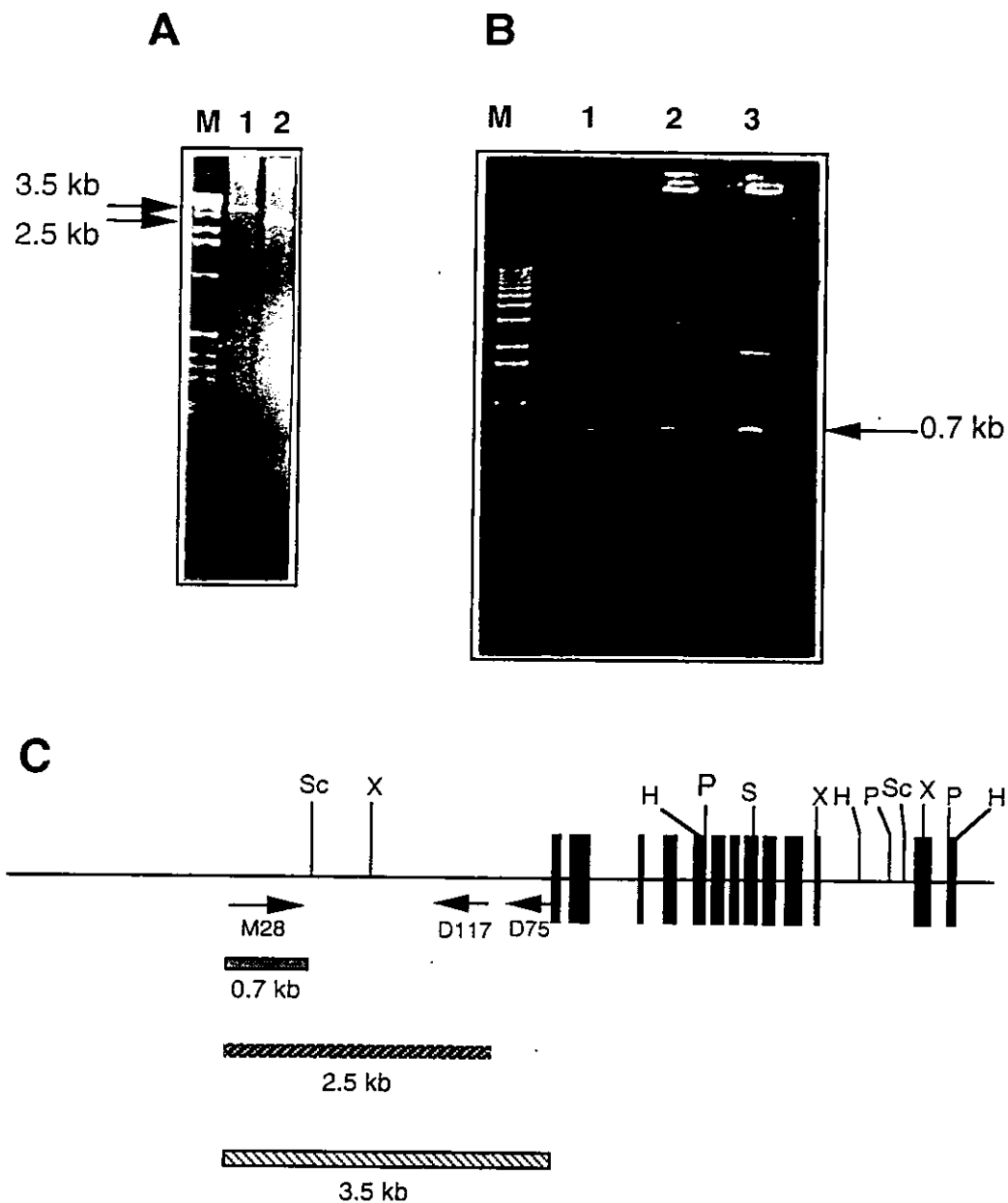
codificadora completa, faltando lo que corresponde a la región 5' del gen incluyendo el extremo N-terminal y región promotora, se procedió a mapear el resto de la clona genómica por PCR (Figura 8). Con este fin se sintetizaron tres oligonucleótidos, uno denominado M28 conteniendo la secuencia conservada 5'-GCGGATCCTGAGAGTGGAGAGAACCCAT cercana al sitio de inicio de la traducción de la BADH de espinaca, con un sitio de restricción BamHI (Weretilnyk y Hanson, 1990), y otros dos D75 (5'-GTCCCATGCTGCTTCA) y D117 (5'-GTGCTTCATCTCCTTA) portando una región de la secuencia del intrón mayor de *ahybadh4* cercano al extremo 5'. Utilizando ADN de la clona genómica *ahybadh4* como templado se procedió a hacer reacciones de PCR, obteniéndose dos fragmentos esperados de tamaños 2.5 y 3.5 kb (Figura 9A). Se digirieron con las enzimas SacI/BamHI, obteniéndose un fragmento de 0.7 kb (Figura 9B y 9C), portando la región codificadora restante, el cual se subclonó en el vector pGEM3zf(+) y se determinó su secuencia de nucleótidos (Figura 13).

Finalmente, para obtener la región del promotor se realizó un Southern con ADN de la clona *ahybadh4* digerido con diferentes enzimas de restricción y utilizando como sonda al fragmento de 0.7 kb arriba mencionado, se logró aislar un fragmento de 1.7 kb con sitios de restricción XbaI/XbaI en los extremos (Figuras 10 y 11). Posteriormente se subclonó en el vector pGEM3zf(+) y se obtuvo la secuencia de nucleótidos (Figura 13). De esta manera, se completó la secuencia total del gen *ahybadh4*.

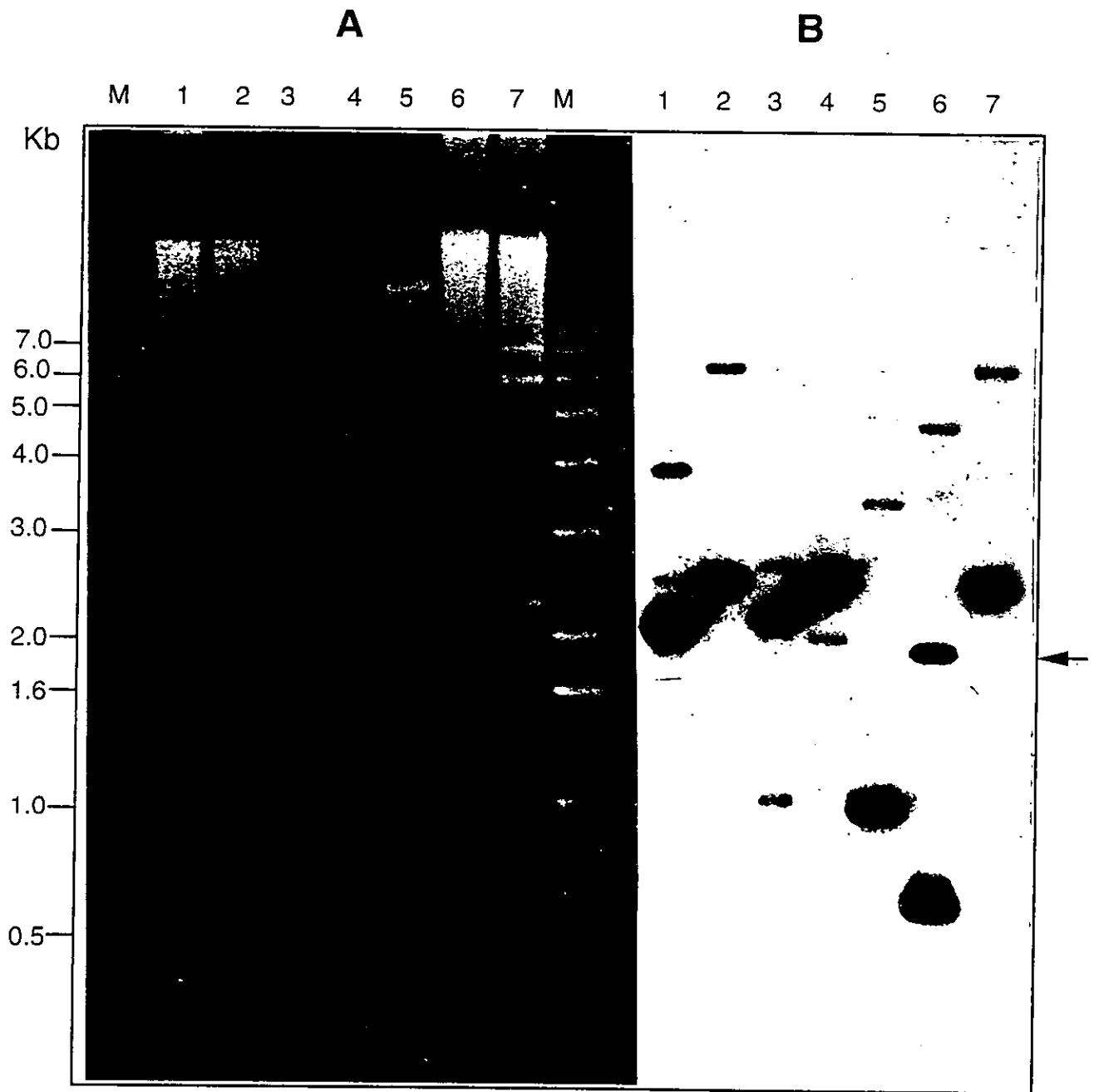
La Figura 12 muestra el mapa de restricción completo del gen *ahybadh4* de 8998 pb de longitud y la secuencia completa de nucleótidos se presenta en la Figura 13. Esta última reveló una estructura de 15 exones con un marco de lectura abierta de 501 aminoácidos,



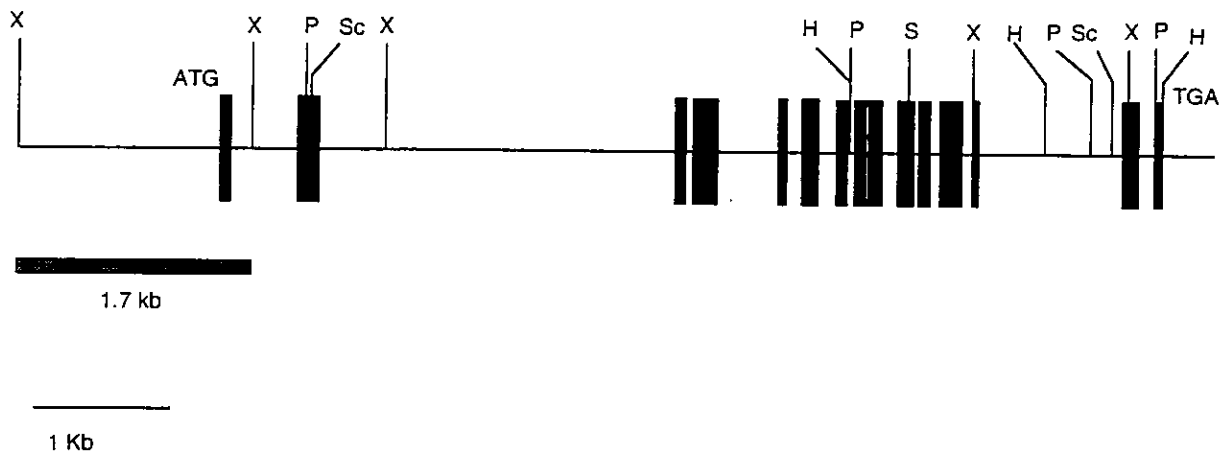
**Figura 8.** Mapeo del extremo N-terminal de la clona genómica *ahybadh4*. Se muestran los oligonucleótidos utilizados y su ubicación a lo largo de la cadena de ADN. Las barras negras indican los exones 3 al 15 (de izquierda a derecha).



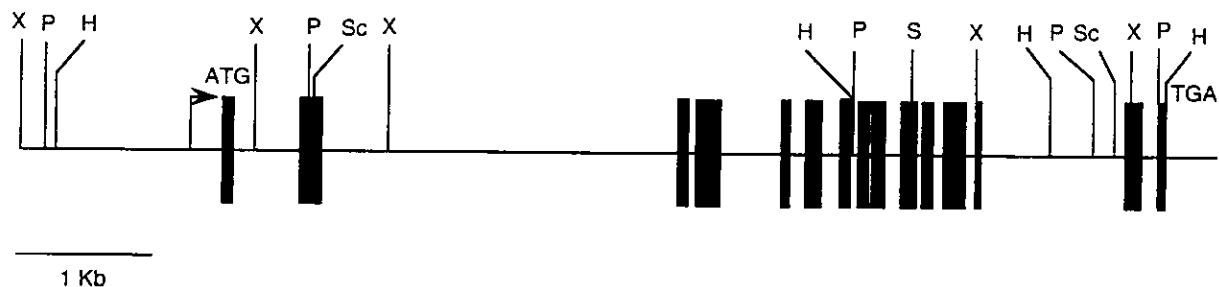
**Figura 9** . Detección de la región 5' del gen *ahybadh4*. **A**. Productos de la reacción de PCR utilizando el oligonucleótido D75 (1) y el oligonucleótido D117 (2) alineando al extremo 3' del segundo intrón de la clona genómica y el oligonucleótido M28 apareando al extremo 5', portando la secuencia deducida de la BADH de espinaca. **B**. Productos de la reacción de PCR digeridos con las enzimas de restricción *SacI*/*BamHI*, (1) fragmento de 0.7 kb puro, (2) fragmento de 3.5 kb y (3) fragmento de 2.5 kb. **C**. Ubicación del fragmento de 0.7, 2.5 y 3.5 kb en la clona *ahybadh4*.



**Figura 10** . Mapeo del extremo 5' de la clona genómica *ahybadh4*. Electroforésis en gel de agarosa (A) y Southern blot (B) utilizando el fragmento de 0.7 kb como sonda para obtener la región promotora contenida en el fragmento de 1.7 kb con sitios de restricción XbaI/XbaI. El ADN se digirió con las enzimas de restricción siguientes : 1, HindIII/SacI; 2, SmaI/SacI; 3, HincII/SacI; 4, EcoRV/SacI; 5, ClaI/SacI; 6, XbaI/XbaI; 7, XhoI/SacI.



**Figura 11.** Localización del fragmento de 1.7 kb de la clona genómica *ahybadh4* portando la región del promotor.



**Figura 12.** Mapa de restricción de la clona genómica *ahybadh4* de *Amaranthus hypochondriacus* L. La línea horizontal representa la secuencia de nucleótidos de 8998 pb. Los sitios de restricción son: X, XbaI; H, HindIII; S, SmaI; P, PstI; y Sc, SacI. La flecha representa el sitio de inicio de la transcripción y los bloques representan los exones.

*                    *                    *                    *                    *                    *	
<u>TCTAGAAGTTGGAGCTGTTTGGGTTAATTGCTCACAGCCTTGCTTTACTCAAGCTCCATG</u> XbaI	60
GGGAGGCACCAAGCGTAGTGGTTTTGGACGTGAACCTGGGGAATGGTGAGTCCATATTTT	120
TCCCGTCTACAATAACCATTATATCAGCCCCCTTGCATCACAACTTAACTCTTCATCCT	180
TCTTGATGTTAACTGTGGAATAAT <u>CCTGCAGGGTATCGAGAATTACTTGAATATAAAGC</u> PstI	240
AGGTGACTCGGATACTCTACTGATGAACCGTGGGATGGTACAAGTCTCCTTGAAGCTTTC HindIII	300
GATGAAATTCGCAGACGCCATCATCATGAAGTGGACAATGGTGTAGTTTACAGTTTGAAT	360
GTATTGTTAAATAAAGCATTGATGATGATGTATCACTCCATAGAATGGAGAAAAGTTTGA	420
ATCAGGAATAATATGTTTACATATTTGAACAAATCTGTGTTTATTTTCATTCTAAGATT	480
GAGCAAGCAGGATACATTTGTAACCTTAAACTGGGTATTACTATTTACTATAGGCTAATA	540
GCTATTTATCTTATTATTATTATAAATAGTATACTCATGGTTAAAATACAACCTTTTAA	600
TAAATTAAAAGCAGCCAACCTTAAATTAATCAAAATAGCAACTTGAAGAGGAATAAAACAC	660
CAATTTAAACAAGGTAAAATTTCAACTTGAACAGGTATAAATACCAAGGTAAAACATTA	720
ACGGTCCGTTTGGTAGGTAGGTAATAAACGGTGGTAATGAGAATGAAAACTAGTGTAAT	780
TTTTGAAAAAAATTTTTTAGCTAACTTGATGGTCATACTTATCCAACCTCAATCATCTC	840
ATTTTCTTCATAAAATTCATTTTAATGCATTATCATTGAGAGAGGTGATATTAGGTGGTA	900
AAGAAAATTTGTAAACAAAAATAACAAGCGTAACTTTAATTTGGTAACAACCTAATAGGT	960
TAAAACACCACTCCAAATATGTTAAAATACCAACTTCAAATACCAATTTGACAAGTTAA	1020
ACTTTAATATGTTATATAACCAACTTTTGATAGTTTTTCAAACATGTTAAAATACCAACTC	1080
CAAATAGATCAACATTTCAACTTTAATAGGTAAAATACCTACTCAAATAAGTTAAAATA	1140
CCATTTTTATAGATTAAAATATCAACCCCAAATAGGTAAATACAGGGAATAAGCGCGTGT	1200
TAGTTAATTTTATTTTGCTAATTACATATTAGTCTTTTTAAATAGGTGTGTCTCTTAATA	1260
AAGACGGTCTCTCACAA <u>CAATTTACGTTAAATGATACTTGTGTCGTGTGCAATATAAAAT</u>	1320
+1	
TAATTTAATTTGTATTGTGACGCACGGCCCTACCGAAGATACTCATCGGACTTGCCTAAC	1380
AAAAAGACGATCAGTATTTATCGATTACATTATTCACATCTTGTCTTGAAAATGAAATA	1440



TTAGTCATCTTGCTATAATATCAACGCTTTTACTTCTTATACTTCCAACCTCAACTGATT 1500

M A I R V P S R Q L F I D G E

TTTTCTCACCAAAAATGGCGATCCGTGTACCTTCGCGCCAGCTATTCATTGATGGAGAAT 1560

FW

W R E P I K K N R I P I I N P S T E E I

GGAGGGAACCCATCAAGAAAAATCGCATCCCTATCATCAATCCTTCTACTGAGGAGATCA 1620

I

TTgtgttggtttactttccccctttatatgttttatccaacttcttcacatgaatagcaaa 1680

accgacaaagatccaaaacattgaacttctctttcatatagatattttgagtgttcttatg 1740

aagttatttctagatttagattatgataacagaaatgctattactgaaaggattctttttc 1800

XbaI

ctgggttctggatttatggatgatgatgatgtgctttaatggtaattggaattggaatta 1860

ttttttttcagatttaagattgtttatttttttttaactactgggaatctgtcaaactct 1920

gattttctatgtggggtttgaatttgaatggtgatgatatgattttcgtgattgaaacta 1980

aagttaaaggatctataaattttctataggttcagttctgcgactctagtttatagggga 2040

ttaagacttttacattgttggtgatccatctattgggtgattaaagtttgcattcatcatc 2100

G D I P A A T A E D V E L A V A

atttgggttttagGGTGATATTCGGGCTGCTACTGCTGAAGATGTGGAGCTTGCAGTCGC 2160

A A R R A L K R N K G E D W A S A S G A

TGCAGCTAGAAGAGCGCTTAAGAGGAACAAAGGAGAAGATTGGGCGTCTGCATCTGGAGC 2220

PstI SacI

H R A K Y L R A I A A K

TCATCGTGCTAAGTACCTTCGGGCCATTGCTGCTAAAgtatgtattttagggtcttattt 2280

gattttatgggtattgtgtagactcttgatccatttatgttcttgatatctacggtgacca 2340

atagtttgatggttggtcactctgttttgtttaattggaatggaggagtgatagtgataat 2400

aatataaatagaattattgaattagctaaaaatgaaagctgtacattgacatcgaaagat 2460

gtacaacttcttagtgtaggtgataatccgtctatctgtgatgaaccaggcaagtacag 2520

acaataatgaagaaaaatagagagtagcaagagagaaggggggcagaattttcagaagaa 2580

aagagaagaaggtacagcagagaagaagaaaagataggggagagtagacaatttagaggg 2640

agatagtattttagatattctcattcataccaatcattatttacatcatactattttctagc 2700

tacaagtactcacaacttgctggccaaattgattgggttacaaaaagatgcttttttctaga 2760

XbaI

tatactcactaacagaaggcacctatattattgttggttagtaacttattctttttccacg	2820
cctgtgatacaccttccatccttttgcttgctcagtggtatgacacatcccattacaaag	2880
ctagcattttcctataagtgagggtgaagcctttcattgaagggagggacaatttttatgg	2940
gacgtttggtttattggtattagatagtggttaatgagatgtaaaaaaatatgtcactgt	3000
tcccatgtattgcatcccagattttcctataagtttctacttgttcgtcaacagctctgtt	3060
tcaaaacgaagacatacccttttagtaagttttttctcttttatatcgtacccacacccaa	3120
tcacccatttttctttattttcaaattcttgctcagatttatggttggtggttgattga	3180
ggagtcttggtattcgtatctggttcatgtaacttttcagttaaactcaaggctagctta	3240
atcttttgctcgttaccagtcataattcaattgggctgaaatttccaagtacctcattgag	3300
tattaagctaattgaaattgcttgccaaacaaaacaattggttctaacaacaatggctgag	3360
cacttatttccaagtacctcaaaagttaggatcggctaaaacaagcacttattccattg	3420
ctgaactgtcattaggggtgataataagggtgaattttaggctcacaaccttattatttgt	3480
gcccatattttctttcctcaagagagttgtgtcagctattagtgacagttttttactatt	3540
tatttcaaatagagctcaaggattctctcttgaaaaacattttcactttgaatttacgaa	3600
gtttctatctttatggtaaacatggatgtatgagtagacgagtagtatacacttccattt	3660
gggtattttctttttcttgaatatcatttaggtatgtggtgattgctttcttgtagcac	3720
atttggcattttgagtgagcatgaagattatctaattgggaggatttaatcatctagcaat	3780
aaaactgagacctaatgataataatgtcgagtacttttaaagtaggtaaagatgcctaca	3840
tatgctggaagcctggaatttcgtatacatctccgcaaattgattaactctagtcatggt	3900
gaatttatcatttgtacaccattgttttagagttgtaagagatatagataaagaacattt	3960
gtaatgttttagtagtcttctgaaagttggccttagattgtactcttgcttggttttgtt	4020
gcgtaagattttgtggaatatttatctttgatatggttgcttccctaaggagatgaagca	4080
ctaaatttattaagcatttggatgtattgaaatctggtgatatcatccctgattcatcaag	4140
tatgtcactaccatatttcaattcaaatgtgttctccaagggggtattgggagttcagta	4200
ctcagtatgacctatatctcatttacatactcaagcattagatattgatactttcagggt	4260
cacctggatgcaactttttgagacttcaagagtcattgtacttattttatggattataca	4320
ttgatcctttggaaggaatcaagtggttaagactcactataatgagtatcaattgaccgt	4380

gcacaaagagtgtttcatttcgattctcacacttcccacatccctttcctgtcctcctgt 4440

ccccatgtaacaattaagtgtggcggttgctagtcctttctcccaatcctcacagagget 4500

cagctttctggactagaagatctccatttaaatttatgtaaattgggatacaattgtcata 4560

aacaagattactcagtacataggttttaggtgtggacttcacgccatagtgaaaaatctca 4620

agtttggcgttgcggttaagggtcacagttgcggtattgggtcgttaaaccactttcacia 4680

ccaagttgggtgattttgcagttgtggcctatatcatggctctcttttaccataagttttg 4740

atatataatattgccacaatgctctgatgttatgggtgtgaaataaggtttcagtcatggt 4800

tgtggtaatgggtcgcagaaatgacttttgtggttgcctcggcctatatttttagtcatggt 4860

aagatcaaaaaccattacaacacttttgatacgggtgcgatgctttgctctatgcggtgatc 4920

cggatgatattttgacattttgcttgtgctccatgcctgactctctaattttgcttgtag 4980

I T E K K D Y F A K L E A M D C G K P L  
ATAACAGAGAAAAAGATTATTTTGCAAACCTGAAGCCATGGATTGTGGGAAACCACTG 5040

D E A A R D I  
GATGAAGCAGCTAGGGACATTgtaagtttatgttgtagtatcgttatataatcttcta 5100

actgtttctttcccagatattaactaggctttccagGATGATGTTGCTGGATGTTTTGAA 5160

Y Y A D Q A E A L D A K Q K A P I A L P  
TATTATGCCGATCAAGCAGAAGCCCTTGATGCTAAACAAAAGGCTCCAATTGCCCTTCCT 5220

M D T F K C H V L K Q P I G V V G L I S  
ATGGACACTTTCAAATGCCATGTGCTTAAACAACCCATTGGTGTGTGTTGGGTTGATTTCT 5280

P W  
CCTTGGgtagtatggacccccagcgcctctttcctccaataagaaactgggtgaaattgaaa 5340

caaatatgacaattcattcatttcttgcggtcatcaaatctgaaggggatcgatattaat 5400

cagataaaacaacttgtctaataatgggggaagtgcaagtgcgcaacaggatatctcac 5460

aatcaattttattcgttgactgattattttttgcggaacatgtatttttgatgaacaca 5520

caagagaaggaatggacaataacatataagtttttttgcgatttcatgcttgcaagttg 5580

caactcttcactgaaggatcacttaatttgaaaataaagattttgcgctcttttttcagtt 5640

ttttcgtccttttttatatattttttccttgtgcaaatgtgcatttagcttcttggtat 5700

gagcttgggaaatgtgatgttttatgtttcttgtcatctttttcattgaaqAATTATCCG 5760

N Y P

L L M A T W K V A P A L A A G C S A V L  
 CTTCTAATGGCAACATGGAAAGTTGCTCCAGCTCTTGCTGCTGGTTGCTCAGCTGTACTT 5820

K P S E L A S V  
 AAGCCGTCTGAACTGGCATCCGTAgtagctttattctgaaactatcactgtccgaacttc 5880

T C  
 actcaaagcgatactgatattttctgtttcttcgaaaacttcgacttttgacttcagACTTG 5940

L E L A E V C R E V G L P P G V L N I L  
 CCTAGAATTGGCTGAAGTGTGCAGAGAAGTGGGACTGCCTCCTGGCGTATTAAATATTTT 6000

T G L G P E A G G P L A C H P D V D K  
 AACAGGATTAGGTCCTGAAGCTGGTGGGCGTTAGCTTGCCATCCTGATGTTGACAAGgt 6060

tacatthttgagtgcatthttatgtaaaatgaatctgtagatgtgaactthttcctthttcctgtt 6120

V A F T G S T A T G S  
 cattthtaatcacttatctacttgatagGTTGCATTTACTGGGAGTACAGCTACTGGTAGC 6180

K V M S S A A Q L V K  
 AAGGTTATGTCATCCGCTGCTCAATTGGTCAAGgttttgtcacaaatgtactccatgaaag 6240  
 HindIII

P  
ctttgatataacttaatgttgagttccttctatgaaatthtttaacatgaactgcagCCTG 6300  
 PstI

---

V T L E L G G K S P I V I F E D V D L D  
 TTACATTAGAACTTGGAGGGAAAAGTCCTATTGTTATCTTTGAAGATGTTGACTTGGATA 6360

K  
 AAgttagthttctataagagcagacacatcagttattthgtctcgtgtagatctatcaacac 6420

A A E W T A F  
 atgthtctaatacgttaaaaactthtttcaaattgaacagGCTGCTGAATGGACTGCTTTTG 6480

G C F W T N G Q I C S A T S R L L V H  
 GCTGTTTTTGGACAAATGGTCAAATTTGCAGTGCAACATCGAGATTACTTGTGCATgtaa 6540

gcaatcaatcattaccatggaatattgcctgattthttcgatgtgthtgaatthttgthtgtt 6600

E S I A A E  
 gtctcctatattthaaaaatatcgtcttcgaaatcattthcaGAAAGCATCGCAGCTGAAT 6660

F L D R L V K W C K N I K I S D P F E E  
 TTTTGGATAGGCTTGTAATAATGGTGCAAAAACATAAAGATCTCTGACCCGTTTGAGGAAG 6720

G C R L G P V V S K S Q  
 GCTGTCGACTTGGTCCTGTTGTGAGTAAGAGTCAGgtatgcatacttgthtactthttctgtt 6780  
 SalI

Y  
 thtttagatctaactattccgagctgaagggtatcttatattthtttgthgggthtcagTA 6840

E K V L K F I S T A K S E G A T I L C G  
 TGAAAAAGTTTTGAAGTTCATTTCAACAGCAAAGAGTGAGGGTGCAACTATTTTGTGTGG 6900

G S R P E  
 AGGTTC~~CCCGTCCCGAG~~gtaaactaatggacatattttaatcgatccatcgttgtggttta 6960

H L K K G Y Y V E  
 tgtaatcttactgttttatttggaaatcggtgcagCATTTGAAGAAAGGGTATTATGTTGAAC 7020

P T I I S D V S T S M Q I W R E E V F G  
 CAACAATTATAAGTGATGTCTCCACTTCCATGCAAATATGGAGGGAAGAAGTTTTCGGCC 7080

P V L C Q K T F G S E D E A I E L A N D  
 CAGTCTTATGTCAAAAAACCTTTGGTTCTGAAGATGAAGCCATTGAAGCTGGCTAATGATA 7140

T  
 CCgtaaagctattttcaaatagtagaactgtccaaaaatacttttcagaccatgcctttat 7200

tataccgtggtcccagattttgctttattttctagaatcttattctgaccgatcactttgt 7260  
 XbaI

Q Y G L G A A V L S K D L D R C E R  
 ttcagCAGTATGGTTTAGGGGCTGCTGTGTTATCGAAAGATCTTGATCGGTGTGAGAGAA 7320

I T K  
 TAACAAAGgtgagaattggtgagtagaggcgttcattctgggtcatagggttgatttcaac 7380

ttttcaagtcaaggtggttcagggtcgggtcaaactcgggttttttgtcaaattgggttttaca 7440

taattgcaaaatcatttttaagtgacaattgggtcgggttataatggttgggttaatat 7500

tgggtcgtcgggtttgttttaaatacctctactggtgaggtttggttgtgctttgaaagt 7560

tttcagaaaatgccaagaccacattttatcgtaaattgtattttgctgctattatcaggc 7620

attgcaagctggaattgtgtgggttaactgctcacaaccatgcttttgccaagctccatg 7680

gggaggcacgaagcgtagctctttggacgtgaactcgggaatggtgagaccatttcttt 7740

ttgcaatttttctgtcaacttcttcactcccaagatagccagatatatgtaagcttgtct 7800  
 HindIII

tttcgttatgtgcacttagtttcatctgaagggacaggtcacagaaagtattatgataat 7860

atccctttttaaagtatccaacgaaaaacatatctggacaaaatattttcctggatgact 7920

tttactccttctgatttcttcactcccttaattcaatttgcataactgtatagtttgca 7980

acataatgacaaatttttatgtacaaatttgtttgaacggttctgattcttgcaactgct 8040

gttttatcttcttgatgtggaactatgatgcttaattggttctgcagggttatcgagaatt 8100  
 PstI

acttgaatatcaacaagtgactgatataatttccgatgaaccatggggttgggtacaagtc 8160



codificando para una proteína (AHYBADH4) de peso molecular teórico de 54.4 kD y punto isoeléctrico predicho de 5.2. El codón de inicio de la traducción tiene el contexto consenso encontrado en otros genes de plantas (Lutke *et al.*, 1987).

Los exones presentan una longitud que varía de 60 a 153 pb. La secuencia codificadora se interrumpe por 14 intrones de longitud variable, de 75 a 2723 pb, comprendiendo todos ellos 5624 nucleótidos de la secuencia del gen *ahybadh4*. Todos los intrones del gen *ahybadh4* presentan el dinucleótido GT en el sitio de ruptura en el extremo aceptor 5' y AG en el extremo donador 3'. Esto es consistente con el consenso de sitios de procesamiento de intrones de los genes de plantas transcritos por la ARN polimerasa II (Brown, 1986). La posición de los 14 intrones en el gen *ahybadh4* se confirmó luego de comparar con la secuencia de nucleótidos del ADNc *ahybadh17*. La región no traducida (UTR) 3' es de 360 nucleótidos de longitud y contiene dos posibles secuencias de poliadenilación, AATAAA, localizadas a 76 y 297 nucleótidos hacia el extremo 3' del codón de terminación (TGA).

## **V.2. COMPARACION DE LA BADH DE AMARANTO CON OTRAS SECUENCIAS REPORTADAS**

La secuencia deducida de aminoácidos de la AHYBADH4 de *Amaranthus hypochondriacus* L. mostró un 98% de identidad con AHYBADH17, 39% de identidad con la BADH de *E. coli* (Boyd *et al.*, 1991) y 83, 83, 70, 62 y 70% de identidad con secuencias reportadas para espinaca (Weretylnik y Hanson, 1990), remolacha (McCue y Hanson, 1992), arroz (Nakamura *et al.*, 1997), sorgo (Wood *et al.*, 1996) y cebada (Ishitani *et al.*, 1995),

respectivamente (Figura 14, Tabla IV). Por tanto, la secuencia de aa de la BADH de *A. hypochondriacus* está mas relacionada a BADHs de la familia Chenopodeaceae que a la Poaceae o BADH de procariotes, como se muestra en el dendograma (Figura 15) y que está de acuerdo con las relaciones filogenéticas. Además, al comparar las secuencias genómicas entre amaranto y arroz se observó que la posición de los intrones está conservada en ambas especies, aunque su tamaño y secuencia es diferente (Figura 16).

El decapeptido VTLELGGKSP y los residuos circundantes (Figura 17), presente en AHYBADH4 y AHYBADH17, está altamente conservado entre las aldehído deshidrogenasas, entre BADHs y se considera parte fundamental del sitio activo de la enzima y sitios de unión al cofactor NAD<sup>+</sup> (Weretilnyk y Hanson, 1990; Boyd *et al.*, 1991; McCue y Hanson, 1992; Wood *et al.*, 1996). Su presencia en AHYBADH4 y AHYBADH17 sugiere que se trata de enzimas funcionales.

La BADH de espinaca se localiza en el estroma del cloroplasto y es codificada por un gen nuclear, por lo que se presume que se dirige por medio de un péptido de tránsito localizado en el extremo N-terminal que se procesa de manera postraduccional (Weretilnyk y Hanson, 1990). Este péptido de tránsito de 8 aminoácidos es inusualmente corto y muy conservado entre BADHs de plantas dicotiledóneas (Tabla V). La proteínas deducidas AHYBADH4 y AHYBADH17 tienen también esta secuencia, lo que sugiere una localización intracelular similar a la BADH de espinaca.

Recientemente, se reportó que la enzima BADH de arroz (OSBADH) se localiza en los peroxisomas, dirigida probablemente por la secuencia SKL localizada en el extremo carboxi-terminal de la proteína (Nakamura *et al.*, 1997). El tripéptido está presente en todas las proteínas BADH de plantas

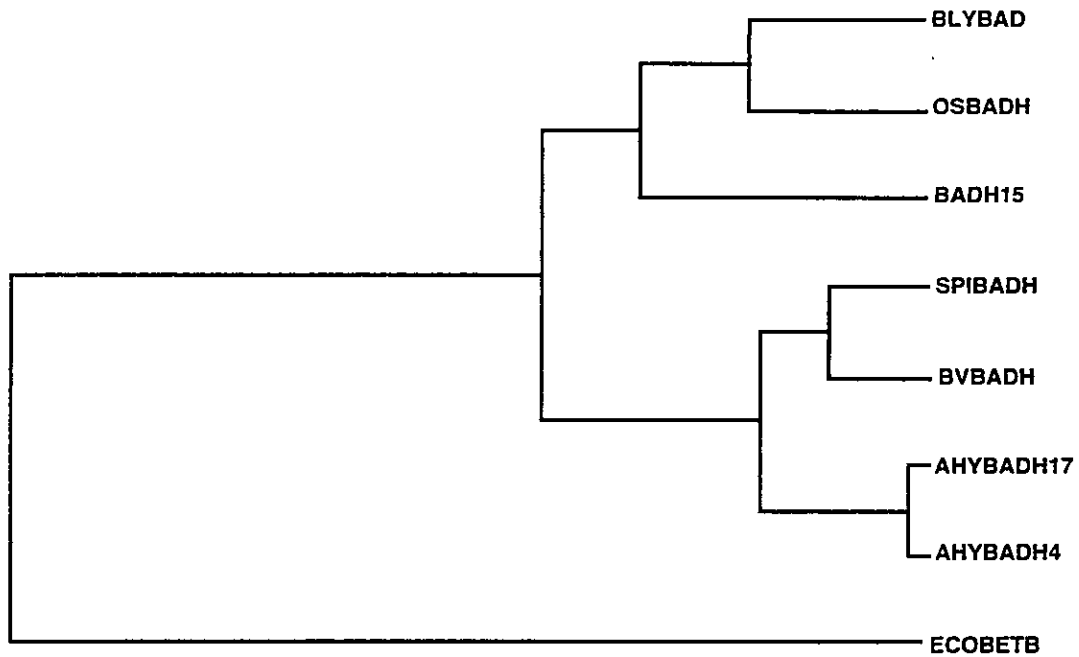


ECOBETB	MSR---MAEQ	QLYHGGYTS	ATSGRTFETI	NPANGVLLAT	VOAGREDDV	RAVNSAQGG	K-----IWAS	MTAME	67	
BADH15	MAA-ADVFRP	S-FEGGDWRE	PCL-----PVC	QPTEATIGD	IPATARDVE	MPVARGVSD	GGAL-VACLW	GRASQ	68	
BLYBAD	MAAPPAIPRR	GLEFDGEWRE	PTLGRHIPVI	NPATEDIGD	IPATARDVE	LANAAGGPVL	ARRR-EPWAR	ASGAT	74	
AHYBADH17	MAIR--VPSR	QLFDGEWRE	PIKKNRIPII	NPSTEEIIGV	IPATARDVE	LANAARRAI	KRNKGEDWAS	ASGAH	73	
AHYBADH4	MAIR--VPSR	QLFDGEWRE	PIKKNRIPII	NPSTEEIIGD	IPATARDVE	LANAARRAI	KRNKGEDWAS	ASGAH	73	
SPIBADH	MAFP--IPAR	QLFDGEWRE	PIKKNRIPII	NPSTEEIIGD	IPATARDVE	VAUVAARRAI	RRN---NWSA	TSGAH	70	
BVBADH	MSMP--IPSR	QLFDGEWRE	PIKKNRIPII	NPSTEEIIGD	IPATARDVE	VAUVAARRAI	KRNKGREWAA	TSGAH	73	
OSBADH	MAAPSAIPRR	GLEFDGEWRE	PSLGRRLPVV	NPATEDIGD	IPATARDVE	LANAARRAI	GRDGRHWSR	APGAV	75	
ConsensO	MA---MAEQ	QLYHGGYTS	ATSGRTFETI	NPANGVLLAT	VOAGREDDV	RAVNSAQGG	K-----IWAS	MTAME	67	
ECOBETB	RSRILRRAVD	ILRERNDELA	KLETLDGSKP	YSEFSTVIV	TGAVLLEVNA	GLIPALGSSC	--IPLRETS	F-VYT	138	
BADH15	LSHTIAA-KI	K-DRKSESLA	LLETLDGSKP	LDE-ASADND	DVAACFEVYA	DLAENLDGKC	RSPISLPMEN	FKSYV	140	
BLYBAD	RAKYLNAIAA	KITGKIAYLA	LLETLDGSKP	KDE-AVADND	DVAACFEVYA	DLAENLDGKC	HAPISLPMER	FKPIYV	148	
AHYBADH17	RAKYLRAIAA	KITEKKDYFA	KLEAMDGKPT	LDE-AAWDD	DVAACFEVYA	DOAENLDAKK	KAPIALPMDT	FKCHV	147	
AHYBADH4	RAKYLRAIAA	KITEKKDYFA	KLEAMDGKPT	LDE-AARDID	DVAACFEVYA	DOAENLDAKK	KAPIALPMDT	FKCHV	147	
SPIBADH	RATYLRAIAA	KITEKKDHFV	KLETLDGSKP	FDE-AVLDID	DVAACFEVYA	DOAENLDGKC	KAPVTLEMER	FKSHV	144	
BVBADH	RARYLRAIAA	KVTERKDHFV	KLETLDGSKP	FDE-AVLDID	DVAACFEVYA	DOAENLDGKC	KAPVTLEMER	FKSHV	147	
OSBADH	RAKYLNAIAA	KIKDKKSYLA	LLETLDGSKP	LDE-AAGDNE	DVAACFEVYA	DLAENLDGKC	RAPISLPMEN	FKSYV	149	
ConsensO	RA.YLRAIAA	KITEKKD.FA	KLETLDGSKP	LDE.A.AND	DVAACFEVYA	DLAENLDGKC	RAPISLPMEN	FKSYV	150	
ECOBETB	RRRPLGVVAG	IFPWNYPFLM	ATNKYAPALA	AGTAVLKPS	ELASITCLER	GAICEHICLP	SGVLNITGCL	GPAG	223	
BADH15	LKKEPLGVVSL	IFPWNYPFLM	ATNKYAPALA	AGTAVLKPS	ELASITCLER	GAICEHICLP	SGVLNITGCL	GPAG	223	
BLYBAD	LKKEPLGVVGL	IFPWNYPFLM	ATNKYAPALA	AGTAVLKPS	ELASITCLER	GAICEHICLP	SGVLNITGCL	GPAG	223	
AHYBADH17	LKKEPLGVVGL	IFPWNYPFLM	ATNKYAPALA	AGTAVLKPS	ELASITCLER	GAICEHICLP	SGVLNITGCL	GPAG	223	
AHYBADH4	LKKEPLGVVGL	IFPWNYPFLM	ATNKYAPALA	AGTAVLKPS	ELASITCLER	GAICEHICLP	SGVLNITGCL	GPAG	223	
SPIBADH	LRQPLGVVGL	IFPWNYPFLM	ATNKYAPALA	AGTAVLKPS	ELASITCLER	GAICEHICLP	SGVLNITGCL	GPAG	224	
BVBADH	LRQPLGVVGL	IFPWNYPFLM	ATNKYAPALA	AGTAVLKPS	ELASITCLER	GAICEHICLP	SGVLNITGCL	GPAG	224	
OSBADH	LKKEPLGVVGL	IFPWNYPFLM	ATNKYAPALA	AGTAVLKPS	ELASITCLER	GAICEHICLP	SGVLNITGCL	GPAG	224	
ConsensO	LKKEPLGVVGL	IFPWNYPFLM	ATNKYAPALA	AGTAVLKPS	ELASITCLER	GAICEHICLP	SGVLNITGCL	GPAG	224	
ECOBETB	QYLTEHGGIA	KVSEFGVVAS	GKKVYANSAA	SSLKVTMEL	GKSPVLEH	IV-DLLKAAE	WTAFGCFWLN	QQIIS	295	
BADH15	LHYPHIPCGI	RLLLLGSTET	GKRIMT-SAA	QMVVYSLLE	GGRSPVLEH	IV-DLLKAAE	WTAFGCFWLN	QQIIS	295	
BLYBAD	APIASHPHVD	KIAFTGSTAT	GKRIMT-SAA	QMVVYSLLE	GGRSPVLEH	IV-DLLKAAE	WTAFGCFWLN	QQIIS	295	
AHYBADH17	GPLACHPDVD	KVAFITGSTAT	GSKVMS-SAA	QLVKVYTLLE	GGRSPVLEH	IV-DLLKAAE	WTAFGCFWLN	QQIIS	295	
AHYBADH4	GPLACHPDVD	KVAFITGSTAT	GSKVMS-SAA	QLVKVYTLLE	GGRSPVLEH	IV-DLLKAAE	WTAFGCFWLN	QQIIS	295	
SPIBADH	APLVSHPDVD	KIAFTGSSAT	GSKVMA-SAA	QLVKVYTLLE	GGRSPVLEH	IV-DLLKAAE	WTAFGCFWLN	QQIIS	292	
BVBADH	APLAAHPDVD	KVAFITGSSAT	GSKVMA-SAA	QLVKVYTLLE	GGRSPVLEH	IV-DLLKAAE	WTAFGCFWLN	QQIIS	295	
OSBADH	APLASHPHVD	KIAFTGSTAT	GKRIMT-TAS	QMVVYSLLE	GGRSPVLEH	IV-DLLKAAE	WTAFGCFWLN	QQIIS	297	
ConsensO	.PLA.HH.VD	K.AFTGSTAT	G.KVM	-SAA	Q.VKVYTLLE	GKSPVLEH	IV-DLLKAAE	WTAFGCFWLN	QQIIS	300
ECOBETB	NGIRVFPVPAK	CKAAFEOKIL	ARVERKAGD	YFDQYNFGR	LVSEPHRDNV	IRYAKGKEE	GARVLCGGD	LKGDG	362	
BADH15	AASRLLLHEK	MAKKEFLDRLV	HGAKNKVYSD	PLEEGCRLGS	VVSHGQVEKI	KKFESTAKSE	GATILYEGA	-RPQH	362	
BLYBAD	ATSERLLLHEK	IAAEFLDRLV	EWARNKISD	PLEEGCRLGS	VVSHGQVEKI	KKFESTAKSE	GATILYEGA	-RPKH	370	
AHYBADH17	ATSERLLVHES	IAAEFLDRLV	KWCKNKISD	PFEEGCRLGH	VVSHGQVEKI	KKFESTAKSE	GATILYEGA	-RPEH	368	
AHYBADH4	ATSERLLVHES	IAAEFLDRLV	KWCKNKISD	PFEEGCRLGH	VVSHGQVEKI	KKFESTAKSE	GATILYEGA	-RPEH	368	
SPIBADH	ATSERLLVHES	IAAEFLDKLV	KWTRNKISD	PFEEGCRLGH	VVSHGQVDKI	KKFESTAKSE	GATILYEGA	-RPEH	365	
BVBADH	ATSERLLVHES	IAAEFLDRLV	KWTRNKISD	PFEEGCRLGH	VVSHGQVDKI	KKFESTAKSE	GATILYEGA	-RPEH	368	
OSBADH	ATSERLLLHEK	IAKREFLDRLV	AWAKNKISD	PLEEGCRLGS	VVSHGQVQKI	KKFESTAKSE	GATILYEGA	-RPQH	370	
ConsensO	ATSERLLVHE	IAA.ELDRLV	.W.KNKISD	PFEEGCRLGH	VVSHGQV.KI	KKFESTAKSE	GATILYEGA	-RP.H	375	
ECOBETB	FDNGAWVAPT	YFDQSDDMT	YRREYFGPV	MSILTYESD	YTRRANDTI	YGLAGAVIS	DLERCFERITK	ALQSA	437	
BADH15	LKKGFFLEPT	YITDVSSTMO	YRREYFGPV	CVKFRFESD	YVELANDTI	YGLAGAVIS	DLERCFERITK	ALQSA	437	
BLYBAD	LKKGFFLEPT	YITDVSSTMO	YRREYFGPV	CVKFRFESD	YVELANDTI	YGLAGAVIS	DLERCFERITK	ALQSA	445	
AHYBADH17	LKKGYYVEPT	YISDVSTSMO	YRREYFGPV	LCVKTFFSSD	YVELANDTI	YGLAGAVIS	DLERCFERITK	ALQSA	443	
AHYBADH4	LKKGYYVEPT	YISDVSTSMO	YRREYFGPV	LCVKTFFSSD	YVELANDTI	YGLAGAVIS	DLERCFERITK	ALQSA	443	
SPIBADH	LKKGYYVEPT	YITDVSSTMO	YRREYFGPV	LCVKTFFSSD	YVELANDTI	YGLAAAVESN	DLERCFERITK	ALEVG	440	
BVBADH	LKKGYYVEPT	YISDVSTSMO	YRREYFGPV	LCVKTFFSSD	YVELANDTI	YGLAGAVIS	DLERCFERITK	ALEVG	443	
OSBADH	LKKGFFLEPT	YITDVSSTMO	YRREYFGPV	CVKFRFESD	YVELANDTI	YGLAGAVIS	DLERCFERITK	ALQSA	445	
ConsensO	LKKG...EPT	YITDVSSTMO	YRREYFGPV	CVKFRFESD	YVELANDTI	YGLAGAVIS	DLERCFERITK	ALQSA	450	
ECOBETB	ICWINTWGES	PAEMPVGGYK	HGIERRENGY	MTLQSYQVSI	SI-----QV	EMARFQSIF			490	
BADH15	I--DNCSQPC	FVQAPVGGNK	RMFERELGE	WGLDNTLSVI	QVTK-YCSDE	EWGWYQPPSK			494	
BLYBAD	I--DNCSQPT	FVQAPVGGNK	RSGFRELEGE	WGLDNTLSVI	QVTR-YCKDE	LYGWYQPPSK			505	
AHYBADH17	I--DNCSQPC	FVQAPVGGTK	RSGFRELEGE	WGIENTLNII	QVTR-EYISDE	EWGWYKSP			500	
AHYBADH4	I--DNCSQPC	FVQAPVGGTK	RSGFRELEGE	WGIENTLNII	QVTRDTSTDE	EWGWYKSP			501	
SPIBADH	I--DNCSQPC	FVQAPVGGTK	RSGFRELEGE	WGIENTLNII	QVTRD-ISDE	EWGWYKSP			497	
BVBADH	I--DNCSQPC	FVQAPVGGTK	RSGFRELEGE	WGIENTLNII	QVTRD-ISNE	EWGWYKSP			500	
OSBADH	I--DNCSQPC	FVQAPVGGNK	RSGFRELEGE	WGLDNTLSVI	QVTK-YCSDE	EWGWYQPPSK			505	
ConsensO	I--DNCSQPC	FVQAPVGGTK	RSGFRELEGE	WGIENTLNII	QVTR...SDE	EWGWYKSP			511	

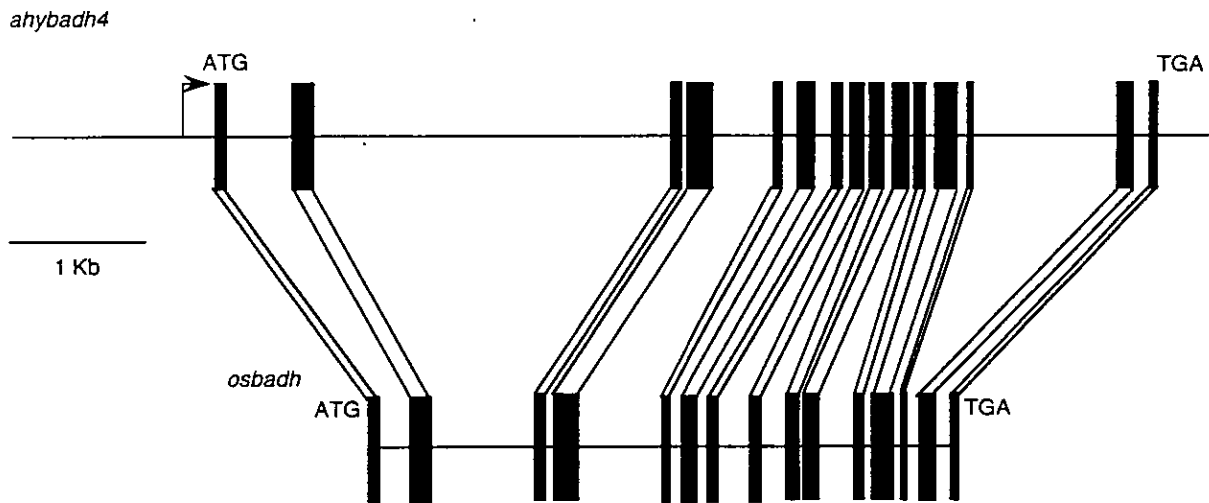
Figura 14. Alineamiento entre secuencias de aminoácidos de BADHs de plantas y microorganismos. ECOBETB, *E. coli*; BADH15, sorgo; BLYBAD, cebada; AHYBADH17 y AHYBADH4, amaranto; SPIBADH, espinaca; BVBADH, remolacha y OSBADH, arroz. Los aminoácidos idénticos para todas las secuencias se encuentran enmarcados. Los asteriscos indican el decapéptido conservado entre proteínas BADH.

	AHYBADH17	SPIBADH	BVBADH	ECOBETB	OSBADH	BADH15	BLYBAD
AHYBADH4	98	83	83	39	70	62	70
AHYBADH17		83	83	39	71	63	70
SPIBADH			90	37	71	63	70
BVBADH				37	69	61	69
ECOBETB					37	33	36
OSBADH						77	82
BADH15							71

**Tabla IV.** Comparación de secuencias deducidas de proteínas BADH de amaranto AHYBADH4 y AHYBADH17 con secuencias de espinaca SPIBADH, *E. coli* ECOBETB, betabel BVBADH, arroz OSBADH, sorgo BADH15 y cebada BLYBAD. La identidad de las secuencias se muestra como porcentaje luego de realizar un alineamiento de secuencias utilizando el programa de cómputo Gene Works versión 2.4 (Intelligenetics, Mountain View, CA, USA).



**Figura 15 .** Dendograma de relaciones entre proteínas BADH. La comparación se realizó en base a los alineamientos de secuencias de aminoácidos obtenidos utilizando el programa de cómputo Gene Works version 2.4 (Intelligenetics, Mountain View, CA, USA). Las secuencias de aminoácidos que se incluyeron en la comparación son la de cebada (BLYBAD), arroz (OSBADH), sorgo (BADH15), espinaca (SPIBADH), betabel (BVBADH), amaranto (AHYBADH4 y AHYBADH17) y *E. coli* (ECOBETB).



**Figura 16** . Comparación de la estructura de los genes que codifican para la enzima Betaína Aldehído Deshidrogenasa ( BADH ) de amaranto ( *ahybadh4* ) y arroz (*osbadh*).

AHYBADH4	215	TGLGPEAGGPLACHPDVDKVAFTGSTATGSKVMSSAAQLVKP	256
AHYBADH17	215	TGLGPEAGGPLACHPDVDKVAFTGSTATGSKVMSSAAQLVKP	256
SPIBADH	212	TGLGPDAGAPLVSHPDVDKIAFTGSSATGSKVMTSAAQLVKP	253
BVBADH	215	TGLGPDAGAPLVAHPDVDKVAFTGSSATGSKVMASAAQLVKP	256
OSBADH	217	TGLGTEAGAPLASHPHVDKIAFTGSTETGKRIMITASQMVKP	258
BADH15	208	TGLGLKLVLYHYPHPCGIRLLLLGSTETGKRIMTSAAQMVKP	249
BLYBAD	216	TGLGPDAGAPIASHPHVDKIAFTGSTATGKTIMTAAAQMVKP	257

AHYBADH4	257	<u>VTLELGGKSPIVIFEDV</u> -DLDKAAEWTAFGCFWTNGQICSATS	298
AHYBADH17	257	<u>VTLELGGKSPIVIFEDV</u> -DLDKAAEWTAFGCFWTNGQICSATS	298
SPIBADH	254	<u>VTLELGGKSPIVVFEDV</u> -DIDKVVWETIFGCFWTNGQICSATS	295
BVBADH	257	<u>VTLELGGKSPVIMFEDI</u> -DIETAVEWTLFGVFWTNGQICSATS	298
OSBADH	259	<u>VSLELGGKSPLIVFDDV</u> -DIDKAVEWAMFGCFANAGQVCSATS	300
BADH15	250	<u>VSLELGGKSPLIVFDDIR</u> DIDKAVEWTFMGILPNAGQVCSAAS	292
BLYBAD	258	<u>VSLELGGKSPLVTFDDV</u> -DIDKAVEWPMLGCFFNGGQVCSATS	300

**Figura 17.** Posible sitio activo de la enzima BADH de plantas. Los asteriscos indican residuos aminoácidos posiblemente involucrados en la unión al NADH. El decapeptido subrayado se considera el sitio activo de la enzima, encontrándose muy conservado entre BADHs de plantas (AHYBADH4 y AHYBADH17, amaranto; SPIBADH, espinaca; BVBADH, betabel; OSBADH, arroz; BADH15, sorgo; BLYBAD, cebada) y con ALDHs de otros organismos.

Género	Secuencia	Referencia
<i>Amaranthus</i>	MAIRVPSRQLFIDGEW	Legaria <i>et al</i> , éste trabajo
<i>Beta</i>	MSMPIPSRQLFIDGEW	Mc Cue y Hanson, 1992
<i>Spinacia</i>	MAFPÍPARQLFIDGEW	Weretilnyk y Hanson, 1990
<i>Sorghum</i>	MAAADVPRPSFIGGDW	Wood <i>et al</i> , 1996
<i>Hordeum</i>	MAAPPAIPRRGLFIGGGW	Ishitani <i>et al</i> , 1995
<i>Oriza</i>	MAAPSAIPRRGLFIGGGW	Nakamura <i>et al</i> , 1997

**Tabla V.** Comparación de posibles péptidos de tránsito para dirigir proteínas BADH a cloroplasto. Las secuencias deducidas de aminoácidos del extremo N-terminal son comparadas en base al sitio de procesamiento (RQ) y secuencia N-terminal de la proteína madura (subrayado) de la BADH de espinaca (Weretilnyk y Hanson, 1990).

monocotiledóneas pero está ausente en las proteínas BADH de plantas dicotiledóneas (Tabla VI). La información existente sugiere una clara diferencia en la localización intracelular de las enzimas BADH entre plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas (Figura 18).

### V.3. ESTRUCTURA DE LA REGION 5' DEL GEN AHYBADH4

Para determinar el sitio de inicio de la transcripción del gen *ahybadh4* se realizó un análisis por extensión de primer. En la Figura 19 se identificó una banda que correspondió a una adenina ubicada a 158 nucleótidos del codón de inicio de la traducción y a 38 nucleótidos hacia el extremo 3' de la caja TATA. En el líder de *ahybadh4* se localizó un ATG fuera de marco a -82 nucleótidos del ATG putativo.

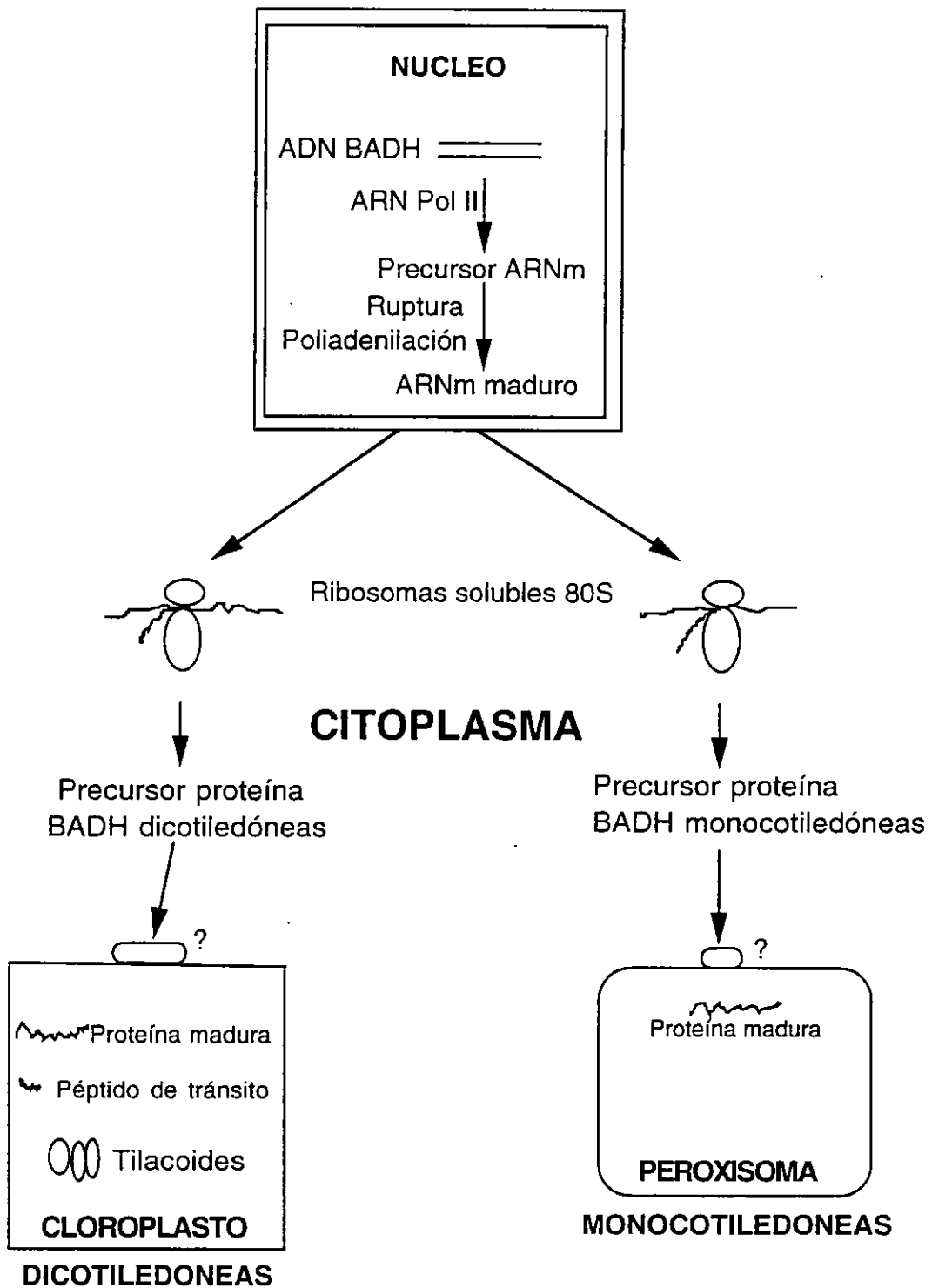
La secuencia 5' correspondiente a la región promotora fue de 1356 pb de longitud (Figura 13 y 20). Las cajas CAAT y GC se encontraron en la región proximal a -76 y -160 nucleótidos, respectivamente del inicio de la transcripción.

Además, se realizó una investigación para detectar secuencias consenso reconocidas por activadores de la transcripción (Figura 20). Es relevante la presencia de 11 secuencias semejantes a elementos de respuesta MybRE con el consenso 5'-(T/C)AACT-3' que es reconocido por proteínas Myb de plantas (Urao *et al.*, 1993) y tiene un papel en la activación de promotores en respuesta a la deshidratación y ABA (Abe *et al.*, 1997); 2 elementos de acoplamiento CE1 conteniendo la secuencia central CACC que ha sido caracterizada como de respuesta a ABA (Shen and Ho, 1995); y un elemento con la secuencia central ACGT característica de cajas-G y ABRE (elementos de respuesta a ABA)

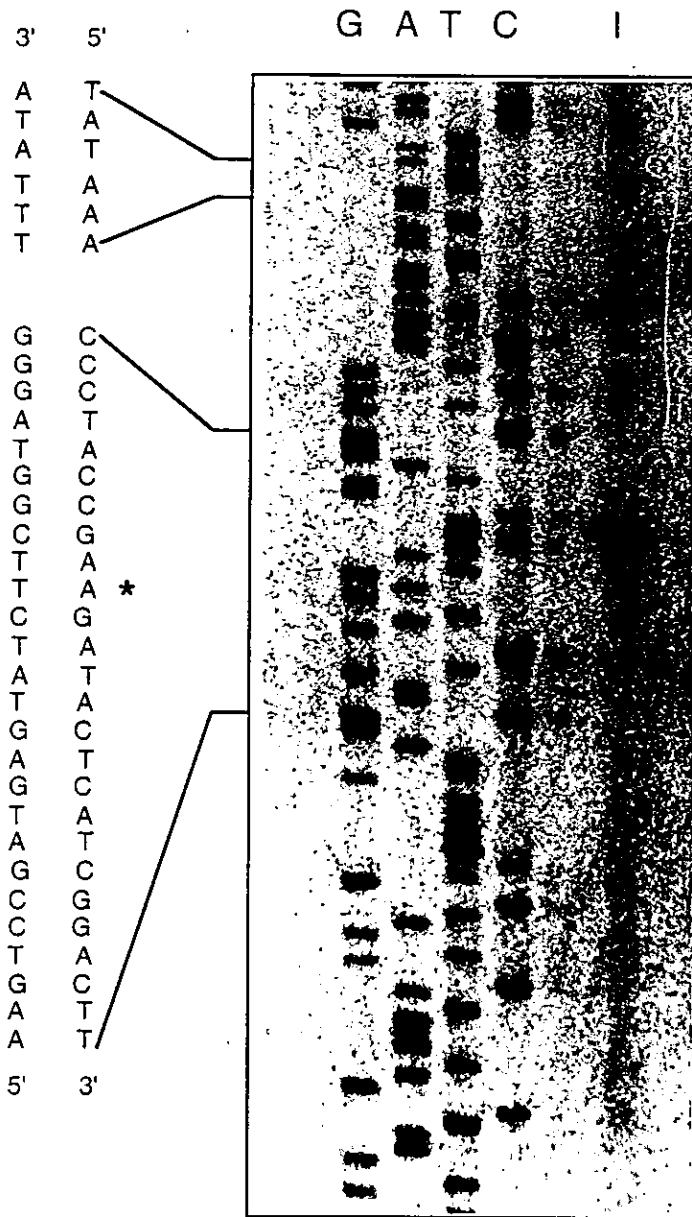
Género	Secuencia	Referencia
<i>Amaranthus</i>	GWYKSP	Legaria <i>et al.</i> , éste trabajo
<i>Beta</i>	GWYKSP	Mc Cue y Hanson, 1992
<i>Spinacia</i>	GWYKSP	Weretilnyk y Hanson, 1990
<i>Sorghum</i>	GWYQPPSKL	Wood <i>et al.</i> , 1996
<i>Hordeum</i>	GWYQRPSKL	Ishitani <i>et al.</i> , 1995
<i>Oriza</i>	GWYRPPSKL	Nakamura <i>et al.</i> , 1997

**Tabla VI.** Comparación de secuencias C-terminal de proteínas BADH de diferentes géneros. Se resalta el tripéptido SKL, una señal que dirige preproteínas a peroxisomas presente en plantas monocotiledóneas pero ausente en dicotiledóneas.





**Figura 18.** Ruta de síntesis y transporte de la proteína BADH en plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas.



**Figura 19** . Mapeo del sitio del inicio de la transcripción mediante extensión de primero. Las líneas G, A, T y C corresponden a los nucleótidos de la reacción de secuencia determinada por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos con el primero P1 (Sección IV.7), usando un gel de poliacrilamida 6%- urea 8M. La línea I es el ensayo de extensión de primero. La secuencia de nucleótidos alrededor del sitio de inicio de la transcripción (indicado por un asterisco) y la caja TATA se muestran a la izquierda.

TCTAGAAGTTGGAGCTGTTTGGGTTAATTGCTCACAGCCTTGCTTTACTCAAGCTCCATG	60
GGGAGGCACCAAGCGTAGTGGTTTTGGACGTGAACCTGGGGAATGGTGAGTCCATATTTT	120
CE1 ACGT	
TCCCCTCTACAATAACCATTATATCAGCCCCTTGATCACAACACTTAACTCTTCATCCT	180
TCTTGATGTTAACTGTGGAATAATCCTGCAGGGGTATCGAGAATTACTTGAATATAAAGC	240
AGGTGACTCGGATACTCTACTGATGAACCGTGGGATGGTACAAGTCTCCTTGAAGCTTTC	300
GATGAAATTCGCAGACGCCATCATCATGAAGTGGACAATGGTGTAGTTTACAGTTTGAAT	360
GTATTGTTAAATAAAGCATTGATGATGATGATGATCACTCCATAGAATGGAGAAAAGTTTGA	420
ATCAGGAATAATATGTTTACATATTTGAACAAATCTGTGTTTATTTTCATTCTAAGATT	480
GAGCAAGCAGGATACATTTGTAACCTTAAACTGGGTATTACTATTTACTATAGGCTAATA	540
MybRE	
GCTATTTATCTTATTATTATTATTATAATAGTATACTCATGGTAAAATCAACTTTTAA	600
MybRE	
TAAATTAAGCAGCCAACTTAAATTAATCAAAATAGCAACTTGAAGAGGAATAAAACAC	660
MybRE MybRE CE1	
CAATTTAAACAAGGTAAAATTTCAACTTGAACAGGTATAATACCAAGGTAAAACATTA	720
MybRE	
ACGGTCCGTTTGGTAGGTAGGTAATAAACGGTGGTAATGAGAATGAAAACTAGTGTAAT	780
TTTTGAAAAAAATTTTTTAGCTAACTTGTAGGTCATACTTATCCAACTCCAATCATCTC	840
MybRE MybRE	
ATTTTCTTCATAAAAATTCATTTTAATGCATTATCATTGAGAGAGGTGATATTAGGTGGTA	900
AAGAAAATTTGTAACAATAACAAGCGTAACTTAATTTGGTAACAACCTTAATAGGT	960
MybRE	
TAAAACCCACTCCAAATATGTTAAAATACCAACTTCAAATACCAATTCGACAAGTTAA	1020
MybRE	
ACTTTAATATGTTATATACCAACTTTTGATAGTTTTTCAAACATGTTAAAATACCAACTC	1080
MybRE MybRE	
CAAATAGATCAACATTTCAACTTTAATAGGTAAAATACCTACTCAAATAAGTTAAAATA	1140
CCATTTTTATAGATTAAAATATCAACCCAAATAGGTTAATACAGGGAATAAGCGCGTGT	1200
GC box	
TAGTTAATTTTATTTTGCTAATTACATATTAGTCTTTTTAAATAGGTGTGTCTCTTAATA	1260
AAGACGGTCTCTACAACAATTTACGTTAAATGATACTTGTGTGCGTGTGCAATATAAATT	1320
CAAT box TATA box	
+1	
TAATTTAATTTGTATTGTGACGCACGGCCCTACCGAAGATACTCATCGGACTTGCCTAAC	1380
AAAAGACGATCAGTATTTATCGATTACATTATTCACATCTTGTCTTAAAAATGAAATA	1440
TTAGTCATCTTGCTATAATATCAACGCTTTTACTTCTTATACTTCCAACTTCAACTGATT	1500
TTTTCTCACCAAAAATG	1517
M	

**Figura 20.** Cajas consenso de la región promotora del gen *ahybadh4*. Se muestra el codón de inicio de la traducción (ATG), el sitio de inicio de la transcripción (+1), las cajas TATA, CAAT y GC y los elementos CE1, ACGT y MybRE.

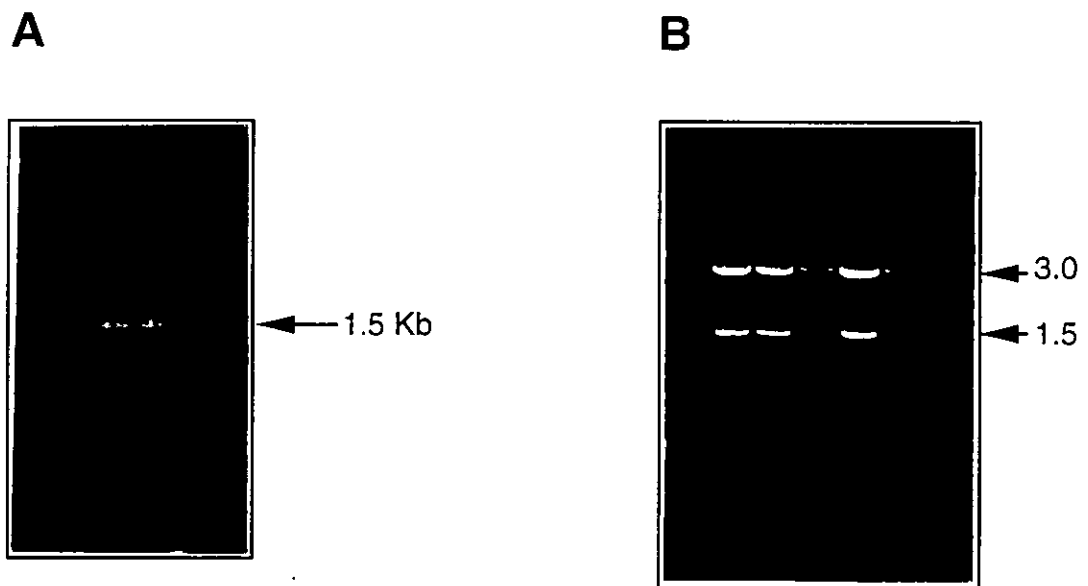
reconocidas por factores de transcripción bZIP, también involucrados en la inducción de genes por ABA y estrés osmótico (Nakagawa *et al.*, 1996) (Figura 20).

#### **V.4. OBTENCION DEL ADNc AHYBADH17 POR RT-PCR**

El ADNc *ahybadh17* se sintetizó por RT-PCR (Figura 21A) utilizando oligonucleótidos específicos para los extremos amino- y carboxi-terminal a partir de la secuencia genómica, con sitios de restricción BamHI en los extremos para clonar en pBKS(+) (Figura 21B) en fase con la  $\beta$ -galactosidasa. Se secuenciaron 5 clonas obtenidas de 3 reacciones de PCR independientes y todas fueron idénticas. El producto codificado de una de las clonas, denominada *ahybadh17*, resultó 98% idéntico a AHYBADH4 al nivel de aminoácidos. La isoforma AHYBADH17 consiste de 500 aa ( 1 aa más corta que AHYBADH4) y contiene 10 sustituciones con respecto a AHYBADH4 (Figuras 22, 23 y 24).

#### **V.5. OBTENCION DE LA CLONA GENOMICA PARCIAL AHYBADH28**

Durante los experimentos de RT-PCR y secuenciación de las clonas, realizados para obtener el ADNc de la BADH de amaranto se detectó como un producto la clona genómica parcial (*ahybadh28* ) portando la secuencia correspondiente a un fragmento del extremo 3' del gen (Figura 25). El análisis resultante de una comparación de las secuencias de *ahybadh4* y *ahybadh28* reveló diferencias en el penúltimo intrón (Figura 26), aún cuando la secuencia codificadora del penúltimo exón resultó ser igual para los dos genes. Los resultados (Figuras 26 y 27) sugieren que *ahybadh4* y



**Figura 21** . Síntesis y subclonación del ADNc *ahybadh17* por RT- PCR. **A.**Utilizando ARN total purificado de hojas de plantas de amaranto tratadas durante 12 horas con PEG 17.5% se realizaron las reacciones de RT-PCR como se indica en la sección de Materiales y Métodos, obteniéndose un producto de 1.5 Kb correspondiente a una isoforma de la BADH de *Amaranthus hypochondriacus*. **B.** Subclonación del producto en pBluescript KS + y digerido con la enzima de restricción BamHI.

M A I R V P S R Q L F I D G E W R E P I K 21  
ATGGCGATCCGTGTACCTTCGCGCCAGCTATTCAATTGATGGAGAATGGAGGGAACCCATCAAGA 64  
K N R I P I I N P S T E E I I G V I P A A T 43  
AAAATCGCATCCCTATCATCAATCCTTCTACTGAGGAGATCATTGGTGTATTCCGGCTGCTAC 128  
A E D V E L A V A A A R R A L K R N K G E 64  
TGCTGAAGATGTGGAGCTTGCAGTCGCTGCAGCTAGAAGAGCGCTTAAGAGGAACAAAGGAGAA 192  
D W A S A S G A H R A K Y L R A I A A K I 85  
GATTGGGCGTCTGCATCTGGAGCTCATCGTGCTAAGTACCTTCGGGCCATTGCTGCTAAAATAA 256  
T E K K D Y F A K L E A M D C G K P L D E A 107  
CAGAGAAAAAAGATTATTTTGCAAACCTTGAAGCCATGGATTGTGGAAACCACTGGATGAAGC 320  
A W D I D D V A G C F E Y Y A D Q A E A L 128  
AGCATGGGACATTGATGATGTTGCTGGATGTTTTGAATATTATGCCGATCAAGCAGAAGCCCTT 384  
D A K Q K A P I A L P M D T F K C H V L K 149  
GATGCTAAACAAAAGGCTCCAATTGCCCTTCTATGGACACTTTCAAATGCCATGTGCTTAAAC 448  
Q P I G V V G L I S P W N Y P L L M A T W K 171  
AACCCATTGGTGTGTGGGTTGATTTCTCCTTGAATTATCCGCTTCTAATGGCAACATGGAA 512  
V A P A L A A G C S A V L K P S E L A S V 192  
AGTTGCTCCAGCTCTTGCTGCTGGTTGCTCAGCTGTACTTAAGCCGTCTGAACTGGCATCCGTA 576  
T C L E L A E V C R E V G L P P G V . L N I 213  
ACTTGCCTAGAATTGGCTGAAGTGTGCAGAGAAGTGGGACTGCCTCCTGGCGTATTAAATATTT 640  
L T G L G P E A G G P L A C H P D V D K V A 235  
TAACAGGATTAGGTCCTGAAGCTGGTGGGCGTTAGCTTGCCATCCTGATGTTGACAAGGTTGC 704  
F T G S T A T G S K V M S S A A Q L V K P 256  
ATTTACTGGGAGTACAGCTACTGGTAGCAAGGTTATGTCATCCGCTGCTCAATTGGTCAAGCCT 768  
V T L E L G G K S P I V I F E D V D L D K 277  
GTTACATTAGAACTTGGAGGGAAAAGTCCATTGTTATCTTTGAAGATGTTGACTTGGATAAAG 832  
A A E W T A F G C F W T N G Q I C S A T S R 299  
CTGCTGAATGGACTGCTTTTGGCTGTTTTTGGACAAATGGTCAAATTTGCAGTGCAACATCGAG 896  
L L V H E S I A A E F L D R L V K W C K N 320  
ATTACTTGTGCATGAAAGCATCGCAGCTGAATTTTTGGATAGGCTTGTAATGGTGCAAAAAC 960  
I K I S D P F E E G C R L G P V V S K S Q 341  
ATAAAGATCTCTGACCCGTTTGGAGGAAGGCTGTGACTTGGTCCTGTTGTGAGTAAGAGTCAGT 1024

Y E K V L K F I S T A K S E G A T I L C G G	363
ATGAAAAAGTTTTGAAGTTCATTTCAACAGCAAAGAGTGAGGGTGCAACTATTTTGTGTGGAGG	1088
S R P E H L K K G Y Y V E P T I I S D V S	384
TTCCCGTCCCGAGCATTGGAAGAAAGGTATTATGTTGAACCAACAATTATAAGTGATGTCTCC	1152
T S M Q I W R E E V F G P V L C V K T F G	405
ACTTCCATGCAAATATGGAGGGAAGAAGTTTTCGGCCAGTCTTATGTGTCAAAACCTTTGGTT	1216
S E D E A I E L A N D T Q Y G L G A A V L S	427
CTGAAGATGAAGCCATTGAACTGGCTAATGATACTCAGTATGGTTTAGGGGCTGCTGTGTTATC	1280
K D L D R C E R I T K A L Q A G I V W V N	448
GAAAGATCTTGATCGGTGTGAGAGAATAACAAAGGCATTGCAAGCTGGAATTGTGTGGGTTAAC	1344
C S Q P C F C Q A P W G G T K R S G F G R	469
TGCTCACAACCATGCTTTTGCCAAGCTCCATGGGGAGGCACGAAGCGTAGCGGTTTTGGACGTG	1408
E L G E W G I E N Y L N I K Q V T E Y I S D	491
AACTCGGGGAATGGGGTATCGAGAATTACTTGAATATCAAACAAGTGACTGAATATATTTCCGA	1472
E P W G W Y K S P *	500
TGAACCATGGGGATGGTACAAGTCTCCTTGA	1503

**Figura 22.** Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del ADNc de la Betaína aldehído deshidrogenasa de *Amaranthus hypochondriacus* L. (*ahybadh17*) obtenido por RT-PCR. El asterisco indica el codón de término de la traducción.

AHYBADH4	MAIRVPSRQLFIDGEWREPIKKNRIPIINPSTEEIIGDIP	40
AHYBADH17	-----V--	40
AHYBADH4	AATAEDVELAVAAARRALKRNKGEDWASASGAHRAKYLRA	80
AHYBADH17	-----	80
AHYBADH4	IAAKITEKKDYFAKLEAMDCGKPLDEAARDIDDVAGCFEY	120
AHYBADH17	-----W--	120
AHYBADH4	YADQAEALDAKQKAPIALPMDTFKCHVLKQPIGVVGLISP	160
AHYBADH17	-----	160
AHYBADH4	WNYPLLMATWKVAPALAAGCSAVLKPSELASVTCLELAEV	200
AHYBADH17	-----	200
AHYBADH4	CREVGLPPGVLNILTGLGPEAGGPLACHPDVDKVAFTGST	240
AHYBADH17	-----	240
AHYBADH4	ATGSKVMSSAAQLVKPVTLELGGKSPIVIFEDVDLDKAAE	280
AHYBADH17	-----	280
AHYBADH4	WTAFGCFWTNGQICSATSRLLVHESIAAEFLDRLVKWCKN	320
AHYBADH17	-----	320
AHYBADH4	IKISDPFEEGCRLGPVVSQSQYEVKLFISTAKSEGATIL	360
AHYBADH17	-----	360
AHYBADH4	CGGSRPEHLKKGYYVEPTIISDVSTSMQIWREEVFGPVLC	400
AHYBADH17	-----	400
AHYBADH4	QKTFGSEDEAIELANDTQYGLGAAVLSKDLDR CERITKAL	440
AHYBADH17	V-----	440
AHYBADH4	EVGAVVWNC SQPCFTQAPWGGTKRSGFGRELGEWGIENYL	480
AHYBADH17	QA-I-----C-----	480
AHYBADH4	NIKQVTRDTSTDEPWGWYKSP	501
AHYBADH17	-----EYI-----	500

**Figura 23.** Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de la clona genómica *ahybadh4* y el ADNc *ahybadh17* de *Amaranthus hypochondriacus* L.





**Figura 24 .** Comparación de sitios de restricción entre el gen *ahybadh4* y el ADNc *ahybadh17*. Los sitios de restricción son: P, PstI; Sc, SacI; S, Sall; X, XbaI y H, HindIII.

AGAACGCATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGAACACTATAGAATACTCAAGCTTGAC	63
A L E V G A V W V N C S Q P C F T	
GTCCGTACGTCAGGCTCTAGAAGTTGGAGCTGTTTGGGTAAATTGCTCACAGCCTTGCTTTACT	126
Q A P W G G T K R S G F G R E L G E W	
CAAGCTCCATGGGGAGGCACCAAGCGTAGTGGTTTTGGACGTGAACTTGGGGAATGGGTAGTCC	189
ATATTTCCGTCTACAATAACATTATATACGCCCTTGCATCACAACACTTAACTCTTCATCCTTC	252
G I E N	
TTGATGTAACTGTGGAATAATCCTGCAGGGTATCGAGAAT	293

**Figura 25.** Secuencia parcial de nucleótidos y aminoácidos del extremo 3' del fragmento de la clona genómica *ahybadh28* obtenida por PCR.

<i>ahybadh4</i>	TTCGAACTTGTATCCGCATTCAAAGTCATATCGATTTTTCTTTGCA	46
<i>ahybadh28</i>	AGAACGCATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGAACACTAT	46
<i>ahybadh4</i>	AATTTTATCCATTCCGTCTTTCTTTGATCAG	77
<i>ahybadh28</i>	AGAATACTCAAGCTTGACGTCCGTACGTCAG	77

**Figura 26.** Comparación de secuencias de nucleótidos correspondientes a un fragmento del penúltimo intrón de las clonas genómicas *ahybadh4* y *ahybadh28*.

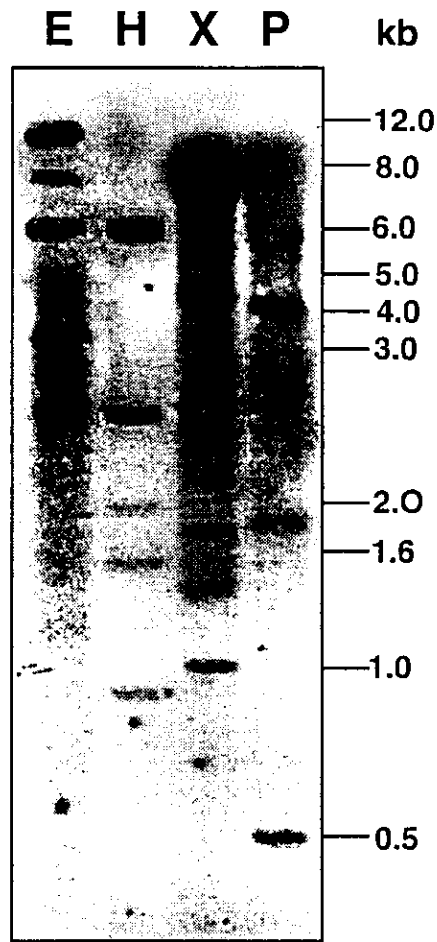
*ahybadh28* son genes diferentes y que en amaranto la BADH puede estar codificada por una familia de genes.

## **V.6. DETERMINACION DEL NUMERO DE COPIAS DEL GEN AHYBADH EN EL GENOMA DE AMARANTO**

Para determinar el número de copias del gen BADH en el genoma de amaranto, se realizó un gel tipo Southern con ADN genómico, usando como sonda el ADNc del gen *ahybadh17*, obtenido por RT-PCR, como se muestra en la Figura 27. Dado que no existen sitios internos EcoRI en el gen *ahybadh4*, las seis bandas que se observan pueden representar un número igual de copias del gen, aunque no se puede excluir que algunos otros genes homólogos presenten sitios internos EcoRI. Luego de la digestión con HindIII se observaron 5 bandas pero sólo 3 corresponden con los sitios de restricción que presenta *ahybadh4*. La digestión con XbaI resultó en 6 bandas y solo 4 corresponden con *ahybadh4*. Finalmente, la digestión con PstI hibridó con 3 bandas correspondientes a *ahybadh4*. Estos resultados sugieren que existe una familia de al menos 3 genes que codifican para la BADH en el genoma de *Amaranthus hypochondriacus* L.

## **V.7. EXPRESION DEL GEN AHYBADH17 EN RESPUESTA A ESTRES OSMOTICO Y ACIDO ABSCISICO**

Reportes previos muestran que el soluto compatible GB se acumula en hojas de amaranto luego de someterse a estrés por deshidratación (Gamboa *et al.*, 1991). Concomitantemente, se ha observado un incremento en los niveles de actividad de la enzima BADH (Valenzuela-



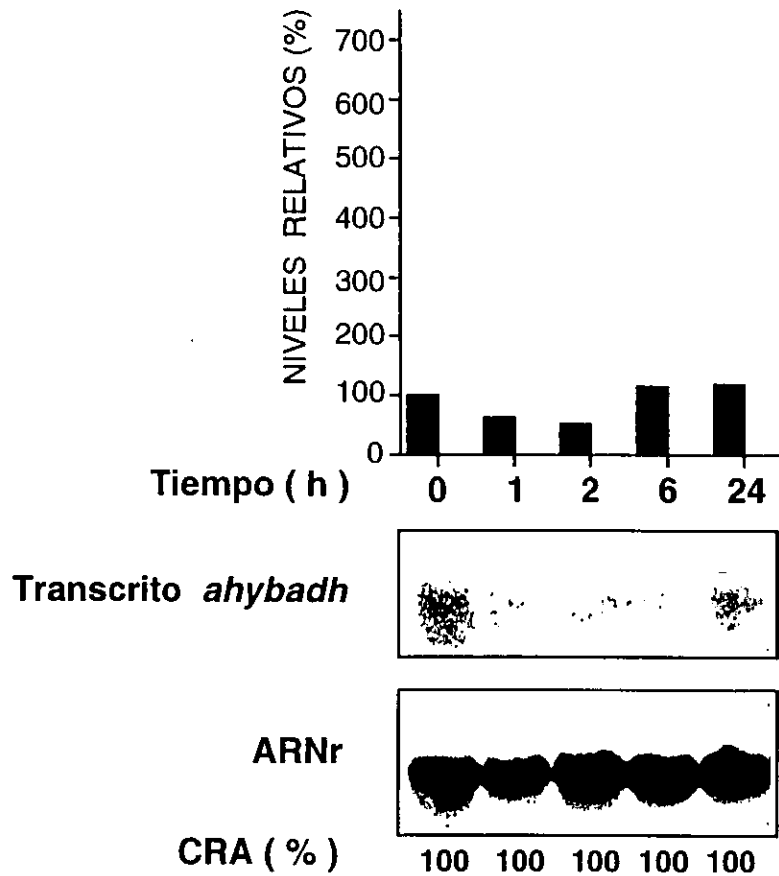
**Figura 27** . Southern blot genómico de ADN de *A. hypochondriacus* L. Se digirieron 20 microgramos de ADN genómico con las enzimas de restricción E, EcoRI; H, HindIII; X, XbaI y P, PstI. Los números a la derecha son marcadores de peso molecular en kilobases.

Soto y Muñoz-Clares, 1994). Para investigar si los genes *ahybadh* son inducibles por estrés osmótico y ABA se disectaron hojas de plantas de amaranto y se sometieron al estrés osmótico durante 1, 2, 6 y 24 horas. Se extrajo ARN total de hojas tratadas con PEG 17.5% (p/v), NaCl 0.5 M y ABA 100  $\mu$ M para realizar un Northern, hibridando con el ADNc de *ahybadh17*. Se observó que la sonda hibridó con una sola banda de alrededor de 1.9 kb de longitud, correspondiendo a la longitud esperada para un ADNc completo (Figuras 28 y 29). Los filtros se rehibridizaron con un ADNc correspondiente al ARN ribosomal 28S de *Phaseolus vulgaris* L. para confirmar que todas las muestras cargadas en el gel tenían igual cantidad de ARN total.

Como se observa en las Figuras 28 y 29, el ARNm *ahybadh17* está presente en hojas de amaranto tratadas y no tratadas. Se hizo un análisis densitométrico de los autorradiogramas de los Northern (Figuras 28 y 29) donde se observó que los niveles del transcrito *ahybadh17* se incrementan luego de 1 hora de exposición a los tratamientos con PEG 17.5% (p/v), NaCl 0.5 M y ABA 100  $\mu$ M; permaneciendo el ARNm de las hojas tratadas por arriba de las hojas control; a través de las 24 h de duración de los tratamientos.

Además, dado que los genes *ahybadh4* y *ahybadh17* son muy similares en su secuencia de nucleótidos, no fue posible distinguirlos entre sí en los experimentos tipo Northern. Por tanto, la inducción del transcrito *ahybadh* puede atribuirse a *ahybadh17*, pero no se excluye la posibilidad de que *ahybadh4* o algún otro miembro de la familia *ahybadh* sea también regulado por ABA y estrés osmótico.

## CONTROL



## NaCl

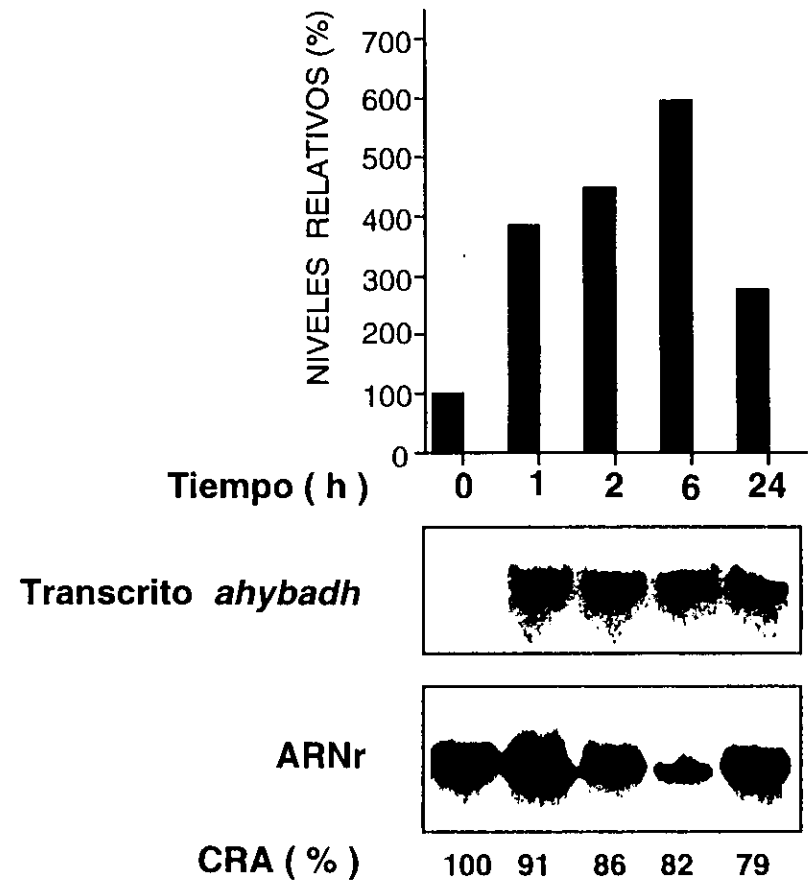
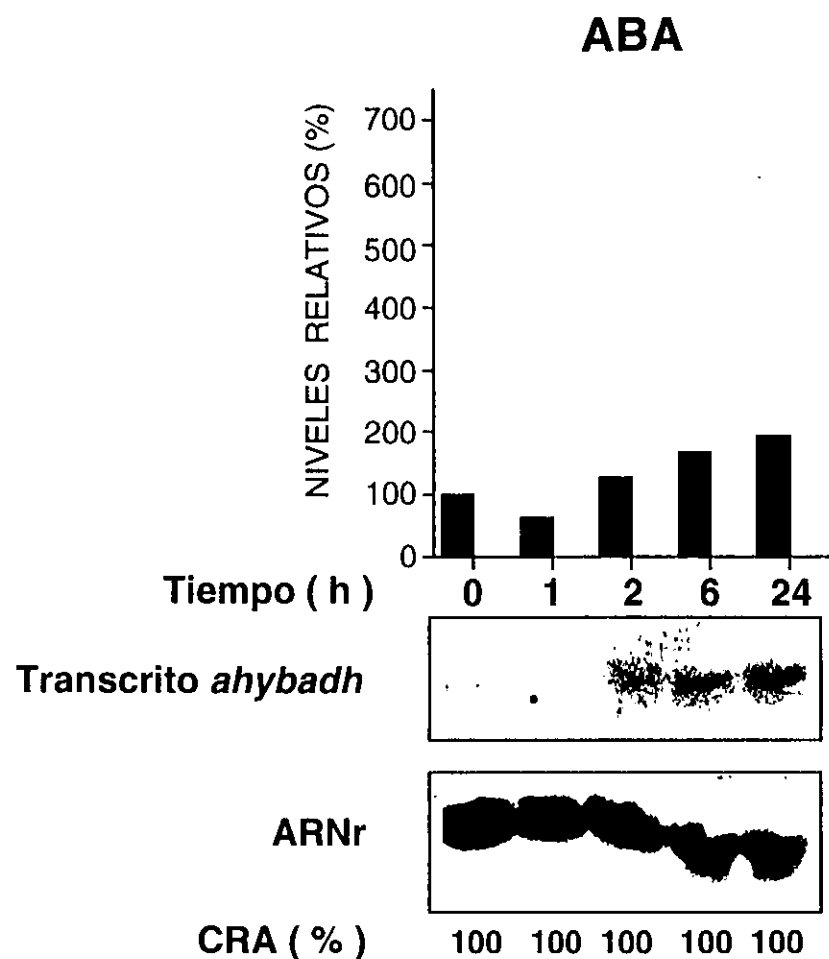
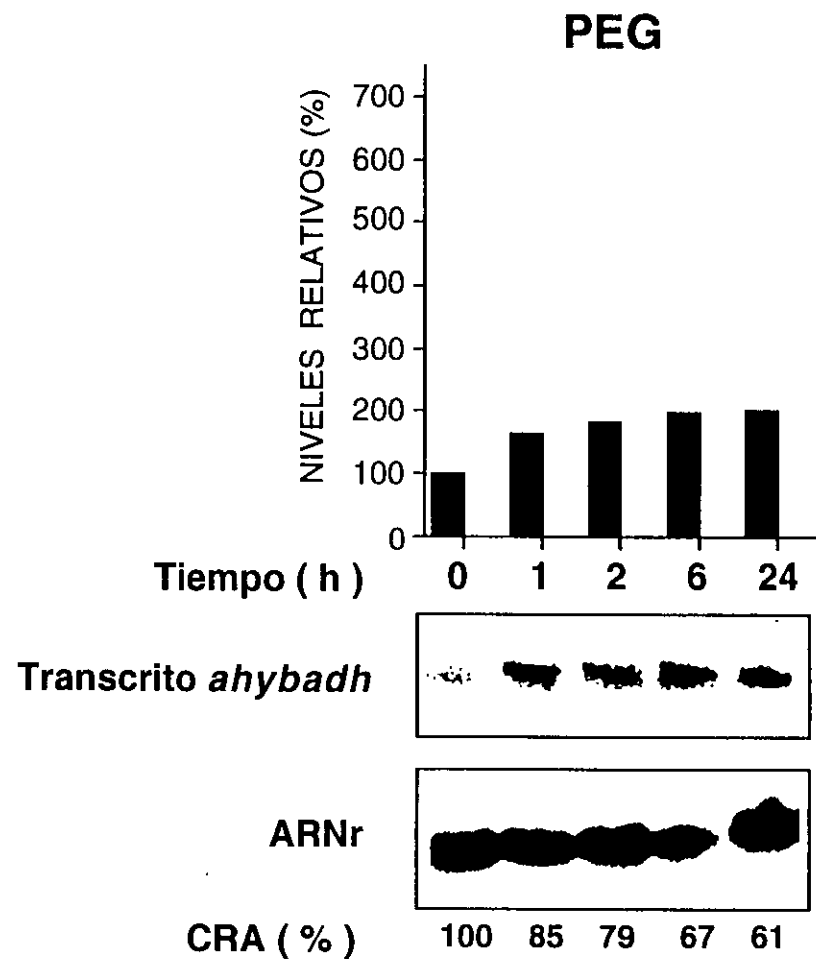


Figura 28 . Patrón de inducción de *ahybadh17* por estrés salino. Se purificó ARN total de hojas de plantas de amaranto tratadas con NaCl 500 mM y plantas control en los tiempos indicados. Se fraccionaron 40 microgramos de ARN en un gel de agarosa-formaldehído y se transfirieron a una membrana de nylon. Se hibridó con el ADNc *ahybadh17* o con un fragmento de ARN ribosomal 28S de *Phaseolus vulgaris* . Debajo de cada figura se presentan los valores de contenido relativo de agua (CRA) y en la parte superior se muestran los niveles relativos alcanzados por el transcrito en diferentes tiempos.



**Figura 29** . Patrón de inducción de *ahybadh17* por estrés osmótico y ABA. Se purificó ARN total de hojas de plantas de amaranto tratadas con PEG al 17.5% o ABA 100 micromolar en los tiempos indicados. Se fraccionaron 40 microgramos de ARN en un gel de agarosa-formaldehído y se transfirieron a una membrana de nylon. Se hibridó con el ADNc *ahybadh17* o con un fragmento de ARN ribosomal 28S de *Phaseolus vulgaris* . Debajo de cada figura se presentan los valores de contenido relativo de agua (CRA) y en la parte superior se muestran los niveles relativos alcanzados por el transcrito en diferentes tiempos.

## VI. DISCUSION

En este trabajo se clonó el gen *ahybadh4*, una clona genómica parcial (*ahybadh28*) diferente a *ahybadh4* y un ADN complementario (*ahybadh17*) codificando para la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) de *Amaranthus hypochondriacus* L., una planta perteneciente a la familia Amaranthaceae (Figuras 12, 13, 22, 23, 24, 25 y 26). El gen *ahybadh4* constituye junto con el gen *osbadh* la segunda secuencia completa reportada a la fecha de un gen que codifica para una enzima que participa en la vía de síntesis de un osmolito en plantas. La identificación de la enzima codificada se realizó mediante su comparación con la secuencia deducida de proteínas de espinaca, remolacha, cebada, sorgo, arroz y *E. coli*, mostrando 83, 83, 70, 62, 70 y 39% de identidad, respectivamente (Figura 14, Tabla IV ). La similitud de las secuencias entre las BADHs descritas indica una alta conservación del gen o una divergencia relativa entre plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas, y probablemente un origen evolutivo común de las enzimas de plantas y bacterias (Figura 15).

Por otro lado, Nakamura *et al.* (1997) reportaron la clonación y secuencia del gen que codifica para la BADH en arroz. El gen contiene 14 intrones y la secuencia de nucleótidos de la región codificadora mostró ser altamente similar a la BADH de otras plantas. Al comparar la secuencia codificadora de *ahybadh4* con la secuencia del gen reportado de arroz (*osbadh* ) se detectó que la estructura de los dos genes es similar. Ambos genes presentan 15 exones de igual tamaño con los sitios de ruptura correspondiendo exáctamente en las mismas posiciones, si bien los 14 intrones de *osbadh* son más cortos (Figura 16). Ello sugiere que los



genes BADH de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas descienden de un gen ancestral común pero que divergieron en algún punto del proceso evolutivo.

Los resultados sugieren que los genes que codifican para la BADH en el genoma de *Amaranthus hypochondriacus* L. (Figura 27) están presentes como una familia multigénica.

El análisis por extensión del primero permitió determinar el sitio de inicio de la transcripción del gen *ahybadh4*. En una inspección del dominio entre posibles cajas TATA y el sitio de inicio de la traducción de 79 genes de plantas, Joshi (1987) encontró que: a) una adenina estuvo presente como el sitio de inicio de la transcripción en la mayoría de los casos; b) la longitud de la secuencia del líder varía entre 9 y 193 nucleótidos y c) la posible caja TATA estuvo presente entre los -32 +/- 7 nucleótidos hacia el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción. Nuestros resultados experimentales están de acuerdo con lo arriba mencionado.

La biosíntesis de glicina betaína ocurre en los cloroplastos de la familia Chenopodeaceae (Hanson *et al.*, 1985). La BADH es codificada por un gen nuclear (Weretilnyk y Hanson, 1988) y la enzima se localiza en el cloroplasto (Weigel *et al.*, 1986). Así mismo, Rathinasabapathi *et al.* (1994) demostraron que plantas transgénicas de tabaco expresando los ADNc de espinaca o remolacha producen una BADH cloroplastica. Las secuencias deducidas de las BADHs de espinaca y remolacha contienen una región de aminoácidos QLFIDGE en los residuos 9 a 15. La secuenciación directa de la proteína madura extraída de espinaca mostró que este péptido corresponde a su extremo amino-terminal (Weretilnyk y Hanson, 1990). Esto indica que la BADH cloroplastica tiene un péptido de tránsito atípico de 8 aminoácidos, ya que los péptidos de

tránsito para dirigir las proteínas al cloroplasto son de 30 a 50 aminoácidos (Keegstra *et al.*, 1989; Berry-Lowe y Schmidt, 1991).

La secuencia de aminoácidos deducida del gen *ahybadh4* y del ADNc *ahybadh17* mostró la presencia de la secuencia conservada QLFIDGE, sugiriendo una localización celular semejante a la de la BADH de espinaca (Tabla V), aunque ello requiere ser demostrado. Recientemente, se ha reportado que la proteína OSBADH de arroz se localiza en los peroxisomas de la célula, dirigida probablemente por la secuencia carboxi-terminal SKL altamente conservada (Nakamura *et al.*, 1997). Este tripéptido está presente en todas las proteínas BADH reportadas de monocotiledóneas pero está ausente en las proteínas AHYBADH4 y AHYBADH17 de amaranto y otras BADHs de dicotiledóneas (Tabla VI). Por tanto, ello incrementa la posibilidad de que las proteínas de amaranto se localicen en el cloroplasto. Dado que en los peroxisomas o en las mitocondrias se han detectado niveles más altos de NAD<sup>+</sup> (el cofactor requerido por la BADH para su actividad enzimática) que en los cloroplastos, es posible que durante el proceso de evolución las proteínas BADH de monocotiledóneas puedan haber cambiado el lugar de su actividad, de cloroplastos a peroxisomas para desarrollar una catálisis mas eficiente (Arakawa *et al.*, 1990).

El decapeptido VTLELGGKSP presente en AHYBADH4 y AHYBADH17 está altamente conservado entre aldehído deshidrogenasas y BADHs de plantas (Figura 17). El residuo glutámico del decapeptido y la cisteína localizada a 34 residuos, han sido implicados en catálisis en aldehído deshidrogenasas de mamíferos. Se ha propuesto que las secuencias alrededor del residuo cisteína confieren especificidad de sustrato (Pietruszko, 1989). En enzimas aldehído deshidrogenasas se ha propuesto

la existencia del residuo cisteína en el sitio activo considerándose esencial para su actividad ya que el grupo SH es el responsable de la oxidación del aldehído (Tu-G-C y Weiner, 1988; Kitson, 1985., Kitson *et al.*, 1991) formando un tiohemiacetal intermediario (Jakoby, 1963). Al respecto, Valenzuela-Soto, 1994 consideró de interés determinar si éste aminoácido está involucrado en la actividad catalítica de la BADH de amaranto. Encontró que el DTNB, un reactivo específico para grupos sulfhidrilos, fue capaz de inactivar a la enzima. Esta inactivación fue caracterizada y se encontró que la BADH de hojas de amaranto tiene residuos cisteína esenciales para su actividad.

Recientemente, Vojtechová *et al.* (1997) y Trossat *et al.* (1997) demostraron que la BADH de amaranto y de remolacha muestran alta afinidad por el sustrato betaína aldehído así como por aldehídos con carga positiva, mostrando actividad de aldehído deshidrogenasas. Dado que en amaranto se han detectado 3 secuencias relacionadas a la BADH, codificando al menos dos de ellas para un polipéptido de peso molecular semejante, es posible que alguna de las isoenzimas muestre especificidad por el sustrato betaína aldehído y que alguna de las isoenzimas restantes tenga además afinidad por los aldehídos. La estructura primaria de la BADH permitirá identificar residuos blanco para modificación por mutagénesis sitio-dirigida en prueba de esta idea.

La expresión del ARNm de *ahybadh17* se presenta tanto en hojas tratadas como en no tratadas. Los niveles del transcrito *ahybadh17* en hojas tratadas permanecieron por arriba de los niveles alcanzados por las hojas control a través del período de 24 horas de exposición a los tratamientos, alcanzando un incremento significativo después de 1 hora

de iniciado el tratamiento osmótico. Para tener una estimación más exacta de los cambios ocurridos en los niveles de los transcritos *ahybadh17*, se realizó un análisis densitométrico de los Northern en colaboración con el grupo de la Dra. Rosario Muñoz-Clares (Facultad de Química, UNAM). En este grupo se investigaron los cambios en los niveles de la proteína BADH en respuesta a los mismos tratamientos. La relación entre el nivel de expresión del gen *ahybadh17* y el nivel de la proteína BADH, durante 24 horas de exposición a los diferentes tratamientos se presenta en las Figuras 28 y 29 y en Legaria *et al.*, en prensa. La respuesta máxima se observó en las hojas tratadas con NaCl, donde luego de 6 horas de tratamiento el contenido de la proteína se incrementó en 6 veces respecto al control. En las hojas tratadas con PEG y ABA los niveles de la proteína mostraron un incremento de 4 veces en comparación a los niveles que se tenían al inicio del experimento y declinaron más tarde, si bien permanecieron arriba del valor inicial a través del período de 24 horas de exposición. Los resultados son consistentes con el patrón de expresión del ARNm y la proteína BADH en otras especies de plantas donde los niveles basales en tejidos no tratados se incrementan después del tratamiento osmótico (Weretilnyk y Hanson, 1989;1990; McCue y Hanson, 1992; Ishitani *et al.*, 1995; Wood *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1997). Los altos niveles de expresión alcanzados bajo estrés por NaCl en relación al tratamiento con PEG, pueden atribuirse a una combinación de los efectos osmótico y tóxico de los iones. Se ha sugerido que la señal para la inducción del gen BADH es mediada por otros compuestos diferentes al estrés osmótico, tales como el ácido abscísico (McCue y Hanson, 1990). Se ha observado en plantas de cebada y en muchas otras especies vegetales que el estrés osmótico provocado por salinidad,

sequía y estrés hídrico llevan a un incremento en los niveles del ácido abscísico endógeno y consecuentemente a cambios en la expresión de los genes (Skriver y Mundy, 1990). Los resultados de este trabajo indican que durante el estrés osmótico con PEG o salinidad se alcanzaron mayores niveles de los transcritos en relación a los alcanzados por la aplicación del ABA exógeno (Figuras 28 y 29). Esto sugiere que el gen *ahybadh17* no pertenece a la misma categoría de otros genes de respuesta a ABA como los de la familia *rab* (Skriver y Mundy, 1990) en que los transcritos se incrementan fuertemente luego de algunas horas de la aplicación del ABA exógeno.

El incremento inicial en los niveles del transcrito *ahybadh17* puede ser suficiente para los incrementos en la proteína BADH observados más tarde durante el experimento (Figuras 28 y 29; Legaria *et al.*, en prensa). Alternativamente, dado que tanto en plantas de amaranto, remolacha (McCue y Hanson, 1992) y sorgo (Wood *et al.*, 1996) existen familias de genes BADH, otro miembro de la familia puede ser expresado mas fuerte bajo nuestras condiciones experimentales. Dado que ambos genes *ahybadh4* y *ahybadh17* son muy similares en su secuencia de nucleótidos no fue posible distinguirlos en geles tipo Northern. Por lo tanto, la inducción del transcrito *ahybadh* (Figuras 28 y 29) puede atribuirse, al menos en parte, a *ahybadh17*, aunque no se excluye que *ahybadh4* ú otro gen *ahybadh* pueda ser también regulado por estrés. Para evaluar la expresión específica de *ahybadh4* y *ahybadh17* será necesario hacer un análisis de la expresión por RT-PCR sintetizando oligonucleótidos específicos para cada secuencia.

Como se indicó anteriormente, en la región promotora del gen *ahybadh4* se detectaron posibles secuencias consenso reconocidas por

activadores de la transcripción tales como 11 elementos MybRE, 2 elementos CE1 y un centro ACGT que regulan genes en respuesta a estrés osmótico y ácido abscísico (Figura 20). Es posible que los genes *ahybadh* respondan a ABA por presentar estas secuencias en su región promotora, pero que no requieran de la presencia de la hormona necesariamente para expresarse bajo condiciones de estrés osmótico o que el sistema experimental de hojas disectadas o la concentración de ABA utilizada no nos permitan inducir cambios más fuertes en la expresión de los ARNm de la BADH de amaranto (Figuras 28 y 29).

Para cuantificar el grado de déficit de agua impuesto a las hojas por los diferentes tratamientos, se determinó su contenido relativo de agua (CRA, RWC). Como era de esperarse, los valores de CRA en las hojas de los experimentos control y ABA permanecieron relativamente constantes, mientras que aquellos de las hojas tratadas con PEG y NaCl declinaron a alrededor de 67 y 82% a las 6 horas, respectivamente (Figuras 28 y 29). Es interesante mencionar que decrementos relativamente pequeños en el contenido de agua de las hojas son capaces de disparar la acumulación de la proteína BADH durante un tiempo de exposición muy corto al tratamiento con PEG 6000 (Rajsbaum y Muñoz-Clares, resultados en Legaria *et al.*, en prensa).

Finalmente, los resultados de esta tesis muestran que en hojas individuales de amaranto la expresión del gen *ahybadh17* responde al estrés osmótico o al ABA exógeno. Observaciones previas de incrementos en los niveles de los ARNm o de la proteína BADH en hojas de espinaca (Weretilnyk y Hanson, 1989; Weretilnyk *et al.*, 1990), remolacha (McCue y Hanson, 1992), cebada (Arakawa *et al.*, 1992; Ishitani *et al.*, 1995), sorgo (Wood *et al.*, 1996) y arroz (Nakamura *et al.*, 1997) indican que los niveles

se incrementan después de una exposición larga a las condiciones de estrés. El tiempo más corto en que se ha observado la respuesta es de 12 horas en plantas completas de cebada (Ishitani *et al.*, 1995). Los resultados que se presentan en esta tesis son consistentes con la observación reportada de una acumulación rápida de glicina betaína luego de 2 horas de estrés hídrico en hojas disectadas de plantas de amaranto (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994). Ya que el gen *ahybadh17* se expresa más rápidamente en comparación con los genes aislados en otras especies, podría permitir a las plantas que lo portan, contender más eficazmente los efectos del estrés hídrico ú osmótico y quizá su manipulación en términos biotecnológicos sea más promisoria.

Por otro lado, Russell *et al.* (1998), reportan que los niveles de proteína, ARN mensajero y actividad enzimática de la colina monooxigenasa (CMO) de *Amaranthus caudatus* L. (la primera enzima participante en la vía de síntesis de la glicina betaína) se incrementan entre 3 a 5 veces en respuesta a estrés por salinidad, si bien los controles presentan niveles basales de los 3 parámetros evaluados. Los resultados conjuntos permiten deducir que los genes que codifican para las 2 enzimas que participan en la vía de síntesis de la glicina betaína en *Amaranthus hypochondriacus* L. son regulados positivamente por estrés osmótico.

Varias especies de cultivos comercialmente importantes tales como el arroz, la papa, el tomate y el tabaco carecen total o parcialmente de la vía de síntesis de GB (McCue y Hanson, 1990; Rhodes y Hanson, 1993). Esto ha motivado a varios investigadores a tratar de manipular la vía biosintética de la glicina betaína para incrementar la tolerancia al estrés y el rendimiento. A la fecha se han generado plantas transgénicas de tabaco transformadas con el ADNc de la BADH de espinaca

(Rathinasabapathi *et al.*, 1994), de cebada (Ishitani *et al.*, 1995), y el gen *betB* de *E. coli* codificando para la BADH (Holmstrom *et al.*, 1994). En todos los casos se observó un incremento en los niveles de ARNm y en la actividad de la proteína respectiva. Dada la alta toxicidad que representa la betaína aldehído suministrada a las plantas, se pudo demostrar que la sobreexpresión de la BADH puede detoxificar al tejido vegetal pero no se determinó si estas plantas toleran al estrés salino. Desafortunadamente, la toxicidad de la betaína aldehído suministrada complicó la interpretación de tales experimentos. Si bien las plantas transgénicas metabolizan la betaína aldehído a tasas suficientes como para conferir resistencia al compuesto, el crecimiento de las plantas se retardó en comparación a los controles. En otros ensayos, Nakamura *et al.* (1997) sometieron plantas de arroz a estrés osmótico con NaCl 150 mM en presencia de betaína aldehído, observando que se acumulaba glicina betaína (1.40  $\mu\text{mol/g}$  de peso fresco) en las plantas confiriendo tolerancia a salinidad durante la germinación y el crecimiento de las plantas.

En otro trabajo Lilius *et al.* (1996) indican que la sobreexpresión del gen *betA* de *E. coli* codificando para la colina deshidrogenasa (CDH) en tabaco mostró la eficacia de la glicina betaína como un osmoprotector, ya que bajas concentraciones (menos de 1 mM) proporcionaron efectos protectores a las plantas sometidas a estrés por 300 mM de NaCl.

Otros osmolitos como el manitol, la prolina y los fructanos han mostrado eficacia para conferir tolerancia al estrés salino, pero la habilidad de las plantas para contender al estrés requiere de muy altas concentraciones del osmoprotector (Tarczynski *et al.*, 1993; Kishor *et al.*,



1995). Se requiere aproximadamente de una concentración de 100 mM de manitol en hojas y raíces de plantas de tabaco para conferir tolerancia a NaCl 250 mM (Tarczynski *et al.*, 1993); se necesitan 6.5 mg/g de peso fresco de prolina para proporcionar a plantas de tabaco tolerancia a NaCl 400 mM (Kishor *et al.*, 1995), y una acumulación de 0.35 mg/g de peso fresco de fructanos en plantas de tabaco para resistir la deshidratación provocada por PEG al 10% (p/v)(Pilon-Smith *et al.*, 1995). Por su parte, Holstrom *et al.* (1996) transformaron plantas de tabaco con el gen codificando para la subunidad TPS1 de la trehalosa-6-fosfato sintetasa de levadura y observaron que es un osmolito muy eficiente, requiriéndose la acumulación aproximada a 5 mM de trehalosa en el citosol para proporcionar ajuste osmótico a las plantas sometidas a desecación durante 7 horas. Todo lo expuesto realza la eficacia de la glicina betaína como un osmolito y la importancia que tiene el tratar de manipular la vía de síntesis para luego introducirla en especies que no la poseen pretendiendo hacerlas más tolerantes al estrés osmótico.

Sin embargo, aún cuando la glicina betaína ha mostrado ser un osmolito muy efectivo para mantener la supervivencia de las plantas bajo condiciones de estrés, su síntesis parece afectar el rendimiento bajo condiciones no estresantes. Rhodes (1997) evaluó líneas isogénicas de maíz que acumulan glicina betaína (Bet1/Bet1) contra líneas no acumuladoras (bet1/bet1), y encontró que la alta acumulación de glicina betaína parece estar asociada con una reducción de un 5% en el rendimiento de grano bajo condiciones de riego en campo. Además la acumulación del osmolito confiere susceptibilidad a hongos patógenos (Rhodes, 1997). Esto indicaría que la introducción de la vía de síntesis de glicina betaína en plantas que no la poseen, posiblemente requerirá la

introducción complementaria de genes que confieran resistencia a hongos patógenos en algunas especies vegetales cultivables bajo condiciones de riego; aunque será necesario probar si la GB afecta el rendimiento o confiere susceptibilidad a patógenos en especies diferentes al maíz.

## VII. CONCLUSIONES

1. En este trabajo de tesis se aislaron un gen completo (*ahybadh4*), una clona genómica parcial (*ahybadh28*) correspondiente a un gen diferente y un ADNc (*ahybadh17*) que codifican para la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) de *Amaranthus hypochondriacus* L. Esto constituye el inicio de una línea de investigación para el estudio de las bases moleculares del ajuste osmótico en el amaranto.

2. La secuencia deducida de aminoácidos de la AHYBADH4 y AHYBADH17 de amaranto mostraron un 39% de identidad con la BADH de *E. coli* y entre 62-83% de identidad con las BADHs de plantas. Los productos codificados por los genes BADH de amaranto son similares entre sí y están más relacionados con secuencias deducidas de plantas dicotiledóneas que con monocotiledóneas.

3. Los sitios activo posibles y péptido de tránsito a cloroplasto están muy conservados entre BADHs de plantas.

4. Tanto el análisis genómico en geles tipo Southern y de secuencias de nucleótidos sugiere la presencia de al menos tres copias del gen *ahybadh* o de una familia multigénica de al menos 3 elementos en el genoma de amaranto.

5. El análisis de la expresión de *ahybadh17* mostró que los niveles de ARNm de la BADH están presentes en hojas de plantas bajo condiciones normales y que se incrementan de manera rápida por exposición a

tratamientos de ácido abscísico (ABA) y estrés osmótico (PEG 17.5% (p/v), NaCl 500 mM).

6. En la región promotora del gen *ahybadh4* se detectaron las secuencias consenso MybRE, CE1 y ABRE, que pueden ser reconocidas por activadores de la transcripción los cuales posiblemente estén involucrados en la regulación del gen por ABA y estrés osmótico.

## VIII. PERSPECTIVAS

1. La manipulación de la vía de biosíntesis de glicina betaína y su introducción en especies de plantas de interés comercial que normalmente no producen el osmoprotector posiblemente permitirá la obtención de cultivos de alto rendimiento y que sean tolerantes al estrés hídrico y salino. Ya que el gen *ahybadh17* se expresa más rápidamente en comparación con los genes aislados en otras especies, podría permitir a las plantas que lo portan, contender más eficazmente los efectos del estrés hídrico ú osmótico y quizá su manipulación en términos biotecnológicos sea más promisoría.

2. El aislamiento futuro del ADNc codificando para la enzima colina monooxigenasa (CMO) permitirá manipular la vía completa de síntesis del osmoprotector glicina betaína en el amaranto y en otras especies de interés económico.

3. Puesto que no existe seguridad acerca de los residuos aminoácidos involucrados en la catálisis y unión al cofactor NAD<sup>+</sup> en la BADH, la expresión de la clona de ADNc *ahybadh17* en bacterias, permitirá identificar los residuos involucrados por mutagénesis sitio-dirigida. Además, dado que se ha encontrado que la BADH de amaranto se inhibe por la acumulación de altas concentraciones de su producto, la modificación del sitio activo por mutagénesis sitio-dirigida posiblemente permitiría que la enzima siguiera activa aún a altas concentraciones de glicina betaína, lo que tal vez resultaría en un incremento de la tolerancia de las plantas al estrés hídrico y salino.

4. El estudio de la región promotora del gen *ahybadh4* en plantas transgénicas permitirá avanzar en el conocimiento de la forma en que se regulan los genes involucrados en la síntesis de osmolitos en plantas.

## IX. REFERENCIAS

**Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K** (1997) Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid- regulated gene expression. *Plant Cell* **9**: 1859-1868.

**Ahmad N, Wyn Jones RG, Jeschke W** (1987) Effects of exogenous glycinebetaine on Na<sup>+</sup> transport in barley roots. *J Exp Botany* **191**: 913-921.

**Andresen PA, Kaasen I, Styrvold OB, Boulnis G, Strom AR** (1988) Molecular cloning, physical mapping and expression of *bet* genes governing the osmoregulatory choline-betaine pathway of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **134**: 1737-1746.

**Arakawa K, Takabe T, Sugiyama T, Akazawa T** (1987) Purification of betaine-aldehyde dehydrogenase from spinach leaves and preparation of its antibody. *J Biochem* **101**: 1485-1488.

**Arakawa K, Katayama M, Takabe T** (1990) Levels of betaine and betaine aldehyde dehydrogenase in the green leaves and etiolated leaves and roots of barley. *Plant Cell Physiol* **31**: 797-803.

**Arakawa K, Mizuno K, Kishitani S, Takabe T** (1992) Immunological studies of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant Cell Physiol* **33**: 833-840.

**Aspinall D, Paleg LG** (1981) Proline accumulation: physiological aspects. In *Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants* (Paleg LG and Aspinall D, eds.). Academic Press, Sidney. 1-50 pp.

**Berry-Lowe SL, Schmidt GW** (1991) Chloroplast protein transport. In: *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, Vol. 7A: The molecular biology of plastids (Bogorad L and Vasil IK, eds.). Academic Press. New York. 63-80 pp.

**Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG** (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7: 1099-1111.

**Borowitzka LJ, Brown AD** (1974) The salt relations of marine and halophytic species of the unicellular green alga *Dunaliella*. The role of glycerol as a compatible solute. *Arch Microbiol* 96: 137-152.

**Bostock RM, Quatrano RS** (1992) Regulation of *Em* gene expression in rice. Interaction between osmotic stress and abscisic. *Plant Physiol* 98: 1356-1363.

**Boyer JS** (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448.

**Boyd LA, Adam L, Pelcher LE, McHughen A, Hirji R, Selvaraj G** (1991) Characterization of an *Escherichia coli* gene encoding betaine aldehyde dehydrogenase (BADH): structural similarity to mammalian ALDHs and a plant BADH. *Gene* 103: 45-52.



**Brouquisse R, Weigel P, Rhodes D, Yocum CF, Hanson AD** (1989) Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma. *Plant Physiol* **90**: 322-329.

**Brown JW** (1986) A catalogue of splice junction and putative branch point sequences from plant introns. *Nucl Acids Res* **14**: 9549-9559.

**Burnet M, Lafontaine PJ, Hanson AD** (1995) Assay, purification, and partial characterization of choline monooxygenase from spinach. *Plant Physiol* **108**: 581-588.

**Chrispeels MJ, Maurel CH** (1994) Aquaporins: The molecular basis of facilitated movement through living plant cells. *Plant Physiol* **105**: 9-13.

**Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM, Anchordoguy TJ** (1990) Are freezing and dehydration similar stress vectors?. A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* **27**: 219-231.

**Cushman JC, DeRocher EJ, Bohnert HJ** (1990) Gene expression during adaptation to salt stress. In *Environmental Injury to Plants* (Katterman, F; ed.). Academic Press, San Diego. 1-70 pp.

**Cushman JC, Vernon DM, Bohnert HJ** (1992) ABA and the transcriptional control of CAM induction during salt stress in the common ice plant. In *Control of Plant Gene Expression* (Verma, DPS; ed.). CRC Press, Boca Raton. 25-43 pp.

- Delauney AJ, Verma DPS** (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* **4**: 215-223.
- Devereux J, Haerberli P, Smithies O** (1984) A comprehensive set of sequence analysis programmes for the VAX. *Nucl Acids Res* **12**: 387-395.
- Downtown WJS** (1973) *Amaranthus edulis* : a high lysine grain amaranth. *World Crops* **25**:20
- Dure L III** (1993) A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J* **3**: 363-369
- Feinberg AP, Vogelstein B** (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**: 6-13.
- Gamboa A, Valenzuela EM, Murillo E** (1991) Biochemical changes due to water loss in leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. *J Plant Physiol* **137**: 586-590.
- Grumet R, Hanson AD** (1986) Genetic evidence for an osmoregulatory function of glycinebetaine accumulation in barley. *Aust J Plant Physiol* **13**: 353-364.
- Handa S, Bressan RA, Handa AK, Carpita NC, Hasegawa PM** (1983) Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress. *Plant Physiol* **73**: 834-843.

**Hanson AD, May AM, Grumet R, Bode J, Jamieson GC, Rhodes D** (1985) Betaine synthesis in chenopods: localization in chloroplasts. Proc Natl Acad Sci USA **82**: 3678-3682.

**Hanson AD, Rathinasabapathi B, Rivoal J, Burnet M, Dillon MO, Gage DA** (1994) Osmoprotective compounds in the Plumbaginaceae: a natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. Proc Natl Acad Sci USA. **91**: 306-310.

**Henikoff S** (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III created targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene **28**: 351-359.

**Holmstrom K-O, Welin B, Mandal A, Kristiansdottir I, Teeri TH, Lamark T, Strom AR, Palva T** (1994) Production of the *Escherichia coli* betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine, in transgenic plants. Plant J **6**: 749-758.

**Holmstrom K-O, Welin EMB, Mandel A, Palva ET** (1996) Drought tolerance in tobacco. Nature **379**: 683-684.

**Ingram J, Bartels D** (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annu Rev Plant Physiol **47**: 377-403.

**Ishitani M, Arakawa K, Mizuno K, Kishitani S, Takabe T** (1993) Betaine aldehyde dehydrogenase in *Gramineae* : levels in leaves of both betaine accumulating and nonaccumulating cereal plants. Plant Cell Physiol **34**: 493-495.

**Ishitani M, Nakamura T, Youn-Han S, Takabe T** (1995) Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol* **27**: 307-315.

**Jakobi WB** (1963) Aldehyde dehydrogenase. In: *The enzymes* (Boyer, Lardy and Myrbere; eds.). Academic Press. New York. Vol 7. 203-221 pp.

**Jofuku KD, Golberg RB** (1988) *Plant Molecular Biology. A Practical Approach* (Shaw, CH; ed.). IRL Press, Oxford. 37-66 pp.

**Jolivet Y, Larher F, Hamelin J** (1982) Osmoregulation in halophytic higher plants: the protective effects of glycine betaine against the heat destabilization of membranes. *Plant Sci Lett* **25**: 193-201.

**Joshi CP** (1987) An inspection of the domain between TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucl Acids Res* **15**: 6643-6653.

**Keegstra K, Olsen LJ, Theg SM** (1989) Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 471-501.

**Kishor KPV, Hong Z, Miao G-H, Hu CH-A, Verma SDP** (1995) Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol* **108**: 1387-1394.

**Kitson TM** (1985) High concentrations of aldehydes slow the reaction of cytoplasmic aldehyde dehydrogenase with thiol-group modifiers. *Biochem J* **228**: 765-767.

**Kitson TM, Hill JP, Midwinter GG** (1991) Identification of a catalytically essential residue in sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. *Biochem J* **275**: 207-210.

**Lamark T, Kaasen I, Eshoo MW, Falkenberg P, McDougall J, Strom AR** (1991) DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 1049-1064.

**Landfald B, Strom AR** (1986) Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **165**: 849-855.

**Larqué-Saavedra A, Trejo LC** (1990) El agua en las plantas. Trillas. México. 40-42 pp.

**Legaria J, Rajsbaum R, Muñoz-Clares RA, Villegas-Sepúlveda N, Simpson J, Iturriaga G** (1998) Molecular characterization of two genes encoding betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth. Expression in leaves under short-term exposure to osmotic stress or abscisic acid. (En prensa).

- Le Rudulier D, Strom AR, Dandekar AM, Smith LT, Valentine RC** (1984) Molecular biology of osmoregulation. *Science* **224**: 1064-1068.
- Lilius G, Holmberg N, Bulow L** (1996) Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase. *Bio/Technology* **14**: 177-180.
- Lutke HA, Chow KC, Mickel FS, Moss KA, Kern HF, Scheele GA** (1987) Selection of the AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J* **6**: 43-48.
- Manetas Y, Petropoulou Y, Karabourniotis G** (1986) Compatible solutes and their effects on phosphoenolpyruvate carboxylase of C4-halophytes. *Plant Cell Environ* **9**: 145-151.
- McCue KF, Hanson AD** (1990) Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotechnol* **8**: 358-362.
- McCue KF, Hanson AD** (1992) Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Mol Biol* **18**: 1-11.
- Money KP** (1989) Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols. *Plant Physiol* **91**: 766-769.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497.

**Nakagawa H, Ohmiya K, Hattori T** (1996) A rice bZIP protein, designated OSBZ8, is rapidly induced by abscisic acid. *Plant J* **9**: 217-227.

**Nakamura T, Yokota S, Muramoto Y, Tsutsui K, Oguri Y, Fukui K, Takabe T** (1997) Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant J* **11**: 1115-1120.

**Pla M, Gómez J, Goday A, Pagés M** (1991) Regulation of the abscisic acid-responsive gene *rab28* in maize *viviparous* mutants. *Mol Gen Genet* **230**: 394-400.

**Pilon-Smits EAH, Ebskamp MJM, Paul MJ, Jeuken JW, Weisbeck PJ, Smeekens SCM** (1995) Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol* **107**: 125-130.

**Pollard A, Wyn Jones RG** (1979) Enzyme activities in concentrated solutions of glycine betaine and other solutes. *Planta* **144**: 291-298.

**Rathinasabapathi B, McCue KF, Gage DA, Hanson AD** (1994) Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenase lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance. *Planta* **193**: 155-162.

**Rathinasabapathi B, Burnet M, Russell BL, Gage DA, Chi-LP, Gordon JN, Scott P, Golbeck JH, Hanson AD (1997)** Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 3454-3458.

**Rivoal J, Hanson AD (1994)** Choline-O-sulfate biosynthesis in plants. Identification and partial characterization of a salinity inducible choline sulfotransferase from species of *Limonium* (Plumbaginaceae). *Plant Physiol* **106**: 1187-1193.

**Rhodes D, Hanson AD (1993)** Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 357-384.

**Rhodes D (1997)** Benefits and costs of accumulation of glycinebetaine in maize. *Suppl. Plant Physiol* **114**: 12

**Robinson SP, Jones GP (1986)** Accumulation of glycinebetaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. *Aust J Plant Physiol* **13**: 659-668.

**Rudolph AS, Crowe JH, Crowe LM (1986)** Effects of three stabilizing agents-proline, betaine, and trehalose- on membrane phospholipids. *Arch Biochem Biophys* **245**: 134-143.



**Russell BL, Rathinasabapathi B, Hanson AD** (1998) Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth. *Plant Physiol* **116**: 859-865.

**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. Vol. 1 y 2. Secciones 2.3-15.6.

**Saneoka H, Nagasaka C, Hanh DT, Yang W-J, Premachandra GS, Joly RJ, Rhodes D** (1995) Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and containing maize lines. *Plant Physiol* **107**: 631-638.

**Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain terminator inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.

**Scroppel-Meier G, Kaiser MM** (1988) Ion homeostasis in chloroplasts under salinity and mineral deficiency. *Plant Physiol* **87**: 822-827.

**Schuler MA, Zielinski RE** (1989) *Methods in Plant Molecular Biology*. Academic Press, San Diego, CA. 89-96 pp.

**Seto D** (1990) An improved method for sequencing double stranded plasmid DNA from minipreps using DMSO and modified template preparation. *Nucl Acid Res* **18**:19.

**Shen Q, Ho THD** (1995) Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each

containing a G-box and a novel *cis*-acting element. *Plant Cell* 7: 295-307.

**Singh NK, Handa AK, Hasegawa PM, Bressan RA (1985)**  
Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl.  
*Plant Physiol* 79: 126-137.

**Skriver K, Mundy J (1990)** Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2: 503-512.

**Styrvoid OB, Falkenberg P, Landfald B, Eshoo MW, Bjornsen T, Strom AR (1986)** Selection, mapping, and characterization of *Escherichia coli* mutants blocked in the choline-glycine betaine pathway. *J Bacteriol* 165: 856-863.

**Tarczyński MC, Jensen RG, Bohnert HJ (1993)** Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* 259: 508-510.

**Trinidad SA, Gómez LF, Suarez RG (1986)** El amaranto, su cultivo y aprovechamiento. Colegio de Postgraduados. México. 23-64 pp.

**Trossat C, Rathinasabapathi B, Hanson A (1997)** Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyzes oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde and  $\omega$ -aminoaldehydes. *Plant Physiol* 113: 1457-1461.

**Truper HG, Galinski EA** (1990) Biosynthesis and fate of compatible solutes in extremely halophilic phototrophic eubacteria. *FEMS Microbiol Rev* **75**: 247-254.

**Tu GC, Weiner H** (1988) Identification of the cysteine residue in the active site of horse liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem* **263**: 1212-1217.

**Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K** (1993) An *Arabidopsis myb* homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved Myb recognition sequence. *Plant Cell* **5**: 1529-1539.

**Valdes-Rodríguez S, Segura-Nieto M, Chagolla-López A, Verver y Vargas-Cortina A, Martínez-Gallardo N, Blanco-Labra A** (1993) Purification, characterization; and complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seeds. *Plant Physiol* **103**: 1407-1412.

**Valenzuela-Soto EM, Muñoz-Clares RA** (1994) Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit. *J Plant Physiol* **143**: 145-152.

**Valenzuela-Soto ME** (1994) Caracterización cinética de la betaína aldehído deshidrogenasa de hojas de amaranto sometidas a déficit de agua. Tesis de Doctor en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM, México. 1-10 pp.

**Valenzuela-Soto ME** (1997) Differences in wild and cultivated amaranth plant Betaine Aldehyde Dehydrogenase. *Suppl. Plant Physiology* **114**:153.

**Vernom DM, Bohnert HJ** (1992) A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembrianthemum crystallinum*. *EMBO J* **11**:2077-2085.

**Vojtechová M, Hanson AD, Muñoz-Clares RA** (1997) Betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD-dependent oxidation of dimethylsulfofropionaldehydes to dimethylsulfofropionate. *Arch Biochem Biophys* **237**: 81-88.

**Weigel P, Weretylnik EA, Hanson AD** (1986) Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiol* **82**: 753-759.

**Weigel P, Lerma C, Hanson AD** (1988) Choline oxidation by intact spinach chloroplasts. *Plant Physiol* **86**: 54-60.

**Weretilnyk EA, Hanson AD** (1988) Betaine aldehyde dehydrogenase polymorphism in spinach: genetic and biochemical characterization. *Biochem Genet* **26**: 143-151.

**Weretilnyk EA, Hanson AD** (1989) Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, *in vitro* translation of the mRNA, and regulation by salinity. *Arch Biochem Biophys* **271**: 56-63.

**Weretilnyk EA, Hanson AD** (1990) Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2745-2749.

**Winicov I, Waterborg JH, Harrington RE, McCoy TJ** (1989) Messenger RNA induction in cellular salt tolerance of alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant Cell Rep* **8**: 6-11.

**Wood AJ, Saneoka H, Rhodes D, Joly RJ, Goldsbrough PB** (1996) Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum. Molecular cloning and expression of two related genes. *Plant Physiol* **110**: 1301-1308.

**Wyn Jones RG, Storey R, Leigh RA, Ahmad N, Pollard A** (1977) A hypothesis on cytoplasmic osmoregulation. In: *Regulation of Cell Membrane Activities in Higher Plants* (Marré OC, ed.) Elsevier, Amsterdam. 1-24 pp.

**Wyn Jones RG, Storey R** (1981) Betaines. In: *Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants* (Paley LG and Aspinall D, eds.) Academic Press, Sidney. 51-60 pp.

**Wyn Jones RG** (1984) Phytochemical aspects of osmotic adaptation. In: *Recent Advances in Phytochemistry* (Lowus FA, ed.). Academic Press, London. 1-30 pp.

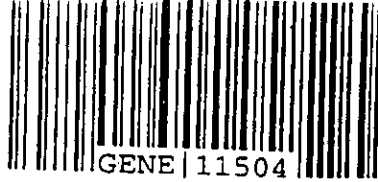
**Yancey PH, Clarck ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN** (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222.

**Yoshida Y, Kiyosue T, Katagiri T, Veda H Mizoguchi T (1995)**  
Correlation between the induction of a gene for  $\delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J* **7**: 751-760.

**Zaccai G, Eisenberg H (1990)** Halophilic proteins and the influence of solvent on protein stabilization. *Trends Biochem Sci* **15**: 333-337.



ELSEVIER



Gene 000 (1998) 000-000

Art. no. S0378-1119(98)00381-3

GENE

AN INTERNATIONAL JOURNAL OF GENES AND GENOMES

# Molecular characterization of two genes encoding betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth. Expression in leaves under short-term exposure to osmotic stress or abscisic acid

J. Legaria <sup>a</sup>, R. Rajsbaum <sup>b</sup>, R.A. Muñoz-Clares <sup>b</sup>, N. Villegas-Sepúlveda <sup>c</sup>, J. Simpson <sup>c</sup>, G. Iturriaga <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, 62210, Cuernavaca Mor., Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, 04510, México D.F., Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV/IPN, Unidad Irapuato, Km 9.3 Carretera Irapuato-León, 36500, Irapuato, Gto., Mexico

Received 1 April 1998; accepted 14 July 1998

## Abstract

A genomic clone (*ahybadh4*) and a cDNA (*ahybadh17*) both encoding betaine aldehyde dehydrogenase (BADH; EC 1.2.1.8) were isolated from the plant *Amaranthus hypochondriacus* L. The *ahybadh4* gene extends 9 kilobases (kb) containing 15 exons with an open reading frame (ORF) of 501 amino acids (aa), a 1.3 kb 5' untranslated region (UTR) and a 3' UTR of 0.3 kb. The *ahybadh17* cDNA encodes a BADH isoform of 500 aa which contains 10 aa substitutions with respect to AHYBADH4. Both encoded proteins share 98% identity at the amino acid level. Comparison of amaranth BADHs with other reported sequences showed high similarity. Analysis of *ahybadh17* expression in amaranth leaves showed that mRNA and BADH protein are present in non-treated amaranth leaves and both transiently increased under short-term exposure to abscisic acid (ABA) and osmotic stress treatments. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Gene cloning; Glycinebetaine; Osmolyte; Drought tolerance; Gene expression

## 1. Introduction

A widely distributed adaptation to counteract abiotic stress is the accumulation of organic solutes compatible with cell metabolism. The most common osmolytes present in many different species are glycerol, mannitol, proline, sucrose, trehalose and ammonium-quatery compounds (for reviews, see Yancey et al., 1982; Rhodes

and Hanson, 1993; Ingram and Bartels, 1996). Glycinebetaine is a quaternary ammonium compound present in bacteria, cyanobacteria, algae, animals and several plant families, but absent in many important crop species (McCue and Hanson, 1990; Rhodes and Hanson, 1993). Genetic studies in bacteria and plants have shown that the presence of glycinebetaine correlates with tolerance to osmotic stress (Styvold et al., 1986; Grumet and Hanson, 1986; Saneoka et al., 1995). In plants, glycinebetaine is synthesized in a two-step oxidation of choline, via the unstable intermediate betaine aldehyde, by a ferredoxin-dependent choline mono-oxygenase (Brouquisse et al., 1989; Burnet et al., 1995) and the NAD<sup>+</sup>-dependent BADH (Weigel et al., 1986). In *Escherichia coli*, the first step is catalysed by a membrane-bound choline dehydrogenase and the conversion to glycinebetaine by either BADH or choline dehydrogenase, as well (Landfald and Ström, 1986; Lamark et al., 1991). In plants, the BADH enzyme is a dimeric protein with 60 kDa monomers (Weigel et al., 81

\* Corresponding author. Tel.: 52-73-114900, ext 285; Fax: 52-73-172388; E-mail: iturri@ibt.unam.mx

Abbreviations: aa, amino acid (s); ABA, abscisic acid; BADH, betaine aldehyde dehydrogenase; bp, base pair (s); cDNA, DNA complementary to RNA; ECL, enhanced chemiluminescence; kb, kilobase (s); kDa, kilodalton (s); NAD<sup>+</sup>, nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form); nt, nucleotide (s); ORF, open reading frame; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PCR, polymerase chain reaction; PEG, polyethylene glycol; RT, reverse transcriptase; RWC, relative water content; SDS, sodium dodecyl sulfate; *isp*, transcription start point; UTR, untranslated region.

1986; Arakawa et al., 1987; Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1994). So far, there are reports of the isolation of BADH genes from *E. coli* (Boyd et al., 1991), spinach (Weretilnyk and Hanson, 1990), sugar beet (McCue and Hanson, 1992), barley (Ishitani et al., 1995), sorghum (Wood et al., 1996) and rice (Nakamura et al., 1997). The BADH protein and mRNA synthesis are induced by drought, saline or cold stress, in parallel with an increase in the glycinebetaine levels.

Previous work has shown that glycinebetaine accumulates also in the mesophyte crop *Amaranthus hypochondriacus* L. (amaranth), upon water stress in leaves (Gamboa et al., 1991). In addition, it has been shown that BADH activity in amaranth is increased in response to short-term exposure to water deficit (Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1994).

We are interested in the molecular basis of osmotic adjustment in *A. hypochondriacus*, and as a first step, here we report the isolation of a full-length gene and a highly homologous cDNA from amaranth, both encoding proteins with homology to BADH. The expression patterns of BADH mRNA and protein were analyzed during a 24-h exposure to different osmotic stress conditions or exogenous ABA.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant growth and treatments

The crop plant *Amaranthus hypochondriacus* L. cv. Azteca was propagated under controlled conditions (24°C and 16 h of light with an average of 50% humidity). Detached leaves from 6-week-old plants were treated with 100 µM ABA, 17.5% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 6000, equivalent to a water potential value of -1.0 MPa (Money, 1989), or 500 mM NaCl. Treatment time is indicated in Fig. 4. The degree of water deficit imposed to the leaves by these treatments was assessed by their relative water content (RWC), determined as described by Gamboa et al. (1991). RWC is defined as:  $100\% \times (\text{fresh weight}) - (\text{dry weight}) / (\text{hydrated weight}) - (\text{dry weight})$ . After sampling and weighing (fresh weight), leaves were immersed for 4 h in distilled water, blotted and weighed (hydrated weight). For dry weight determination, leaves were dried overnight in a 70°C oven.

### 2.2. cDNA cloning by RT-PCR

Total RNA was extracted from amaranth leaves treated with 17.5% PEG for 12 h, according to a previously described method (Schuler and Zielinski, 1989). The first cDNA strand was synthesized using SuperScript II reverse transcriptase (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA). For the second cDNA strand,

the specific oligonucleotides FW (5'-GCGG-GATCCGGCGATCCGTGTACCTTCGC) and RV (5'-CGCGGGATCCTCAAGGAGACTTGTACCATCC-CC) containing a *Bam*HI site were used to amplify the cDNA fragment by PCR using Expand High Fidelity enzyme (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany), and according to the following conditions: 94°C 5 min, (94°C 1 min, 55°C 2 min, 72°C 3 min) 40 cycles, 72°C 5 min. The PCR product was cloned into pBluescript KS(+) vector (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA).

### 2.3. Construction of an amaranth genomic bank

Genomic DNA was extracted (Jofuku and Goldberg, 1988) from 8-week-old amaranth plants and partially digested with *Sau*3AI before fractionation by sucrose density gradient centrifugation. The 9–20 kb fraction was ligated into lambda GEM-11 vector (Promega, Madison, WI, USA). Recombinant plaques were plated in *E. coli* KW251 yielding approx.  $10^5$  original recombinants, 97% of them containing the insert. After amplification, the titer was  $1 \times 10^{10}$  plaques/ml. The genomic bank was screened by standard protocols (Sambrook et al., 1989) using the spinach cDNA (Weretilnyk and Hanson, 1990) as a probe.

### 2.4. Antibody preparation and Western blot analysis

Rabbit polyclonal anti-BADH antibodies were raised according to a standard protocol using purified amaranth BADH (Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1994). Samples of amaranth leaf (2–3 g) were homogenized as previously described (Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1994) and protein concentration was measured by the method of Bradford (1976). Protein samples were fractionated by SDS-PAGE and electropherferred to Immobilon-P<sup>89</sup> membrane (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Immunoblotting was carried out essentially by the method of Towbin et al. (1979). Polyclonal anti-BADH antibody was used as the primary antibody at a dilution of 1:1000. Goat anti-rabbit biotinylated-IgG was used as the secondary antibody at a dilution of 1:5000. Bound antibody was visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) using a kit from Pierce (Rockford, IL, USA), according to the manufacturer's instructions.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Isolation and molecular characterization of an amaranth genomic clone and a cDNA encoding BADH

Approximately 300 000 recombinant lambda plaques from the amaranth genomic bank were plated and 175



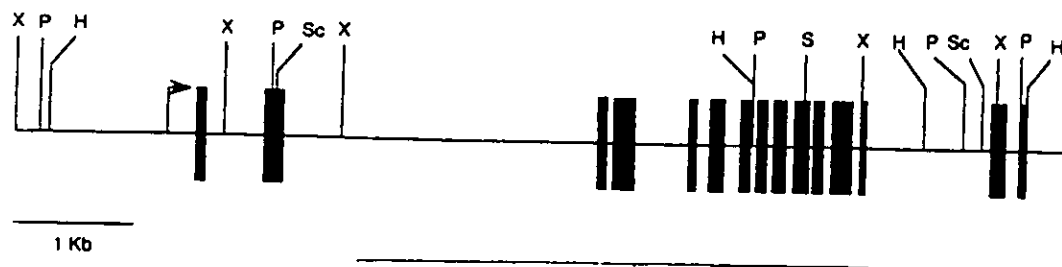


Fig. 1. Gene structure of the *ahybadh4* gene encoding the betaine aldehyde dehydrogenase (AHYBADH4) enzyme from *Amaranthus hypochondriacus* L. The nt sequence was determined using the dideoxy-chain termination method (Sanger et al., 1977). Sequence analysis was performed using the computer program Gene Works version 2.4 (Intelligenetics, Mountain View, CA, USA). The nt sequences reported in this paper will appear in the EMBL, GenBank and DDBJ Nucleotide Sequence Databases under accession numbers AF000132 and AF017150. The line represents amaranth DNA inserted into the *Bam*HI site of lambda GEM-11, with the left arm of the vector on the left. The transcription initiation site is indicated as an arrow. Introns, 5' and 3' flanking regions are indicated by the line and exons by solid bars. The restriction sites are: H, *Hind*III; P, *Pst*I; S, *Sac*II; Sc, *Sac*I; X, *Xba*I.

screened with the spinach *SPIBADH* cDNA (Weretilnyk and Hanson, 1990). Six lambda clones were isolated and characterized by restriction mapping and Southern blot. One clone, lambda *ahybadh4*, contains a 15-kb insert encompassing the entire *ahybadh4* gene of 8998 bp length. Several DNA fragments spanning the *ahybadh4* gene were subcloned in pBluescript in both orientations for DNA sequencing. The sequence revealed a structure of 15 exons with an ORF of 1503 nt encoding a protein of 55 kDa predicted molecular weight, here designated AHYBADH4. Exons are between 60 and 153 bp long and the coding sequence is interrupted by 14 introns of varying length, from 75 to 2723 nt long, comprising altogether 5624 nt of *ahybadh4* sequence (Fig. 1). All intron boundaries in *ahybadh4* have GT in the 5'-splice site and AG in the 3'-site which is consistent with the consensus splicing site of plant genes transcribed by RNA polymerase II (Brown, 1986). The positions of the 14 introns in *ahybadh4* were deduced after nt sequence comparison with the *ahybadh17* cDNA. Interestingly, the splicing sites in *ahybadh4* and the rice gene *osbadh* (Nakamura et al., 1997) correspond exactly to the same positions between exons, although the intron sizes in this latter gene are much shorter and amount to only 2.9 kb of the sequence. The putative initiation

codon of *ahybadh4* has the consensus context found in other plant genes (Lütke et al., 1987). Two putative polyadenylation sequences, AATAAA, were localized at 76 and 297 nt downstream from the stop codon (TGA) in the 360-nt long 3' UTR.

To isolate an amaranth BADH cDNA, the RV and FW primers (Section 2.2) were designed based on the nt sequence of *ahybadh4*, which enabled synthesis by RT-PCR of a cDNA containing a full-length *badh* ORF but lacking the 5' and 3' UTR. Five clones from three independent PCR reactions were sequenced and all were identical. The encoded product of one selected clone, *ahybadh17*, is 98% identical at the aa level to AHYBADH4. The isoform AHYBADH17 consists of 500 aa with 10 aa substitutions with respect to AHYBADH4.

### 3.2. Comparison of amaranth BADHs with other BADH sequences

The identity at the aa level between reported BADH sequences is shown in Table 1. The amaranth AHYBADH4 and AHYBADH17 deduced proteins showed 39% identity to bacterial BADH (Boyd et al., 1991). The most related sequences to amaranth BADHs

Table 1  
Sequence comparison of BADH deduced proteins

	AHYBADH17	SPIBADH	BVBADH	ECOBETB	OSBADH	BADH15	BLYBAD
AHYBADH4	98	83	83	39	70	62	70
AHYBADH17		83	83	39	71	63	70
SPIBADH			90	37	71	63	70
BVBADH				37	69	61	69
ECOBETB					37	33	36
OSBADH						77	82
BADH15							71

Comparison of deduced amino acid sequence of amaranth AHYBADH4 and AHYBADH17 proteins with the spinach SPIBADH, *E. coli* ECOBETB, sugarbeet BVBADH, rice OSBADH, sorghum BADH15 and barley BLYBAD. Sequence identity is shown as a percentage after sequence alignment using Gene Works version 2.4.

228 were from spinach (Weretilnyk and Hanson, 1990) and  
 229 sugarbeet (McCue and Hanson, 1992) which shared  
 230 83% identity. Rice BADH (Nakamura et al., 1997)  
 231 showed 70 and 71% identity to AHYBADH4 and  
 232 AHYBADH17, respectively. Both amaranth BADHs  
 233 share 70% identity to barley BADH (Ishitani et al.,  
 234 1995). Among plant sequences, sorghum BADH (Wood  
 235 et al., 1996) is the least related, with only a 62 and 63%  
 236 identity to AHYBADH4 and AHYBADH17, respec-  
 237 tively. Therefore, the *A. hypochondriacus* AHYBADH4  
 238 and AHYBADH17 aa sequences are more related to  
 239 BADHs from the Chenopodiaceae plant family than to  
 240 the Poaceae and prokaryotic BADHs, as shown in a  
 241 dendrogram plot (Fig. 2), which is in agreement with  
 242 their phylogenetic relationship.

243 The decapeptide VTLELGKSP and surrounding aa  
 244 residues, are highly conserved among aldehyde dehydro-  
 245 genases and BADHs and have been shown to be involved  
 246 in the enzyme active site and NAD<sup>+</sup> binding (Weretilnyk  
 247 and Hanson, 1990; Boyd et al., 1991; McCue and  
 248 Hanson, 1992; Wood et al., 1996). This decapeptide is  
 249 also present in AHYBADH4 and AHYBADH17  
 250 deduced proteins, suggesting that they are active  
 251 enzymes. The BADHs belong to the aldehyde dehydro-  
 252 genases superfamily of eubacteria and eukaryotes which  
 253 comprises enzymes that are specific or non-specific for  
 254 particular aldehyde substrates (Habenicht et al., 1994).  
 255 In fact, it has been shown that amaranth BADH is also  
 256 able to catalyse the oxidation of dimethylsuloniopropio-  
 257 naldehyde (Vojtechová et al., 1997).

258 The spinach BADH was localized in the chloroplast  
 259 stroma, apparently targeted by means of a transit pep-

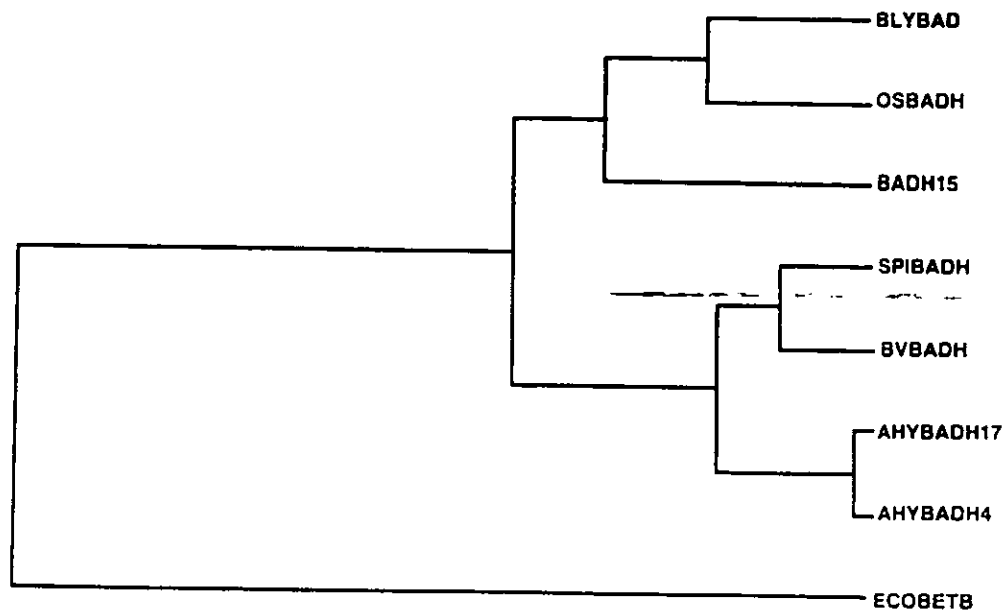
260 tide localized in the N-terminus (Weigel et al., 1986;  
 261 Weretilnyk and Hanson, 1990). A relatively similar  
 262 sequence is present in other BADH proteins, including  
 263 amaranth AHYBADH4 and AHYBADH17. Recently,  
 264 it has been reported that rice OSBADH was intracellu-  
 265 larly localized in the peroxisomes, probably targeted  
 266 by a highly conserved SKL C-terminal sequence  
 267 (Nakamura et al., 1997). This tripeptide sequence is  
 268 present in all other monocotyledonous BADH proteins  
 269 but is absent in amaranth and other reported dicotyle-  
 270 donous BADHs.

### 3.3. Structure of the 5'-flanking region of the *ahybadh4* gene

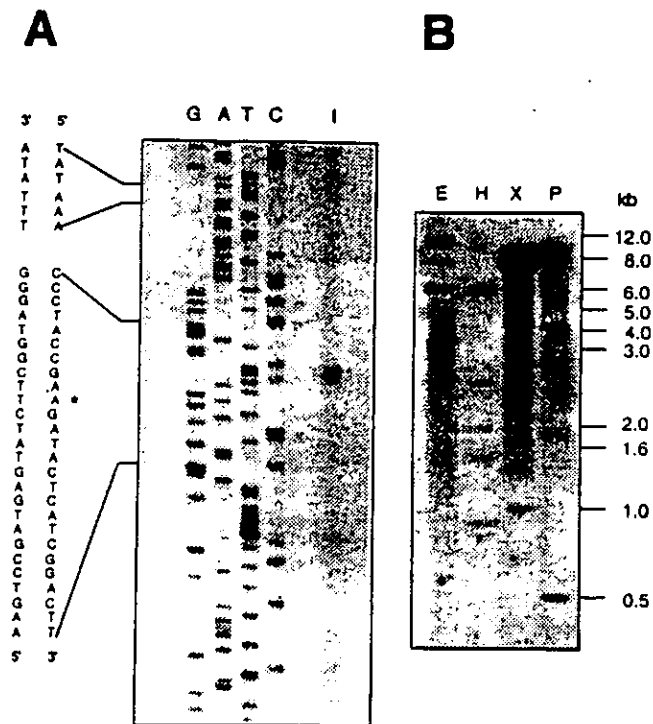
273 The 5' upstream sequence (Fig. 1) of *ahybadh4* is  
 274 1356-bp long comprising a putative promoter region.  
 275 To determine the *isp* of *ahybadh4*, a primer extension  
 276 analysis was carried out. A single band was identified  
 277 which corresponds to 158 nt from the initiation codon  
 278 and 38 nt downstream from the TATA box (Fig. 3A).  
 279 In addition, a CAAT box was found at -75 nt from  
 280 the start site of transcription. A spurious ATG was  
 281 localized at +76 nt in the 5' UTR out of frame of the  
 282 AHYBADH4 ORF.

### 3.4. Southern blot analysis

284 To determine the copy number of amaranth *badh*  
 285 genes, a genomic Southern blot was hybridized with  
 286 *ahybadh17* cDNA as a probe, as shown in Fig. 3B. Since  
 287 there are no internal *EcoRI* sites in *ahybadh4*, the six



22  
 26 Fig. 2. Dendrogram of relationships among BADH proteins. Comparison is based on sequence alignment obtained with Gene Works version 2.4.  
 27 Protein sequences included in this comparison are from barley (BLYBAD), rice (OSBADH), sorghum (BADH15), spinach (SPIBADH), sugarbeet  
 28 (BVBADH), amaranth (AHYBADH4 and AHYBADH17), and *E. coli* (ECOBETB).



paralleled by increases in BADH enzyme activity 303  
 (Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1994). To investi- 304  
 gate whether the *ahybadh* genes were induced by osmotic 305  
 stress, and whether the level of gene transcript correlates 306  
 with the amount of BADH protein, detached amaranth 307  
 leaves were treated with 17.5% PEG 6000 or 500 mM 308  
 NaCl for 24 h. ABA mediates desiccation tolerance in 309  
 plants, and is involved in the response to other abiotic 310  
 stresses such as salt, cold and wound (Ingram and 311  
 Bartels, 1996). To extend our analysis, amaranth leaves 312  
 were also treated with 100  $\mu$ M ABA for 24 h. Total 313  
 RNA extracted from untreated and treated leaves was 314  
 analyzed in a Northern blot using as a probe the 315  
*ahybadh17* cDNA (Fig. 4, lanes 1-5). The observed 316  
*ahybadh17* mRNA was detected as a single band of 317  
 approx. 1.9 kb long, which is consistent with the 318  
 expected size for a full-length cDNA. All filters were 319  
 rehybridized with a 28S ribosomal gene-fragment probe 320  
 to confirm that all samples were correct and equal RNA 321  
 amounts were loaded (Fig. 4, lanes 1-5). In addition, 322  
 soluble protein extracted from untreated and treated 323  
 leaves was analyzed in a Western blot and the BADH 324  
 protein was immunodetected using polyclonal anti- 325  
 BADH antibodies (Fig. 4, lanes 1-5). The electropho- 326  
 retic mobility of the immunoreactive species was identi- 327  
 cal to that observed for highly purified BADH (Fig. 4, 328  
 lane \*) and corresponded to a molecular mass of 62 kDa. 329

As shown in Fig. 4, *ahybadh17* mRNA and BADH 330  
 protein are present in treated and untreated amaranth 331  
 leaves. The levels of the *ahybadh17* transcript in treated 332  
 leaves remained above the controls throughout the 24- 333  
 h exposure period, with a significant increase observed 334  
 within 1 h from the start of the osmotic treatment. 335  
 Western blot analyses also showed a relative change in 336  
 the content of BADH protein after 1 h of treatments 337  
 (Fig. 4). 338

In order to obtain a more accurate estimate of changes 339  
 in *ahybadh17* transcript and protein levels, a densitomet- 340  
 ric analysis of Northern and Western blots was per- 341  
 formed. The relationship between the expression level 342  
 of the *ahybadh17* gene and the level of BADH protein, 343  
 during 24 h exposure to the different treatments, is given 344  
 as a histogram in Fig. 4 (top). The maximum reponse 345  
 was observed in the NaCl-treated leaves, where 6 h after 346  
 treatment the BADH protein content was 6-fold higher 347  
 than at the beginning of the experiment. In PEG- and 348  
 ABA-treated leaves, the levels of BADH protein had a 349  
 4-fold increase with respect to levels at the start of the 350  
 experiment and declined thereafter, although they 351  
 remained above the initial value throughout the 24-h 352  
 treatment period (Fig. 4). Our results in amaranth are 353  
 consistent with the expression pattern of BADH trans- 354  
 cript and protein in other plants, where basal levels in 355  
 untreated tissues increase upon osmotic treatment 356  
 (Weretilnyk and Hanson, 1990; McCue and Hanson, 357

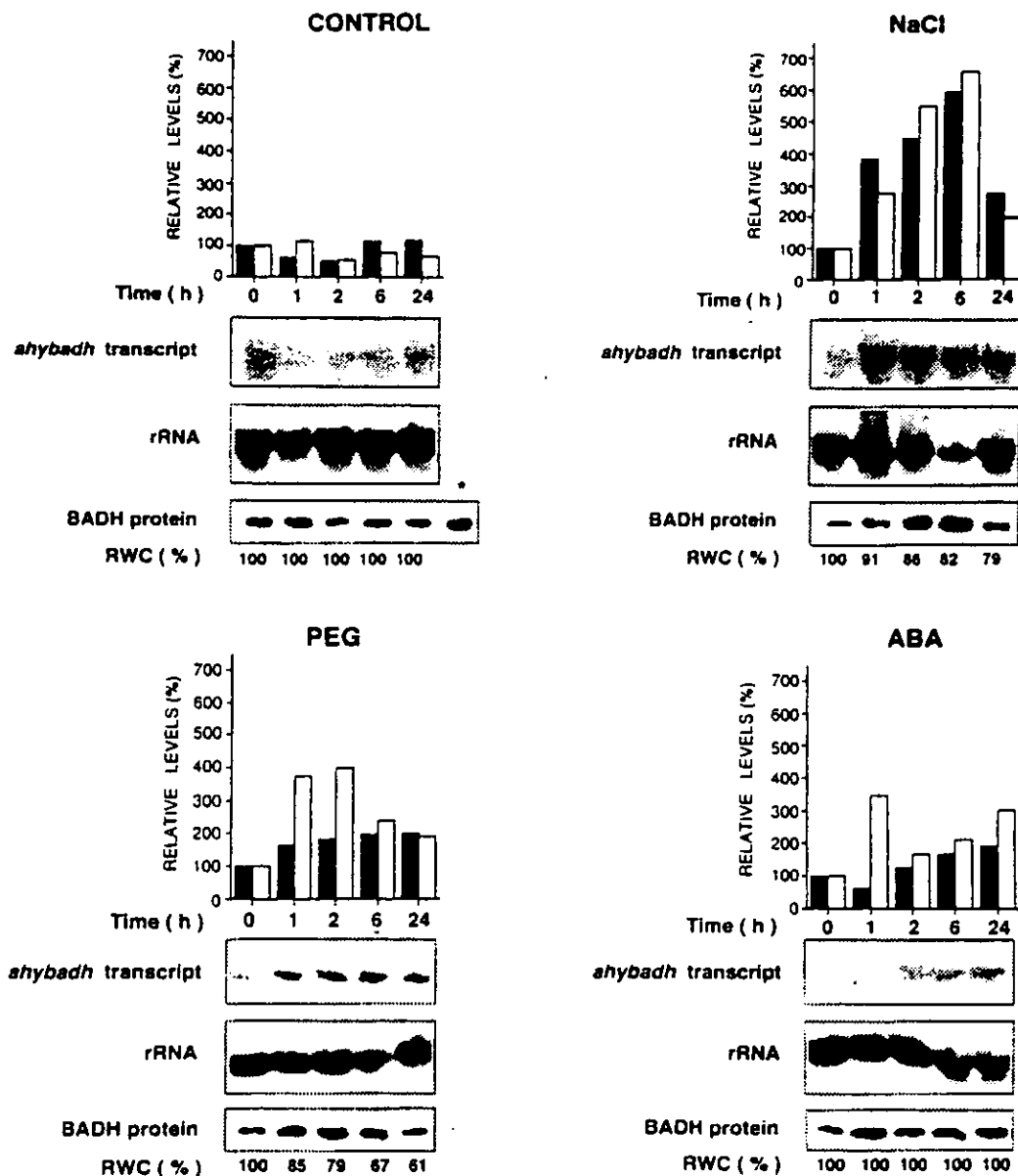
T.O.  
 AND  
 RUN  
 ON  
 PAR

37 Fig. 3. Structural features of the amaranth *ahybadh4* gene. (A)  
 38 Mapping of *isp*. Primer extension was performed by a standard method  
 39 (Sambrook et al., 1989) using a 21 nucleotide primer (5'-  
 40 CGCGAAGGTACACGGATCGCC) which matches the 3' end of the  
 41 second codon of the amaranth *ahybadh4* gene. Lanes G, A, T and C  
 42 are the corresponding nt of the sequencing reaction of *ahybadh4* deter-  
 43 mined with the same primer as before and run next to primer-extension  
 44 products in an 8 M urea-6% polyacrylamide gel. Lane I is the primer-  
 45 extension assay. The nt sequence around the start site of transcription  
 46 (indicated by an asterisk) and the TATA box are depicted on the left.  
 47 (B) Southern blot analysis. Amaranth genomic DNA (20  $\mu$ g) was  
 48 digested with different restriction enzymes and fractionated in a 0.8%  
 49 agarose gel, before capillary transfer to a nylon membrane. The blot  
 50 was hybridized using standard protocols (Sambrook et al., 1989) with  
 51 the amaranth *ahybadh17* cDNA as a probe. Lanes are as follows: E,  
 52 *Eco*RI; H, *Hind*III; X, *Xba*I; P, *Pst*I. Numbers on the right are molecu-  
 53 lar weight markers in kb.

288 bands observed could represent a similar number of  
 289 gene copies, although the possibility cannot be excluded  
 290 that other homologous genes have internal *Eco*RI sites.  
 291 After digestion with *Hind*III, five bands were observed  
 292 but only three correspond to *ahybadh4*. Similarly, diges-  
 293 tion with *Xba*I resulted in six bands and only four were  
 294 expected to correspond to *ahybadh4*. Therefore, these  
 295 results suggest that there is a multigene family for  
 296 BADH in the *A. hypochondriacus* genome. The restric-  
 297 tion map of *ahybadh4* is shown in Fig. 1 for comparison  
 298 of DNA fragments observed in the Southern blot.

299 3.5. Expression of *ahybadh* genes and BADH protein

300 Earlier reports on amaranth have shown that in  
 301 detached leaves glycinebetaine is accumulated upon  
 302 dehydration stress (Gamboa et al., 1991) and this is



58

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

Fig. 4. Northern and Western blot analyses of *ahybadh17* gene and BADH protein expression in amaranth leaves. Total RNA or soluble protein were extracted from untreated amaranth leaves (CONTROL) or treated with 17.5% (w/v) PEG (PEG), 500 mM NaCl (NaCl) or 100  $\mu$ M ABA (ABA) at the indicated times. RNA extracts (40  $\mu$ g) were fractionated in a formaldehyde–1.2% agarose gel and capillary transferred to a nylon membrane. The blot was hybridized using standard protocols (Sambrook et al., 1989) with the amaranth *ahybadh17* cDNA as a probe or with a ribosomal gene-fragment from *Phaseolus vulgaris*. Protein extracts (20  $\mu$ g of 40–60% ammonium sulfate fraction) were fractionated in a 10% SDS-PAGE gel, electrotransferred and immunoblotted. BADH protein was detected with anti-amaranth BADH polyclonal antibodies by ECL. Corresponding RWC values (%) are indicated below each lane. Top. Quantification of the *ahybadh* transcript (solid bars) and BADH protein (open bars) relative levels during 24 h exposure to 17.5% PEG, 500 mM NaCl, or 100  $\mu$ M ABA. Autoradiograms and immunoblots were scanned using a laser-beam densitometer and the relative signals for each lane were plotted after standardization. Treated samples were assigned relative levels after comparison with CONTROL (untreated) samples (taken as 100%) at each time point. Northern blots were re-probed with a 28S ribosomal gene fragment from *Phaseolus vulgaris* and the relative transcript levels were then standardized with respect to the hybridization with the latter probe. The relative BADH protein content was determined by reference to the density of the band observed at zero time of each treatment.

358

359

360

361

362

1992; Ishitani et al., 1995; Wood et al., 1996; Nakamura et al., 1997).

The initial increases in *ahybadh17* transcript levels may suffice for the increases in BADH protein observed during the course of the experiment. Alternatively, since

in amaranth there is a family of *badh* genes, as in sugar beet (McCue and Hanson, 1992) and sorghum (Wood et al., 1996), another member of the family could be also expressed under our experimental conditions. Thus, the induction of *ahybadh* transcript (Fig. 4) can be

attributed to *ahybadh17* but the possibility that the *ahybadh4* gene could also be regulated by stress cannot be excluded.

To assess the degree of water deficit imposed to the leaves by the different treatments, their RWC was determined. As expected, RWC values remained constant during the experiment in control- and ABA-treated leaves, while those of PEG- and NaCl-treated leaves declined (Fig. 4). It is interesting that a relatively smaller decrease in the RWC of leaves treated with NaCl is able to trigger a higher accumulation of the BADH transcript and protein (Fig. 4). This might result from the combined effect of osmotic stress and ion toxicity caused by the treatment with 500 mM NaCl.

Finally, our results show that in detached leaves of amaranth the expression of the *ahybadh17* gene and the amount of BADH protein respond rapidly to osmotic stress or to exogenous ABA (Fig. 4). Previous observations of increases in the levels of BADH mRNAs or BADH protein in spinach (Weretilnyk and Hanson, 1990), sugar beet (McCue and Hanson, 1992), barley (Arakawa et al., 1992; Ishitani et al., 1995), sorghum (Wood et al., 1996) and rice (Nakamura et al., 1997) leaves were made after much longer periods of exposure to the stress conditions. The shortest time in which the response was observed was 12 h (Ishitani et al., 1995). Our present results are consistent with the reported rapid accumulation of glycinebetaine in detached amaranth leaves observed 2 h after the onset of water deficit (Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1994).

### 3.6. Conclusions

- (1) A complete gene and a homologous full-length cDNA from *A. hypochondriacus* coding for BADH have been cloned and sequenced.
- (2) The amaranth BADH encoded products are almost identical among them and more closely related to dicotyledonous than monocotyledonous BADH deduced sequences.
- (3) The *ahybadh17* gene and BADH protein are rapidly accumulated in amaranth leaves in response to short-term exposure to osmotic stress or to exogenous ABA, although response is stronger to NaCl treatment.

### Acknowledgement

We are indebted to Dr Andrew D. Hanson (University of Florida, Gainesville, USA) for his kind gift of the spinach BADH cDNA clone and Dr José M. Colmenero (Instituto de Biotecnología-UNAM, Cuernavaca, México) for the *P. vulgaris* ribosomal gene-fragment. We are also grateful to Paul Gaytán and Eugenio López

for technical assistance. This research was supported by grants 1712-N9209 to G.I. and 1713-N9209 to R.A.M.-C. from CONACYT, México.

### References

- Arakawa et al., 1992 not in ref. list
- Arakawa, K., Takabe, T., Sugiyama, T., Akazawa, T., 1987. Purification of betaine-aldehyde dehydrogenase from spinach leaves and preparation of its antibody. *J. Biochem.* 101, 1485–1488.
- Boyd, L.A., Adam, L., Pelcher, L.E., McHughen, A., Hirji, R., Selvaraj, G., 1991. Characterization of an *Escherichia coli* gene encoding betaine aldehyde dehydrogenase (BADH): structural similarity to mammalian ALDHs and a plant BADH. *Gene* 103, 45–52.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 112, 195–203.
- Brouquisse, R., Weigel, P., Rhodes, D., Yocum, C.F., Hanson, A.D., 1989. Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma. *Plant Physiol.* 90, 322–329.
- Brown, J.W., 1986. A catalogue of splice junction and putative branch point sequences from plant introns. *Nucl. Acids Res.* 14, 9549–9559.
- Burnet, M., Lafontaine, P.J., Hanson, A.D., 1995. Assay, purification, and partial characterization of choline monooxygenase from spinach. *Plant Physiol.* 108, 581–588.
- Gamboa, A., Valenzuela, E.M., Murillo, E., 1991. Biochemical changes due to water loss in leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. *J. Plant Physiol.* 137, 586–590.
- Grumet, R., Hanson, A.D., 1986. Genetic evidence for an osmoregulatory function of glycinebetaine accumulation in barley. *Aust. J. Plant Physiol.* 13, 353–364.
- Habenicht, A., Hellman, U., Cerf, R., 1994. Non-phosphorylating GAPDH of higher plants is a member of the aldehyde dehydrogenase superfamily with no sequence homology to phosphorylating GAPDH. *J. Mol. Biol.* 237, 165–171.
- Ingram, J., Bartels, D., 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 47, 377–403.
- Ishitani, M., Nakamura, T., Youn-Han, S., Takabe, T., 1995. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 27, 307–315.
- Jofuku, K.D., Goldberg, R.B., 1988. *Plant Molecular Biology. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford.
- Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M.W., Falkenberg, P., McDougall, J., Ström, A.R., 1991. DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycinebetaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5, 1049–1064.
- Landfärd, B., Ström, A.R., 1986. Choline-glycinebetaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 165, 849–855.
- Lütke, H.A., Chow, K.C., Mickel, F.S., Moss, K.A., Kern, H.F., Scheele, G.A., 1987. Selection of the AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J.* 6, 43–48.
- McCue, K.F., Hanson, A.D., 1990. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotechnol.* 8, 358–362.
- McCue, K.F., Hanson, A.D., 1992. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Mol. Biol.* 18, 1–11.
- Money, K.P., 1989. Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols. *Plant Physiol.* 91, 766–769.
- Nakamura, T., Yokota, S., Muramoto, Y., Tsutsui, K., Oguri, Y., Fukui, K., Takabe, T., 1997. Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and

- 483 sible localization of its protein in peroxisomes. *Plant J.* 11, 507  
 484 1115–1120. 508
- 485 Rhodes, D., Hanson, A.D., 1993. Quaternary ammonium and tertiary 509  
 486 sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 510  
 487 *Plant Mol. Biol.* 44, 357–384. 511
- 488 Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning:* 512  
 489 *A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory 513  
 490 Press, Cold Spring Harbor, NY. 514
- 491 Saneoka, H., Nagasaka, C., Hanh, D.T., Yang, W.-J., Premachandra, 515  
 492 G.S., Joly, R.J., Rhodes, D., 1995. Salt tolerance of glycinebetaine- 516  
 493 deficient and -containing maize lines. *Plant Physiol.* 107, 631–638. 517
- 494 Sanger, F., Niclen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with 518  
 495 chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 519  
 496 5463–5467. 520
- 497 Schuler, M.A., Zielinski, R.E., 1989. *Methods in Plant Molecular Biol-* 521  
 498 *ogy*. Academic Press, San Diego, CA. 522
- 499 Styrvoid, O.B., Falkenberg, P., Landfald, B., Eshoo, M.W., Björnsen, 523  
 500 T., Ström, A.R., 1986. Selection, mapping, and characterization of 524  
 501 *Escherichia coli* mutants blocked in the choline-glycinebetaine path- 525  
 502 way. *J. Bacteriol.* 165, 856–863. 526
- 503 Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer 527  
 504 of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: pro- 528  
 505 cedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 529  
 506 4350–4353. 530
- Valenzuela-Soto, E.M., Muñoz-Clares, R.A., 1994. Purification and 507  
 properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from 508  
 detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to 509  
 water deficit. *J. Plant Physiol.* 143, 145–152. 510
- Vojtechová, M., Hanson, A.D., Muñoz-Clares, R.A., 1997. Betaine- 511  
 aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes 512  
 the NAD-dependent oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde 513  
 to dimethylsulfoniopropionate. *Arch. Biochem. Biophys.* 337, 514  
 81–88. 515
- Weigel, P., Weretilnyk, E.A., Hanson, A.D., 1986. Betaine aldehyde 516  
 oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 82, 753–759. 517
- Weretilnyk, E.A., Hanson, A.D., 1990. Molecular cloning of a plant 518  
 betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adapta- 519  
 tion to salinity and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 520  
 2745–2749. 521
- Wood, A.J., Saneoka, H., Rhodes, D., Joly, R.J., Goldsbrough, P.B., 522  
 1996. Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum. *Molecular cloning* 523  
 and expression of two related genes. *Plant Physiol.* 110, 524  
 1301–1308. 525
- Yancey, P.H., Clarck, M.E., Hand, S.C., Bowler, R.D., Somero, G.N., 526  
 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Sci-* 527  
~~ence~~ 217, 1214–1222. 528