

SYLVIE RICHARD

Analyse moléculaire de la réponse aux stress chez *Picea glauca*

**Thèse
présentée
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)**

**DÉPARTEMENT DES SCIENCES DU BOIS ET DE LA FORÊT
FACULTÉ DE FORESTERIE ET DE GÉOMATIQUE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC**

Mai 1999

© Sylvie Richard, 1999



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-43108-8

Canada



Ce 1^{er} jour du mois de Mai 19 89, les personnes soussignées, en leur qualité de membres du jury de la thèse de Mme Sylvie RICHARD, ont assisté à la soutenance de cette thèse.

NOMS	UNIVERSITÉ	SIGNATURE
<u>JOUANIN LISE</u>	<u>INRA Versailles</u>	
<u>Brisson, Louise</u>	<u>université Laval</u>	
<u>GIASSON, Luc</u>	<u>UNIVERSITÉ LAVAL</u>	
<u>ARMAND SÉGUIN</u>	<u>UNIVERSITÉ LAVAL</u>	
<u>Bousquet, Jean</u>	<u>Univ. Laval</u>	

RÉSUMÉ COURT

Trois clones d'ADNc ont été isolés chez le conifère *Picea glauca*. *PgCHS1* est un clone partiel codant potentiellement pour un gène de «chalcone synthase», *PgDhn1* et *PgRNP* sont des clones vraisemblablement complets. *PgDhn1* code potentiellement pour un gène de déshydrine et *PgRNP* pour un gène de protéine riche en glycine et liant potentiellement l'ARN. La correspondance entre les séquences d'ADN obtenues et les protéines décrites ci-dessus a été faite par comparaison avec les banques de données. Ces trois clones ont par la suite été utilisés comme sonde dans des analyses de type northern chez *P. glauca* afin de voir leur implication potentielle dans les mécanismes de défense induits par les stress de blessure, de froid et de sécheresse. L'étude a également porté sur le potentiel de certains composés chimiques connus comme étant médiateurs de certains stress tels les jasmonates, sur l'induction de ces gènes et sur la possibilité qu'ils représentent également des molécules signalisatrices dans les mécanismes de défense chez les conifères.

RÉSUMÉ LONG

Les plantes possèdent la capacité de percevoir les changements de leur environnement et de s'y adapter pour survivre. La perception de ces modifications par la plante se traduit par une signalisation cellulaire à l'aide de médiateur biochimique suivie d'une altération de l'expression génique. Les buts de cette thèse consistaient à trouver des gènes de conifères impliqués dans les mécanismes de défense contre certains stress, à faire leur étude d'expression et à voir si les médiateurs chimiques connus chez les angiospermes sont potentiellement impliqués dans les mécanismes de défense chez l'épinette blanche. Une stratégie PCR, combinée à l'utilisation d'amorces dégénérées représentant des régions conservées de la «chalcone synthase» chez diverses espèces de plante, nous a permis d'isoler un clone partiel d'ADNc codant potentiellement pour une «chalcone synthase» de *Picea glauca* (*PgCHS1*). *PgCHS1* a ensuite été utilisée comme sonde dans une étude d'expression de type northern. Les transcrits *CHS* sont induits par les stress de blessure, localement et systématiquement. L'application d'acide jasmonique et la présence de méthyle jasmonate peuvent également conduire à une accumulation des ARNms chez des semis.

Deux clones potentiellement complets ont été isolés d'une banque d'ADNc construite à partir d'ARNms provenant d'aiguilles de semis d'épinette blanche traitées soit à l'acide jasmonique, au méthyle jasmonate, ou blessées mécaniquement. À partir d'homologie de séquences, le clone *PgDhn1* coderait pour un gène de déshydrine tandis que le clone *PgRNP* coderait pour un gène de protéine riche en glycine et liant l'ARN. Les ARNms de *PgDhn1* sont induits dans les tissus foliaires de *P. glauca* par les stress de blessure, de froid et de sécheresse. Les jasmonates ont également eu un effet sur leur accumulation. Les analyses avec la sonde correspondant au gène *PgRNP* ont démontré que les transcrits *PgRNP* sont induits par une réponse systémique de blessure et par un traitement à l'acide jasmonique chez les plants en serre. Les stress de blessure ne présentent pas d'effets clairs sur le niveau de transcrits. Le niveau de transcrits a été diminué par la sécheresse. À la lumière des résultats obtenus avec *P. glauca*, il est possible de présager que les gymnospermes partagent des similarités avec les angiospermes sur la base de leurs systèmes de défense aux stress.

REMERCIEMENTS

La Fondation de l'Université Laval

Le Fonds FCAR

Ministère des Affaires internationales, de l'immigration et des Communautés culturelles:

Projet de coopération franco-québécoise en science et technologie

Ministère des Ressources Naturelles du Québec

L'Association des Universités et Collèges du Canada: Programme Horizon le Monde

La Fédération Canadienne des Femmes Diplômées des Universités

L'Association des Étudiant(e)s de Laval Incrit(e)s aux Études Supérieures

Le Centre de Recherche en Biologie Forestière

Mes professeurs:

Armand Séguin

Jean Bousquet

Lise Jouanin

Luc Giasson

Louise Brisson

François Belzille

Le corps professoral du CRBF

Ma famille:

Henning

Martin

Walter

André

Christiane

Frauke

Yolande

Irene

Uwe

Mes collègues du CRBF:

François Laroche

Laurent Maggia

Éric Forget

Alice Roy

Ken Dewar

Martin Michaud

Berta Bago

Sylvain Jeandroz

Françoise Plante

Catherine Albrecht

Fabrice Lantheaume

Thomas Hurek

Daniel Perry

Claude Bomal

Horst Vierheilig

Jérôme Laroche

Martin Perron

Andrew Coughlan

Abdelali Et-Touil

Driss Iraqi

Abdelmalek El Meskaoui

Laurence Tremblay

Josée Dufour

Louis St-Laurent

Chantal Morin

Caroline Levasseur

Julie Belles-Isles

Jean-Guy Catford

Ginette Martel

Colette Boursier

Claude Fortin

Julie Samson

Edwige Cazava

Luc Simon

Caroline Marion

Marika de Lalonde

Chantal Garand

Er-Ning Han

Du Centre de Foresterie des Laurentides:

Maria Luckevich	Elisabeth Garin	Gervais Pelletier
Nathalie Isabel	Sylvie Gauthier	

De l'Université du Québec à Montréal:

Nathalie Campeau	Sylvie Laliberté	Nicole Brassard
Ann Greer	Janet Wyman	

De l'AÉLIÉS:

Lynn Bélanger	Pierre Robitaille	Éric Provencher
Étienne LaBillois	Marie-Claude Lajoie	Stéphane Godbout

De Versailles (France):

Christine Drevet	Cyrine El Euch	Emmanuelle Chognot
Marie Baucher	Hatem Ben Jouira	Ana-Carolina Arisi
Annette Ross	Thomas Martin	Anne-Marie Krapp
Michael Burnet	Abdelhak El Amrani	Michel Bonadé Bottino
Yves et Cécile Lantheaume	Mme Triquet	

De la paroisse St-Charles-Borromée (Charlesbourg):

Gaetane Lanthier	Claude Lanthier	Ngoc-Lam Nguyen
Esther Dorion	Raymond Dorion	Laurier Morasse
Nathalie Bédard	Michel Danjou	Denis Lalancette
Marie-Josée Lacasse	Michel Gameau	André Thivierge
Yves Baulé	Francine Baulé	André Breton
Rita Bédard	Danielle Boisjoli	Jean-Luc Gilbert
Monique Blouin	Gilles Laflamme	

De toujours:

Gratien Raiche	Bertrande Raiche	Sylvain Raiche
Sonia Beaudry	France Ravenelle	Denis Beauregard
Nathalie Roy	Richard Gervais	Sylvie Cordeau
Henri-Paul Raiche	Père J-M-R Tillard (o.p.)	Christine Le Beau
Sonia Lafleur	Catherine Bruneau	Yves Raiche

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ COURT	I
RÉSUMÉ LONG.....	II
REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES FIGURES.....	VIII
CHAPITRE I.....	1
1.1 INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1.1 Perception des stress environnementaux : La signalisation cellulaire.....	6
1.1.2 Les jasmonates	7
1.1.3 Le mécanisme de signalisation des jasmonates.....	9
1.2 La «chalcone synthase» et la réponse aux stress.....	13
1.2.1 Structure génique.....	14
1.2.2 Régulation génique de la CHS par différents stress.....	15
1.3 Les mécanismes de résistance aux stress hydriques: Le cas des déshydrines	17
1.3.1 L'implication des déshydrines dans la réponse aux stress.....	19
1.3.2 Composantes structurales des déshydrines	24
1.3.2.1 Le segment riche en lysine.....	24
1.3.2.2 La série de résidus sérine.....	25
1.3.2.3 Le motif DEYGNP et autres caractéristiques	25
1.4 Les protéines riches en glycine liant l'ARN.....	26
1.4.1 Les structures.....	27
1.4.2 L'implication des protéines riches en glycine liant l'ARN dans la réponse aux stress.....	29
1.5 Objectifs de la thèse	30
CHAPITRE II.....	31
CHARACTERIZATION OF A PUTATIVE CHALCONE SYNTHASE GENE IN WHITE SPRUCE (<i>PICEA GLAUCA</i> (MOENCH) VOSS) INDUCED BY WOUNDING AND JASMONATE TREATMENTS (CARACTÉRISATION D'UN GÈNE PUTATIF DE LA «CHALCONE SYNTHASE» CHEZ L'ÉPINETTE BLANCHE (<i>PICEA GLAUCA</i> (MOENCH) VOSS) INDUIT PAR LES BLESSURES ET LES TRAITEMENTS AUX JASMONATES)	31
RÉSUMÉ	33
ABSTRACT	33
2.1 Introduction.....	34
2.2 Materials and methods.....	36
2.2.1 Plant material.....	36
2.2.2 Jasmonate and wounding treatments.....	36
2.2.3 Probe construction, isolation and sequencing.....	37
2.2.4 DNA isolation and Southern analysis.....	39

2.2.5 Total RNA isolation and northern analysis	39
2.2.6 Hybridization conditions	40
2.3 Results and discussion	41
2.3.1 Isolation and characterization of <i>PgCHS1</i> partial cDNA clone.....	41
2.3.2 Southern hybridization analysis.....	42
2.3.3 Tissue specific expression of <i>CHS</i>	42
2.3.4 Induction of <i>CHS</i> mRNA expression by mechanical wounding and jasmonate treatments.....	43
2.4 Acknowledgments.....	46
2.5 Literature cited	47
CHAPITRE III.....	59
ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A PUTATIVE DEHYDRIN GENE FROM WHITE SPRUCE INDUCED UPON WOUNDING, DROUGHT AND COLD STRESSES (ISOLATION ET CARACTÉRISATION D'UN GÈNE PUTATIF DE DÉSHYDRINE DE L'ÉPINETTE BLANCHE INDUIT PAR LES STRESS DE BLESSURE, DE SÉCHERESSE ET DE FROID)	59
RÉSUMÉ	61
ABSTRACT	61
3.1 Introduction.....	62
3.2 Materials and methods.....	64
3.2.1 Plant material.....	64
3.2.2 Jasmonate and wounding treatments.....	64
3.2.3 Drought and cold treatments.....	65
3.2.4 cDNA library construction, screening, isolation and sequencing.....	66
3.2.5 Total RNA isolation and northern analysis	67
3.2.6 Hybridization conditions	67
3.2.7 DNA isolation and Southern.....	68
3.3 Results and Discussion	69
3.3.1 Isolation of <i>PgDhn1</i> , sequence analysis and comparison	69
3.3.2 <i>PgDhn1</i> expression in tissues of non-stressed plants.....	71
3.3.3 Effect of wounding and jasmonate treatments on <i>PgDhn1</i> transcript expression.....	72
3.3.4 Effect of drought and cold stresses on transcript accumulation.....	75
3.4 Acknowledgments.....	76
3.5 References	77

CHAPITRE IV	92
ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A COMPLEMENTARY DNA CLONE ENCODING A PUTATIVE WHITE SPRUCE GLYCINE-RICH RNA BINDING PROTEIN (ISOLATION ET CARACTÉRISATION D'UN CLONE D'ADN COMPLÉMENTAIRE CODANT POUR UNE PROTÉINE PUTATIVEMENT RICHE EN GLYCINE LIANT L'ARN CHEZ L'ÉPINETTE BLANCHE)	92
RÉSUMÉ	94
ABSTRACT	94
4.1 Introduction	95
4.2 Experimental, results and discussion	96
4.2.1 Isolation of <i>PgRNP</i> cDNA clone.....	96
4.2.2 Sequence comparison	97
4.2.3 Southern hybridization analysis.....	98
4.2.4 Organ-specific transcript expression of <i>PgRNP</i> in non-stressed plants	99
4.2.5 Effect of wounding and jasmonate treatment on transcript accumulation	99
4.2.6 Effect of drought, cold and diurnal cycle on transcript accumulation.....	101
4.3 Conclusions	102
4.4 References	116
4.5 Acknowledgments	121
CONCLUSION GÉNÉRALE	122
Liste des ouvrages cités	132

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE II

Figure 1. A. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the amplified PCR fragment of <i>PgCHS1</i> . B. Comparison of amino acid sequences of the CHS fragment from <i>P. glauca</i> (<i>Picea</i>) with other CHS proteins.	51
Figure 2. Southern analysis of <i>PgCHS1</i>	52
Figure 3. Northern blot analysis of <i>CHS</i> RNA accumulation in various tissues.	53
Figure 4. Northern blot analysis of the effect of wounding and JA treatments on <i>CHS</i> transcript expression.	55
Figure 5. Northern analysis of <i>CHS</i> mRNA accumulation following multiple wound- and JA-treatments and MJ-treatment on 2-year-old white spruce seedlings.	56
Figure 6. <i>CHS</i> mRNA accumulation in treated 2-week-old seedlings.	58

CHAPITRE III

Figure 1. A. Nucleotide sequence and predicted translation product encoded by the <i>PgDhn1</i> cDNA clone. B. Partial inferred <i>PgDhn1</i> amino acid sequence.	83
Figure 2. Comparison of inferred amino acid sequences of <i>PgDhn1</i> and dehydrins from other plant species.	84
Figure 3. Hydrophobicity of <i>PgDhn1</i> estimated according to Kyte and Doolittle.	85
Figure 4. Southern analysis of <i>PgDhn1</i>	86
Figure 5. Tissue-specific accumulation of <i>PgDhn1</i> transcript in various tissues.	87
Figure 6. A. <i>PgDhn1</i> transcript accumulation in needles of 2-year-old seedlings following a single treatment. B. Northern analysis of <i>PgDhn1</i> mRNA accumulation following multiple wound and JA treatments and MJ treatment on 2-year-old white spruce seedlings.	89
Figure 7. Northern analysis of <i>PgDhn1</i> during drought treatment of 2-year-old seedlings.	90
Figure 8. Comparison of <i>PgDhn1</i> mRNA accumulation upon several stresses of 2-week-old light grown seedlings.	91

CHAPITRE IV

Fig. 1. Nucleotide sequence and predicted translation product encoded by the <i>PgRNP</i> cDNA clone.	104
Fig. 2. Comparison of inferred amino acid sequences of <i>PgRNP</i> and glycine-rich RNP RNA binding protein from other plant species.	105
Fig. 3. Genomic Southern blot analysis of <i>PgRNP</i>	106
Fig. 4. Northern analysis of organ-specific expression of <i>PgRNP</i> in non-stressed plants.	108
Fig. 5. <i>PgRNP</i> expression in response to wounding and jasmonate treatments.	113

Fig. 6. Northern analysis of *PgRNP* during drought and cold treatments and diurnal cycle.115

CHAPITRE I

1.1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les plantes possèdent une capacité étonnante d'adaptation et de protection face aux stress environnementaux (Ryder *et al.* 1987). Toutes les plantes supérieures peuvent s'adapter, avec plus ou moins de succès, aux changements biotiques et abiotiques de leur environnement en altérant leurs procédés morphologiques, physiologiques et développementaux. Parmi les stress environnementaux, les blessures subies par la plante peuvent causer des stress extrêmement sévères allant même jusqu'à sa mort. Le terme blessure réfère globalement à un stress créé par un processus physique ou enzymatique de bris tissulaires. Lors des blessures, les dommages causés par des insectes phytophages ou par d'autres dommages mécaniques peuvent aussi faciliter l'entrée d'agents nuisibles, en exposant certains tissus normalement protégés (Pena-Cortés et Willmitzer 1995). Parmi tous les stress qu'une plante pourra subir, le stress de blessure représente donc un défi environnemental considérable, voire critique.

Les plantes répondent aux blessures en induisant une défense caractérisée par la production de plusieurs types de protéines et de métabolites secondaires, principalement mis en place dans le but de contrer la prolifération de l'agent entomologique ou pathologique. Ces réponses incluent le renforcement des parois cellulaires par le dépôt de callose, de lignine et de glycoprotéines riches en hydroxyproline, la synthèse de composés anti-microbiens comme les phytoalexines, et la production d'inhibiteurs de protéase et d'enzymes lytiques comme les chitinases et les glucanases. À l'exception du procédé de production de callose, qui implique la stimulation de la callose synthase déjà présente au niveau des membranes par le Ca^{2+} (Fink *et al.* 1987), l'induction de toutes les protéines de défense connues implique l'activation transcriptionnelle des gènes correspondants et, par

conséquent, une altération de l'expression génique chez la plante hôte blessée (Hildmann *et al.* 1992, Lamb et Dixon 1994, Pena-Cortés et Willmitzer 1995).

La protection des forêts, leur saine gestion et leur développement durable sont des préoccupations de plus en plus présentes socialement. Malgré la menace d'épidémies d'insectes et la possibilité de changements climatiques à court terme, les pressions sociologiques, écologiques et environnementales forcent en quelque sorte le développement de nouvelles approches tant du côté des techniques sylvicoles mécaniques que de celles régissant l'emploi des divers insecticides et herbicides. Des pertes importantes imputables aux insectes ravageurs et aux champignons pathogènes ont conduit à une baisse importante de la production forestière canadienne et affectent autant les niveaux économiques qu'écologiques. Un bon exemple de pertes causées par les organismes ravageurs est celui de la tordeuse des bourgeons de l'épinette, qui, durant la dernière épidémie, a causé la perte de plus de 235 millions de m³ de bois résineux au Québec seulement, soit l'équivalent d'une dizaine d'années de récolte pour l'industrie forestière (Bordeleau et Boulet 1989). Ces infestations ont provoqué la mise sur pied d'importants programmes de lutte faisant principalement appel à des insecticides chimiques et, plus récemment, à des insecticides biologiques. Puisque les politiques environnementales dictent maintenant l'abolition de l'utilisation des pesticides chimiques dans les écosystèmes, on tend maintenant à développer des approches alternatives pour la protection des forêts.

Les récents progrès dans le domaine de la biotechnologie végétale laissent entrevoir de nouvelles avenues possibles dans la lutte contre les organismes ravageurs. Une de ces tactiques est basée sur la production d'arbres transgéniques possédant des caractéristiques de résistance systémique aux organismes nuisibles. De telles plantes transformées sont déjà utilisées avec succès au niveau agricole (Estruch *et al.* 1997).

L'industrie forestière est un catalyseur très important, tant en ce qui concerne la matière première qu'au plan économique et social. Au Québec, les statistiques de mise en marché de l'industrie forestière pour la période de janvier à décembre 1997 font état de 5.75 millions de mètres cubes solides de bois (toutes essences confondues) vendus aux industries de pâtes et papiers, de sciage, de panneaux ou autres (Forêt de chez nous, 1998). À titre indicatif, le niveau de volume livré aux usines de pâtes et papiers pour le groupe sapin et épinette entre 1994 - 1997 s'échelonne entre 857 - 1217 milliers de mètres cubes solides, comparativement à 795 - 1003 et 431 - 682, respectivement pour les feuillus mélangés et le peuplier faux-tremble (Forêt de chez nous, 1998). Les conifères représentent donc une famille d'arbres économiquement importants. Parmi ceux-ci, l'épinette blanche a toujours eu une bonne part du marché. Au Québec, l'épinette blanche est l'une des essences les plus reboisées. Plus de 360 millions de semis ont été mis en terre entre 1972 et 1990, et l'objectif annuel pour l'an 2000 est de 33 millions de plants (Beaulieu *et al.* 1993). Les techniques de culture *in vitro* et de transformation génétique disponibles pour l'épinette blanche rendent cette essence particulièrement attirante pour étudier de façon plus fondamentale le comportement de certains gènes chez les conifères. De plus, sa grande vulnérabilité à la tordeuse des bourgeons de l'épinette permet d'entrevoir une utilisation des connaissances développées à plus ou moins longue échéance, et ce pour des applications tant économiques et environnementales que stratégiques au plan sylvicole. Ces connaissances permettront également d'utiliser d'une façon encore plus efficace le potentiel qu'offre l'amélioration génétique des conifères par voie transgénique, ce qui pourrait vraisemblablement se traduire par le développement d'outils biotechnologiques tels que des promoteurs possédant des caractéristiques spécifiques adaptées aux conifères. Il est donc important d'étudier le comportement de ces gènes face à divers stress et de déterminer si leur activation est modulée par les mêmes composés que ceux utilisés par les angiospermes. L'isolement, chez *Picea glauca*, de gènes ayant démontré leur importance au niveau du système de défense chez les angiospermes et, par conséquent, une homologie entre les systèmes de défense des

conifères et des angiospermes, permettra d'entrevoir et de comprendre sous différents aspects le fonctionnement du système de défense chez l'épinette blanche.

Il est possible que les mécanismes associés au système de défense face aux blessures et aux stress soient conservés parmi les espèces végétales. À titre d'exemple, il a été démontré qu'un promoteur de pomme de terre inductif par des blessures contrôlant l'expression d'un gène d'inhibiteur de protéase peut aussi induire l'expression d'un gène rapporteur à la suite d'une blessure chez des transformants stables de peuplier (Klopfenstein *et al.* 1991). De plus, la région 5' d'un promoteur inductif par blessure de peuplier a conservé son caractère inductif à la suite de l'analyse fonctionnelle de lignées de tabac transgénique (Hollick et Gordon 1993).

L'activation génique faisant suite à une blessure peut être confinée au site de la blessure elle-même. Cependant, quelques gènes sont non seulement induits localement mais aussi dans les parties distales et non endommagées de la plante (Bowles 1990). Par exemple, l'expression des ARN messagers (ARNms) du gène *pin2* (inhibiteur de protéases de type sérine groupe II) est induite par blessures de façon systémique et est détectée après 20 minutes, tout comme l'expression des ARNms détectés au site de blessure (Pena-Cortés *et al.* 1988).

Malgré leur nature divergente, plusieurs stress de nature climatique ont des liens avec les stress de blessures. Par exemple, lorsqu'une plante subit des blessures, les lésions créées deviennent un endroit propice à la perte d'eau et à l'augmentation du taux de transpiration, phénomène semblable à la déshydratation subie par les tissus lors de stress de sécheresse. Des stress de basses températures peuvent aussi engendrer des effets analogues aux blessures. En effet, le froid peut produire des dommages irréparables, souvent causés par la formation de cristaux de glace extracellulaires qui endommagent les

parois cellulaires de la plante (Palva 1994) et représentent un stress de blessures au niveau des parois.

Parmi tous les stress environnementaux auxquels les plantes sont exposées, la déshydratation reste certes le plus commun (Kiyosue *et al.* 1994). En effet, une perte d'eau occasionnée par blessures, une diminution de la conductivité du xylème causée par des agents pathogènes, un manque d'eau dans le sol, un taux d'humidité relative faible, un sol salin ou des températures élevées peuvent tous avoir un effet sur le potentiel hydrique de la plante. Ces stress se reflètent par l'apparition de symptômes typiques de déficience en eau chez celle-ci (revue par Reid et Wample 1985).

Pour s'adapter aux pertes d'eau de leur environnement, les plantes ont développé plusieurs mécanismes (Bewley *et al.* 1993) dont certains peuvent s'apparenter à la réponse aux blessures. Certains niveaux de déficit hydrique peuvent produire des dommages cellulaires irréversibles chez la plante, et la tolérance à ces divers niveaux de stress hydrique peut varier selon l'espèce et l'écotype (Bewley *et al.* 1993). Pour survivre lors d'une carence sévère en eau, une plante doit : i) avoir la possibilité de limiter les dommages lors du dessèchement à un niveau qui sera réparable; ii) garder son intégrité physiologique à l'état déshydraté et iii) être capable de mettre en place les mécanismes de réparation lors de la réhydratation pour remédier aux dommages encourus pendant le dessèchement (Bewley *et al.* 1993).

Un chevauchement partiel dans la réponse aux stress environnementaux de gel et de sécheresse semble exister (Palva 1994). Ce chevauchement des mécanismes de défense s'observe par une augmentation de la tolérance au gel découlant de l'application d'un léger stress de sécheresse (Welin *et al.* 1994). Cette analogie peut provenir du fait que la formation et la présence de glace extracellulaire abaissent le potentiel hydrique et forcent

l'eau à sortir hors de la cellule, créant ainsi une déshydratation cellulaire (Levitt 1980, Sakai et Larcher 1987, Palva 1994).

1.1.1 Perception des stress environnementaux : La signalisation cellulaire

Les plantes doivent percevoir les changements dans leur environnement pour pouvoir les combattre. Cette perception est principalement basée sur des processus de signalisation cellulaire qui permettent d'établir un lien entre les changements extérieurs perçus par la plante et la réponse intracellulaire qu'elle déploiera pour s'y adapter (Wasternack et Parthier 1997).

L'activation des gènes inductifs par blessure est vraisemblablement due à la génération d'un signal actif au site de blessure. La distribution subséquente de ce signal actif pourrait être directement responsable de l'activation de gènes, localement ou à distance. La concentration minimale requise de ce signal pour activer la transcription des gènes serait plus élevée au site de blessure et moins importante pour les gènes induits systémiquement. Quelques substances migrant sur une courte distance pourraient être responsables de l'induction locale des gènes, tandis que des substances pouvant migrer sur une plus longue distance à travers la plante pourraient moduler l'expression systémique des gènes et ainsi représenter un signal actif potentiel. Plusieurs composés organiques sont connus pour moduler l'activité de gènes induits par blessures. Ces substances ont été identifiées comme étant des signaux potentiels de la réponse aux blessures. Parmi celles-ci, l'éthylène, l'acide abscissique (ABA) et l'acide jasmonique (AJ) (revue par Pena-Cortés et Willmitzer 1995, Wasternack et Parthier 1997) retiennent l'attention d'un nombre grandissant de chercheurs dans le contexte de la transmission du signal de blessure. La systémine, un court peptide de 18 acides aminés, a aussi démontré son implication dans la signalisation lors des réponses de défense contre les blessures (Constabel *et al.* 1995).

Dans la recherche de la compréhension du mécanisme de transmission du signal du site de blessure à la plante entière, d'autres processus ont aussi été soupçonnés d'implication active, par exemple les changements de polarité membranaire qui sont les premiers effets observés chez les plantes blessées. Un signal de nature électrique et propagé à travers la plante pour l'induction du gène *pin2* ainsi qu'un signal hydraulique chez la tomate ont aussi été évoqués (revue par Pena-Cortés et Willmitzer 1995).

1.1.2 Les jasmonates

Les jasmonates réfèrent globalement à l'acide jasmonique, au méthyle jasmonate (MJ) et à leur forme conjuguée d'acides aminés. Dans certains cas, les jasmonates sont considérés comme des hormones de croissance potentielles (revue par Miyamoto *et al.* 1997). Les jasmonates sont détectés dans toute la plante, mais à des concentrations plus importantes au niveau des tissus en croissance comme les tiges, l'apex, les pointes racinaires, les fruits immatures et les jeunes feuilles (revue par Wasternack et Parthier 1997). Le niveau d'AJ dans les plantes intactes est habituellement de 10 - 100 ng par gramme de poids frais mais peut atteindre un niveau aussi élevé que 3 µg par gramme de poids frais dans certaines plantes ou organes (Mueller 1997). En fait, les jasmonates sont présents chez plusieurs espèces d'angiospermes et de gymnospermes, même si les données sur ces dernières sont moins abondantes (Sembdner et Parthier 1993, Mueller 1997).

Le MJ a tout d'abord été isolé et identifié comme composante parfumée de l'huile essentielle de *Jasminum grandiflorum* (Demole *et al.* 1962). L'AJ fut isolé un peu plus tard, en 1971, du filtrat d'une culture du champignon *Botryodiplodia theobromae* (syn. *Lasidiplodia*) (Aldridge *et al.* 1971). En plus de son implication dans les réponses environnementales, l'AJ semble jouer un rôle important dans la floraison, l'enroulement de la vrille par le toucher chez *Bryonia dioica*, la tubérisation, le mûrissement des fruits et l'abscission (revue par Farmer 1994, Koda 1997, Miyamoto *et al.* 1997, Mueller 1997).

L'AJ et le MJ sont des composés dérivés de l'acide α -linoléique (Creelman et Mullet 1997) et issus du sentier métabolique octadécanoïque (Farmer 1994). L'acide α -linoléique, un acide gras, est un constituant important des membranes de la majorité des plantes (Conconi *et al.* 1996). L'exposition des plantes aux précurseurs de l'AJ, comme l'acide α -linoléique, mène à la production d'AJ et à l'activation des gènes induits par l'AJ (Farmer et Ryan 1992, revue par Mueller 1997). L'accumulation localisée d'AJ suivant une blessure pourrait être le résultat du mélange des compartiments contenant des lipases, de l'acide linoléique des membranes et d'autres enzymes impliquées dans la synthèse de l'AJ (Creelman et Mullet 1997). Lors d'une blessure ou d'une attaque par un agent pathogène, une lipase libérerait rapidement l'acide α -linoléique des membranes pour ensuite activer la cascade enzymatique menant à la formation d'AJ (Mueller 1997).

En plus des précurseurs biosynthétiques, une variété de composés et stimuli peuvent induire la biosynthèse des jasmonates : les blessures (Sembdner et Parthier 1993, Pena-Cortés et Willmitzer 1995), les stimulations mécaniques, la systémine, les oligosaccharides dérivés des plantes et les chitosanes dérivés des parois cellulaires des champignons, la sécheresse, le traitement à l'ABA (revue par Mueller 1997) et les stress osmotiques (Lehmann *et al.* 1995). La biosynthèse d'AJ découlant de ces stimuli est rapide (entre 5 et 45 minutes), correspond à plusieurs fois son niveau de base et précède la synthèse des ARNms des JIPs (jasmonate induced protein, Weidhase *et al.* 1987) et des métabolites secondaires (revue par Mueller 1997).

Il a été démontré que l'application d'AJ à des plants de pomme de terre cause une protection locale et systémique contre le pathogène fongique *Phytophthora infestans* (Cohen *et al.* 1993). Cette protection est probablement due à l'induction des mécanismes de défense puisque les feuilles distales de la zone d'application sont aussi protégées (Schweizer *et al.* 1993). Un mutant d'*Arabidopsis thaliana* déficient en acide linoléique a été incapable d'accumuler l'AJ suivant un stress de blessure, et par le fait même incapable

d'induire les gènes normalement induits par blessure (Creelman et Mullet 1997). Cependant, un apport exogène d'AJ au mutant permet de rétablir la résistance aux organismes nuisibles, démontrant ainsi le rôle essentiel que joue l'AJ dans les mécanismes de défense (Creelman et Mullet 1997). De plus, l'AJ induit fortement l'accumulation de la protéine PIN2 (Pena-Cortés *et al.* 1992) tout comme d'autres gènes inductifs par blessure et par l'ABA dans les feuilles de pomme de terre (Hildmann *et al.* 1992). Cette réponse est similaire chez les plantes normales et chez celles déficientes en ABA, ce qui suggère que l'AJ agit en aval de l'ABA dans la cascade d'évènements menant à l'activation des gènes lors des blessures (Pena-Cortés et Willmitzer 1995).

Finalement, il a été également démontré que l'AJ peut agir comme signal dans les réponses de défense contre les dommages causés par le rayonnement ultraviolet et les stress osmotiques. Cependant, la perception de la lumière, des métaux lourds ou des stress de température ne semblent pas recourir aux jasmonates comme signal (revue par Wasternack et Parthier 1997).

1.1.3 Le mécanisme de signalisation des jasmonates

Les modes de régulation génique par les jasmonates demeurent encore inconnus (Farmer 1994). Il n'y a toujours pas d'évidence concernant un ou des récepteur(s) possible(s) de jasmonate (Farmer 1994). Ce récepteur et son interaction avec les jasmonates auraient pour effet de modifier les niveaux de transcription et de traduction de certains gènes ainsi que d'autres réponses physiologiques obtenues par la médiation de l'AJ (Creelman et Mullet 1997). La systémine, qui est un inducteur de la production d'AJ, est dérivée d'un polypeptide plus grand appelé prosystémine. Ce polypeptide ressemble aux polypeptides hormonaux et à des facteurs de croissance chez les animaux (revue par Bergey *et al.* 1996). Il a été démontré que la systémine active une signalisation lipidique en cascade semblable à celle des animaux (Bergey *et al.* 1996). Chez les animaux, l'interaction

entre les macrophages et les pathogènes déclenche la libération du polypeptide «cytokine tumor necrosis factor α » (TNF α) qui circule dans le sang et atteint les cellules proximales. Le TNF α interagit avec les cellules du cortex cérébral pour déclencher l'activation d'une phospholipase A2 qui relâchera l'acide arachidonique des membranes plasmiques. L'acide arachidonique est par la suite converti en prostaglandines qui combattent l'infection par le déclenchement d'une fièvre. Le TNF α active également les réactions inflammatoires. Chez les plantes qui ne synthétisent pas d'acide arachidonique, l'acide linoléique est libéré en réponse au signal peptidique de blessure (la systémine, qui est proposée comme étant la molécule transportée à travers le phloème aux cellules éloignées où elle activerait une lipase intracellulaire). L'acide linoléique libéré est ensuite transformé en acides phytodiénoïque et jasmonique, qui sont de puissants activateurs des gènes de défense de la réponse systémique à la blessure. Les similitudes entre les animaux et les plantes dans leur stratégie de communication intercellulaire par l'entremise de composés lipidiques ainsi que la composition relativement semblable des prostaglandines et des acides phytodienoïque et jasmonique suggèrent que ces deux systèmes se soient développés à partir d'un ancêtre commun il y a plusieurs centaines de millions d'années (Bergey *et al.* 1996).

Une variété d'effets pléiotropiques peuvent être attribués à l'application exogène des jasmonates, comme l'induction et/ou l'inhibition de procédés physiologiques ou biochimiques étendus à la plante entière ou restreints spécifiquement à certains organes (revue par Wasternack et Parthier 1997). En fait, quelques-uns de ces effets sont semblables à ceux provoqués par l'ABA (Sembdner et Parthier 1993).

Ainsi donc, les jasmonates influencent l'expression génétique à plusieurs niveaux : l'activation et la transcription de gènes, la maturation post-transcriptionnelle des ARNs et la stabilité des transcrits, la traduction des transcrits en protéines et les étapes post-traductionnelles incluant les modifications et la dégradation des protéines (Reinbothe *et al.*

1994). Lorsque les seconds messagers sont libérés lors d'une attaque par des organismes nuisibles, les jasmonates semblent initier un programme complet de défense qui comporte la synthèse de plusieurs protéines de défense, les JIPs, suivi d'une diminution générale de la biosynthèse des protéines de la plante comme celles impliquées dans l'assimilation photosynthétique du carbone (Reinbothe *et al.* 1994). Il a été proposé que les acides aminés relâchés lors de la protéolyse des protéines chloroplastiques soient réutilisés pour la formation des JIPs (Reinbothe *et al.* 1993a). Tel que mentionné, un apport exogène de jasmonates permet donc l'induction de plusieurs types de JIPs (Sembdner et Parthier 1993, Reinbothe *et al.* 1994). Parmi ceux-ci, des gènes aussi variés que le gène du cytochrome P450 (Suzuki *et al.* 1996, Ohta *et al.* 1997), la «phenylalanine ammonia lyase» (PAL) (Gundlach *et al.* 1992), la «chalcone synthase» (CHS) (Dittrich *et al.* 1992), les inhibiteurs de protéases (Ryan 1992), les protéines de stockage végétatif, les protéines inactivant les ribosomes, les extensines, les protéines riches en glycine et celles riches en hydroxyproline (Farmer 1994), en plus des protéines ayant des fonctions encore inconnues (revue par Lehmann *et al.* 1995). Des enzymes impliquées dans le sentier métabolique des composés phénylpropanoïdes telles la PAL et la CHS ont été étudiées en détail pour leurs rôles dans la réponse aux blessures. Cet aspect sera couvert dans la prochaine section.

Les jasmonates ne stimulent pas tous les gènes induits par blessure, mais peuvent être des régulateurs importants pour plusieurs d'entre eux, et ce à travers tout le règne végétal. Inversement, ce ne sont pas tous les gènes induits par les jasmonates qui sont induits par les stress de blessure (Farmer 1994).

Comme il en a été fait mention précédemment, l'AJ agit également comme signal à la suite des dommages causés par le rayonnement ultraviolet. L'accumulation subséquente d'anthocyanine sous l'effet de l'AJ peut conférer aux plantes illuminées une protection contre les excès d'irradiation (revue par Creelman et Mullet 1997). Chez l'orge, l'effet le

plus remarquable du MJ est la répression de la synthèse de la majorité des protéines déjà existantes (Weidhase *et al.* 1987). Même si la population d'ARNms (incluant ceux de la petite sous-unité de rubisco, qui est l'enzyme fixant le CO₂ dans la première étape de la photosynthèse et de la CAB «chlorophyll *a/b* binding protein») est conservée dans les tissus foliaires de l'orge soumis à un traitement au MJ, la plupart de ces ARNms ne sont plus traduits en protéines, contrairement aux témoins qui le sont toujours (Müller-Uri *et al.* 1988, Reinbothe *et al.* 1993a, b). Un déplacement de 35 bases obtenu par une maturation alternative des transcrits dans les ARNms de la grande sous-unité de rubisco des plants traités au MJ a été observé, ce qui se traduirait par un changement dans la structure secondaire du transcrit et préviendrait ainsi la capacité des ribosomes à initier leur traduction (Sembdner et Parthier 1993).

Les vapeurs de MJ contenues dans l'air peuvent également induire l'expression de gènes de défense menant par exemple à l'accumulation d'inhibiteurs de protéases (Farmer et Ryan 1990). Il est impressionnant de constater que les vapeurs de MJ permettent à elles seules une induction semblable à celle observée lors d'une blessure ou de l'attaque par des agents nuisibles (Farmer et Ryan 1990).

Les jasmonates agiraient également de concert avec d'autres hormones, comme par exemple l'éthylène (revue par Wasternack et Parthier 1997), pour induire les gènes impliqués dans les mécanismes de défense (Xu *et al.* 1994). L'acide salicylique est un inhibiteur de la synthèse de l'AJ et de sa capacité à induire les gènes impliqués dans les mécanismes de défense chez les plantes (Pena-Cortés *et al.* 1993, Doares *et al.* 1995). Ceci pourrait permettre à la plante de moduler l'induction des gènes par l'entremise de l'acide salicylique ou par l'AJ lors de sa réponse suivant l'attaque par des organismes ravageurs, dans la cinétique de sa réponse, ou de spécifier sa réponse contre un ravageur particulier.

Finaleme^{nt}, l'ABA, au même titre que l'AJ, a été associé à la modification de l'expression génique par les stress de blessures chez diverses espèces de plantes (Staswick 1992). L'un des effets les plus constants est que le traitement par l'AJ induit des réponses similaires à celles observées par un traitement à l'ABA chez les plantes. De plus, plusieurs protéines induites par l'ABA peuvent être observées suivant un traitement à l'AJ (Weidhase *et al.* 1987).

1.2 La «chalcone synthase» et la réponse aux stress

Les rôles des composés phénylpropanoïdes sont très diversifiés. Ils sont impliqués au niveau des pigments floraux, des tissus foliaires et des interactions plantes-pathogènes (Hahlbrock et Scheel 1989). Il existe beaucoup d'informations sur le mode de régulation et d'expression des gènes impliqués dans la synthèse de composés phénylpropanoïdes, incluant la régulation et l'expression de ces gènes à la suite de blessures (van der Meer *et al.* 1993).

La «chalcone synthase» (CHS, EC 2.3.1.74) a été isolée et caractérisée pour la première fois chez *Petroselinum hortense* (Kreuzaler 1979). La CHS catalyse la première réaction de la biosynthèse des flavonoïdes et est également l'enzyme-clé de cette biosynthèse (Hahlbrock et Scheel 1989). La CHS est de loin la protéine la plus abondante de ce sentier biosynthétique (revue par Hahlbrock et Scheel 1989). L'abondance de l'enzyme est expliquée par le besoin de compenser sa faible capacité catalytique (Hahlbrock et Scheel 1989). La purification à divers degrés de la CHS provenant de plantes non-stressées consiste en une abondance relative de molécules catalytiquement inactives et en une petite fraction d'enzymes démontrant une faible efficacité catalytique (Hahlbrock et Scheel 1989). Une augmentation de la transcription et de la traduction pendant des périodes de stress peut donc assurer aux cellules l'atteinte du niveau désiré d'enzymes actives (Christie *et al.* 1994).

Les flavonoïdes représentent une classe importante de métabolites secondaires chez les plantes, parmi lesquels les anthocyanines sont les plus visibles en raison de la grande variété de couleurs associée à leur présence dans les structures florales (Holton et Cornish 1995). Les anthocyanines et les autres flavonoïdes peuvent aussi être des répulsifs alimentaires et servir de protection contre les dommages causés par les rayons ultraviolets (Holton et Cornish 1995). Les gènes requis pour la biosynthèse des flavonoïdes sont régulés de façon spécifique dans les tissus durant le développement de la plante ainsi que par une variété de perturbations environnementales incluant la lumière bleue et ultraviolette, les blessures, la présence de substances fongiques et l'infection par des pathogènes fongiques et bactériens (revue par Kubasek *et al.* 1992). Certaines molécules définies incluant des polysaccharides, les éliciteurs peptidiques ou les métabolites comme l'acide arachidonique, le glutathion et l'acide salicylique peuvent aussi modifier la régulation de ces gènes (Ebel et Cosio 1994). L'AJ peut modifier l'activité transcriptionnelle des gènes de ce sentier biosynthétique. Ce sujet sera discuté plus longuement dans les prochaines sections.

1.2.1 Structure génique

La CHS est présente chez plusieurs espèces de plantes, incluant les conifères (Tropf *et al.* 1994). La CHS peut être présente sous forme multigénique ou monogénique. *Phaseolus vulgaris* contient une famille de six à huit gènes (Ryder *et al.* 1987, Stermer *et al.* 1990), *Petunia hybrida* de huit à dix gènes (Koes 1987, 1989a, b), cinq gènes chez l'hybride *Juglans nigra* x *Juglans regia* (cité dans El Euch *et al.* 1998) tandis que *Antirrhinum majus* (Lipphardt *et al.* 1988), *Zea mays* (Wienand *et al.* 1987) et *Arabidopsis thaliana* (Kubasek *et al.* 1992) possèdent un gène unique. La structure et l'organisation génique des *chs* chez les conifères sont très peu documentées. La présence de *chs* a cependant été observée chez l'épinette noire (communication personnelle R. Rutledge, Service Canadien des Forêts) et *Pinus sylvestris* (Fliegmann *et al.* 1992). L'étude de Baker et White (1996)

démontre la présence de plusieurs membres de la famille *chs* chez *Picea glauca*, *Picea sitchensis*, *Pinus lambertiana*, *Pinus monticola*, *Abies procera*, *Pseudotsuga menziesii*, *Taxus brevifolia* et *Thuja plicata*. Cependant, le nombre exact de membres de la famille *chs* n'a pu être évalué puisque la sonde utilisée ne pouvait pas faire la distinction entre les fragments provenant de la *chs* et ceux de la «stilbene synthase» (Baker et White 1996).

1.2.2 Régulation génique de la CHS par différents stress

La *chs* a été étudiée de façon exhaustive chez plusieurs espèces végétales, mais plus particulièrement chez *P. vulgaris*. Chez le tabac, les gènes de la *chs* ne sont pas induits par les stress (Schmid *et al.* 1990). Cependant, dans le tabac transgénique, le promoteur *chs8* de la fève est activé par blessures et par un éliciteur dans une zone bien définie, adjacente au site de stress. Cette activation du promoteur *chs8* suggère que le mécanisme de signalisation a été conservé pour l'induction des gènes de défense avant l'évolution ayant mené à la composition chimique différente des phytoalexines chez les légumineuses et les solanacées (Schmid *et al.* 1990). Ce promoteur contient également un élément *cis* requis pour établir le contrôle temporel et spatial de la biosynthèse des flavonoïdes durant le développement, et en réponse à divers stimuli environnementaux (Schmid *et al.* 1990).

Le traitement d'une suspension cellulaire de *P. vulgaris* avec un éliciteur fongique active plusieurs gènes et, conséquemment, mène à l'accumulation de plusieurs transcrits différents de la *chs*. La blessure et l'infection de tissus d'hypocotyle activent aussi plusieurs gènes *chs* avec des différences marquées dans le patron d'accumulation des transcrits par les deux traitements (Ryder *et al.* 1987). L'augmentation du taux de synthèse d'enzyme peut être observée à l'intérieur de 20 minutes de traitement avec un éliciteur, le maximum étant atteint dans les trois à quatre heures suivant l'élicitation. Cette rapidité d'induction dans la synthèse d'enzyme chez des cellules traitées avec un éliciteur implique que cet effet ne soit pas indirect, mais qu'il constitue plutôt une composante

rapide dans la séquence des événements entre la liaison de l'éliciteur et un éventuel récepteur de la plante (Larkin 1981). L'inoculation par des spores du champignon *Colletotrichum lindemuthianum* de l'hypocotyle de *P. vulgaris* mène à une augmentation d'ARNm de la *chs* plus prononcée et plus rapide au site d'inoculation que dans les tissus éloignés du site initial d'infection (Cramer *et al.* 1985).

Les interactions symbiotiques entre les racines de *Medicago truncatula* et *Glomus versiforme* par un champignon mycorhizien sont aussi caractérisées par l'induction de transcrits de la *chs* se produisant spécifiquement dans les cellules contenant les arbuscules (Harrison et Dixon 1993, 1994).

Dans une autre perspective, la *chs* peut être induite par le froid chez le maïs (Christie *et al.* 1994), par la lumière bleue et par une lumière blanche à très haute intensité chez *Arabidopsis thaliana* (Feinbaum et Ausubel 1988, Feinbaum *et al.* 1991), et par certains processus de juvénalisation chez le noyer (Claudot *et al.* 1993). Chez *A. thaliana*, l'accumulation des ARNms de la *chs* en réponse au froid ou à une infiltration bactérienne est dépendante de la lumière (Leyva *et al.* 1995).

Ainsi donc, l'implication des jasmonates dans le sentier des phénylpropanoïdes et des flavonoïdes a déjà reçu des preuves substantielles. Sous l'effet de l'AJ, l'accumulation d'anthocyanine découlant du sentier de synthèse des flavonoïdes confère aux plantes une protection contre les excès d'irradiation (revue par Creelman et Mullet 1997). L'AJ peut induire la transcription des gènes *chs* et *pal*, suggérant donc qu'il pourrait aussi être un élément dans la transmission du signal d'éliciteur fongique dans le sentier des phénylpropanoïdes (Lamb et Dixon 1994). L'activité de la PAL augmente rapidement après l'addition de MJ à une suspension cellulaire de *Lithospermum erythrorhizon* (Mizukami *et al.* 1993). Chez le persil et le tabac transgénique, l'AJ et le MJ induisent fortement l'expression des transcrits de la 4-coumarate:CoA ligase, une enzyme du sentier

des phénylpropanoïdes. Cette accumulation ressemble partiellement à la réponse observée avec un éliciteur. Ce résultat supporte l'hypothèse d'un rôle pour les jasmonates dans la transmission du signal, au niveau de l'expression des gènes du sentier des phénylpropanoïdes, et ce dans le cadre de la stratégie de défense pour réagir aux blessures (Ellard-Ivey et Douglas 1996).

Chez les conifères, le premier gène de *chs* à avoir été cloné provient de *Pinus sylvestris*. L'expression de la CHS est observée chez les plantules de *P. sylvestris*. Son activité enzymatique est également induite à la suite d'une blessure au niveau de l'hypocotyle et de l'infiltration subséquente d'une solution d'extrait de levure. Cette induction est marquée, après 16 heures de traitement, par l'augmentation des flavonols tels que la naringénine, la pinocembrine et le dihydrokaempférole (Fliegmann *et al.* 1992). Chez *Picea glauca*, les blessures et les jasmonates augmentent le niveau de transcrits de la CHS et cette accumulation semble être modulée par la lumière (chapitre II).

D'autres gènes du sentier des phénylpropanoïdes sont aussi impliqués dans la réponse aux blessures chez les conifères. Par exemple, l'activité enzymatique d'une isoenzyme particulière de la PAL augmente lors de l'élicitation de cellules en suspension de pin gris avec une préparation de parois cellulaires de *Thelephora terrestris* Fr. (Campbell et Ellis 1992). L'élicitation d'une suspension cellulaire de *Picea abies* avec une préparation de parois de *Rhizosphaera kalkhoffii* entraîne une augmentation rapide de l'activité spécifique de la PAL ainsi que d'autres enzymes impliquées dans la synthèse de la lignine (Messner et Boll 1993).

1.3 Les mécanismes de résistance aux stress hydriques : Le cas des déshydrines

Plusieurs des protéines induites lors de la déshydratation causée par la sécheresse, la salinité ou un gel extracellulaire appartiennent à la famille des déshydrines. Dans un autre

contexte, l'expression de ces protéines lors du développement de la semence concerne plutôt des LEAs (pour «late embryogenesis abundant protein»), tandis que les RABs (pour «responsive to ABA») sont plutôt associés aux polypeptides induits lors de traitements à l'ABA. Néanmoins, tous les polypeptides LEA et RAB ne sont pas nécessairement des déshydrines (Dure *et al.* 1989, Pla *et al.* 1991). Des polypeptides reliés aux déshydrines ont reçu des noms aussi variés que les stress ou les espèces pour lesquels ils ont été étudiés. On retrouve donc, par exemple : CAS18 (cold acclimation-specific, Wolfrain *et al.* 1993), COR47 (Cold regulated, Gilmour *et al.* 1992), LC30 (*Lycopersicon chilense*, Chen *et al.* 1993), TAS14 (Tomato ABA and salt inducible, Godoy *et al.* 1990) et WCS120 (wheat cold and salt inducible, Houde *et al.* 1992).

Un groupe de déshydrines associé à la famille des gènes *lea* D11 ou *lea* du groupe II (Chandler *et al.* 1993) aide à prévenir les dommages cellulaires causés lors de la dessiccation en se liant vraisemblablement à des macromolécules comme les protéines et les acides nucléiques et prévenant ainsi leur dénaturation (Dure *et al.* 1989, Dure 1993a, Wisniewski *et al.* 1996). Les déshydrines et les LEAs pourraient aussi jouer un rôle dans la récupération des radicaux libres, la séquestration d'ions, l'inhibition de la formation de cristaux de glace et la stabilisation de la structure native des protéines ou leur renaturation (Dure 1993 a, b).

Il serait possible que les déshydrines aident les protéines contre la dénaturation ou qu'elles puissent soutenir la surface cytoplasmique et nucléaire des membranes pour éviter leur déformation (Close *et al.* 1993b). Ceci pourrait s'opérer par l'hydratation de la région hydrophile de la déshydrine, qui résulterait en la formation d'une enveloppe organisée d'eau qui, spécialement en présence de solutés compatibles, agirait par un mécanisme d'exclusion préférentielle pour renaturer une protéine partiellement dénaturée ou empêcher une plus ample dénaturation (Close 1996). Leurs groupements hydroxyles «solubiliseraient» en quelque sorte les structures de surface à travers des interactions de

type polaire, leur procurant ainsi une certaine stabilisation (Danyluk *et al.* 1998). Cette solubilisation serait supérieure à celle que procurent les sucres puisque ces protéines peuvent s'étaler sur une plus grande surface et ont moins tendance à cristalliser (Baker *et al.* 1988). Jusqu'à présent, toutes les observations supportent l'hypothèse d'un rôle des déshydrines comme surfactants capables d'inhiber la coagulation de plusieurs macromolécules et de préserver leur intégrité structurale (Close 1997).

En ce qui concerne les gènes *lea*, le mode d'action des protéines correspondantes dans les mécanismes de tolérance à la dessiccation est basé sur quatre observations importantes : i) la majorité de ces gènes sont exprimés au moment où l'embryon devient tolérant à la dessiccation, ii) la majorité de ces gènes sont induits prématurément par l'ABA, une hormone impliquée dans la réponse aux stress hydriques, iii) les transcrits correspondants disparaissent lorsque les embryons ou les graines sont imbibés d'eau et en germination, et iv) plusieurs de ces gènes inductifs par la dessiccation des semences peuvent également être induits dans les tissus végétatifs par un stress hydrique (Delseny *et al.* 1994).

Bien que les déshydrines soient associées de façon générale au phénomène de tolérance à la dessiccation ainsi qu'à l'adaptation au froid et à la déshydratation, elles n'en sont pas les seuls intervenants. Selon Blackman et coll. (1991), les déshydrines seraient insuffisantes pour prévenir les dommages causés par la dessiccation mais travailleraient de concert avec d'autres composés et processus cellulaires.

1.3.1 L'implication des déshydrines dans la réponse aux stress

Les arbres étant des espèces pérennes, des mécanismes d'adaptation aux stress hydriques et aux températures froides sont indispensables, surtout chez les conifères qui ne perdent pas leurs aiguilles. Close et coll. (1993a) ont détecté la présence des déshydrines chez plusieurs espèces monocotylédones et dicotylédones ainsi que chez les gymnospermes

Pinus edulis Engelm. et *Ginkgo biloba* L. en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre un peptide synthétique représentant la séquence conservée KIKEKLPG des déshydrines. Cette étude a permis de démontrer la présence dans les graines de plusieurs polypeptides présentant des similarités immunologiques avec cette séquence conservée et possédant des tailles variant entre 16 et 84 kD pour *P. edulis* et entre 24 et 110 kD pour *G. biloba*.

Les études concernant les arbres ont ensuite porté principalement sur la présence des déshydrines en fonction de la tolérance et de la susceptibilité des semences à la dessiccation. Des protéines similaires aux déshydrines ont été identifiées dans les graines sensibles à la dessiccation de *Quercus robur* L., *Castanea sativa* L., *Acer pseudoplatanus* L. et *Acer saccharinum* L., ainsi que dans les semences tolérantes à la dessiccation d'*Acer platanoides* L. (Finch-Savage *et al.* 1994). Des protéines diverses ont été détectées avec l'anticorps décrit par Close *et coll.* (1993a) chez des graines tolérantes à la dessiccation de cinq espèces d'arbre et chez des semences sensibles d'une autre espèce (Finch-Savage *et al.* 1994). La présence de déshydrine n'est donc pas suffisante pour conférer aux semences la tolérance à la dessiccation et leur présence/absence ne peut être utilisée comme critère absolu d'identification de semences tolérantes (Finch-Savage *et al.* 1994).

Des tentatives pour établir un lien entre la capacité d'adaptation au froid et le génotype des arbres à feuillage caduque et de ceux à feuillage persistant ont aussi été réalisées. Chez le pêcher, l'accumulation d'une déshydrine est supérieure chez le génotype à feuillage caduque que chez celui à feuillage persistant (Arora et Wisniewski 1994). Chez *Prunus persica* L. Batsch, les génotypes des arbres à feuillage persistant et à feuillage caduque diffèrent significativement en fonction de leur habileté à s'acclimater au froid et dans l'expression saisonnière des transcrits et des protéines des déshydrines (Artlip *et al.* 1997). Les déshydrines de huit espèces ligneuses possèdent également un patron

d'accumulation qui varie selon les saisons avec certaines protéines exprimées de façon constitutive (Wisniewski *et al.* 1996).

D'autres études portent plus spécifiquement sur la réponse des déshydrines en fonction des stress. Par exemple, chez *Populus popularis*, une déshydrine est exprimée en faible quantité chez des feuilles témoins et s'accumule à un plus haut niveau chez des feuilles ayant subi un stress hydrique (Pelah *et al.* 1997). Chez le citronnier, une déshydrine est induite lors de l'acclimatation au froid et réprimée par la sécheresse et par l'immersion totale du pot de la plante dans l'eau (Cai *et al.* 1995). Chez *Q. robur*, la quantité de déshydrine augmente lors du développement de la graine et les transcrits sont induits par la dessiccation et l'ABA (Finch-Savage *et al.* 1994).

Jusqu'à présent, les seules séquences de déshydrine isolées chez les conifères proviennent du sapin Douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Les ARNm de la DF65 sont présents dans les graines dormantes et disparaissent après une heure d'imbibition. Un traitement au froid pour briser la dormance des semences (stratification) augmente le niveau de transcrits après huit heures à 4°C et atteint un niveau maximal après une semaine. Chez les graines incubées à 20°C en imbibition depuis quatre heures, le niveau de transcrits diminue de 50% comparativement à celui des semences dormantes. Cette expression continue de diminuer jusqu'à devenir non détectable. Chez DF65, la séquence consensus KIKEKLPG n'est pas entièrement conservée et le motif DEYGNP ainsi que la série de sérines sont absents (Jarvis *et al.* 1996).

À partir d'homologie de séquences, un gène possédant certaines caractéristiques des déshydrines a été isolé d'une banque d'ADN complémentaires (ADNc) de *Picea glauca* produite à partir d'ARNs isolés d'aiguilles blessées et traitées aux jasmonates. La séquence protéique de ce clone de déshydrine (*PgDhn1*, pour *Picea glauca* «dehydrin») est très hydrophile et possède quatre copies de la séquence consensus riche en lysine,

dont deux sous forme conservée et deux autres sous forme moins bien conservée. *PgDhn1* possède une série de huit résidus sérine, mais ne possède pas la séquence DEYGNP. Les transcrits *PgDhn1* sont induits par les stress de blessure, la sécheresse, le froid ainsi que par l'AJ et le MJ (chapitre III).

Malgré les divergences évolutives existant entre les plantes supérieures, l'existence d'un clone d'ADNc possédant les caractéristiques communes des déshydrines chez *Picea glauca* permet d'entrevoir que les mécanismes de défense dans lesquels les déshydrines sont impliquées chez les angiospermes sont aussi conservés chez les conifères. Les connaissances touchant l'acclimatation des conifères aux stress de sécheresse et la réponse génique induite chez ceux-ci sont peu nombreuses. Parmi les travaux portant sur ce sujet, Mayne et coll. (1996) rapportent l'expression différentielle d'une «S-adenosylmethionine synthase» chez des semis de *Pinus banksiana* Lamb.

L'induction des déshydrines à la suite d'une blessure a été très peu étudiée. Les données relatives aux blessures proviennent d'études portant principalement sur les stress de sécheresse ou d'acclimatation au froid, par exemple chez le maïs (Goday *et al.* 1994b) et le blé (Danyluk *et al.* 1994). En fait, les déshydrines ont surtout été étudiées en réponse aux stress hydriques, à la dessiccation ou à la sécheresse chez les espèces annuelles dont *Arabidopsis thaliana* (Lang et Palva 1992, Nordin *et al.* 1993, Goday *et al.* 1994b, Kiyosue *et al.* 1994), *Vicia faba* (Shen *et al.* 1995), *Lathyrus sativus* (Sinha *et al.* 1996), le blé (Labhili *et al.* 1995), l'orge (Grossi *et al.* 1995) et le sorgho (Wood et Goldsbrough 1997). Le froid induit également l'expression des déshydrines chez différentes plantes annuelles comme *Arabidopsis thaliana* (Lang et Palva 1992, Nordin *et al.* 1993, Kiyosue *et al.* 1994), l'orge (Grossi *et al.* 1995) et le blé (Houde *et al.* 1992, Danyluk *et al.* 1994). Il existe chez le blé une corrélation entre l'augmentation de la transcription des déshydrines et le traitement au froid. Cette augmentation est caractéristique des génotypes plus résistants au gel (Houde *et al.* 1992, Danyluk *et al.* 1994).

Un même gène de déshydrine peut être induit par plusieurs types de stress. Par exemple, chez le blé, une augmentation transcriptionnelle est observée lors de stress hydriques, de l'acclimatation au froid, de l'application d'ABA, de l'augmentation subite de température, de l'exposition à un milieu salin et lors de blessures (Danyluk *et al.* 1994). Chez la tomate, l'induction transcriptionnelle de *tas14* fait suite à un stress osmotique ou à un traitement à l'ABA (Godoy *et al.* 1994) et n'est pas modifiée par le froid ou la blessure (Godoy *et al.* 1990). Chez *Ricinus communis*, l'ABA, les stress hydriques et la dessiccation induisent la synthèse des déshydrines, tandis que l'osmolarité, la salinité et le froid induisent un groupe différent de polypeptides (Han et Kermodé 1996).

L'étude de promoteurs de certains gènes de déshydrine a permis de mettre en évidence le fait que la régulation de l'expression de ces gènes s'effectue principalement au niveau de la transcription. L'étude du promoteur d'un gène *lea* du groupe II dans une culture racinaire d'*Arabidopsis thaliana* a démontré que l'expression du gène est modérément stimulée par l'ABA, les blessures, le froid et la déshydratation (Rouse *et al.* 1996). Une région du promoteur du gène *dhn7* (dhn pour «dehydrin») de l'orge est médiatrice de la transcription induite par l'ABA (Robertson *et al.* 1995). L'absence de transcrit dans les feuilles déshydratées chez le mutant *aba-1* du maïs, déficient au niveau de la synthèse d'ABA, indique que l'expression des déshydrines est dépendante de l'augmentation d'ABA qui se produit normalement lors de la déshydratation (Godoy *et al.* 1994b). Il existe cependant des exemples où l'expression des déshydrines face à certains stress peut être médiée ou non par l'ABA (Nordin *et al.* 1993).

Ainsi donc, la dessiccation, les stress osmotiques et la sécheresse provoquent l'accumulation de l'ABA et de l'AJ dans les tissus. Il est donc possible que ces hormones soient aussi impliquées dans la modulation des déshydrines chez les conifères. L'effet de l'AJ ainsi que l'effet de certains stress au niveau de l'activité transcriptionnelle de la

PgDhn1 ont été étudiés chez l'épinette blanche dans un contexte plus large de compréhension de la signalisation cellulaire lors de la perception de stress (chapitre III).

1.3.2 Composantes structurales des déshydrines

La famille des déshydrines est représentée par des membres de tailles très variées, les polypeptides pouvant varier de 82 à 575 acides aminés (Close 1997). Elles peuvent se retrouver dans le cytoplasme et le noyau de différents types de cellules, bien que leur présence dans les noyaux ne soit pas universelle (Close 1997), ainsi que près des membranes plasmiques (Danyluk *et al.* 1998). De façon générale, les déshydrines ne possèdent pas de tryptophane ni de cystéine, elles sont très hydrophiles, demeurent solubles à 100°C (Close *et al.* 1989) et possèdent une petite séquence «leader» hydrophobe d'environ dix acides aminés (Cai *et al.* 1995). Les déshydrines sont caractérisées par un motif conservé d'acides aminés DEYGNP et d'une séquence riche en résidus lysine (KIKEKLPG) souvent présente en plusieurs copies (Close *et al.* 1993a, b; Dure 1993b). Cette dernière séquence riche en lysine fait partie intégrante d'une séquence plus large de 15 acides aminés riche en résidus lysine (EKKGIMDKIKEKLPG), nommée le segment K (Close 1996). Une série de résidus sérine est aussi retrouvée chez plusieurs déshydrines.

1.3.2.1 Le segment riche en lysine

Les déshydrines sont caractérisées par le segment K. La fréquence de ce segment, qui se retrouve dans la portion carboxy-terminale, peut varier de un à onze (Close *et al.* 1993b). De façon générale, il y a un haut niveau de conservation dans ce motif, où plusieurs des positions sont invariables et où la majorité des variations maintiennent la charge ou l'hydrophobicité. Cette caractéristique pourrait permettre la conservation de sa nature

amphipatique et la distribution de sa charge pour le maintien du rôle biochimique des déshydrines (Dure 1993b, Close 1996, Close 1997).

1.3.2.2 La série de résidus sérine

Plusieurs déshydrines contiennent une série de résidus sérine. Les acides aminés de ce segment peuvent être phosphorylés (Godoy *et al.* 1994a, Godoy *et al.* 1994). Chez le maïs, la région riche en résidus sérine de RAB 17 s'est avérée un site de phosphorylation par la caséine kinase II (Plana *et al.* 1991). Chez la tomate, TAS14 est phosphorylée par une caséine kinase II et une protéine kinase dépendante de l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique, Godoy *et al.* 1994). La série de résidus sérine se situe du côté N-terminal de la série répétée riche en résidus lysine à l'exception de COR19 et COR11 du citronnier, où elle est localisée dans la partie C-terminale (Cai *et al.* 1995). Cette phosphorylation aurait un rôle à jouer avec la liaison d'un peptide signal de localisation nucléaire (Godoy *et al.* 1994b).

1.3.2.3 Le motif DEYGNP et autres caractéristiques

D'autres motifs conservés sont aussi présents chez la majorité des déshydrines, comme par exemple le motif (V/T)DEYGNP, qui est situé près de la région amino-terminale de la protéine (Close 1996). D'autres régions moins bien conservées peuvent aussi être distinguées, tels des segments glycine-thréonine qui se répètent, des régions répétées en tandem riches en glycine situées entre les segments riches en lysine et/ou du côté amino-terminal de la séquence DEYGNP (Close *et al.* 1993b).

La présence de la série de résidus sérine, du motif DEYGNP et d'autres caractéristiques spécifiques sont fréquemment observées chez les déshydrines, mais ne peuvent être

considérées comme des caractéristiques fondamentales de toutes les déshydrines (Close *et al.* 1993b).

Il n'y a pas de règle générale concernant le nombre de copies de gène ou la structure et l'organisation génique des déshydrines à l'intérieur des génomes. Chez l'orge, le génome contient au moins 10 déshydrines (Close et Chandler 1990). Il pourrait exister deux déshydrines chez le maïs (Villardell *et al.* 1990). En 1997, Close rapporta que depuis 1988, 647 séquences protéiques complètes de déshydrines étaient devenues disponibles chez les angiospermes comparativement à trois chez les gymnospermes (Close 1997). Les séquences de gymnospermes proviennent de l'étude de Jarvis *et al.* (1996) portant sur le sapin Douglas. Différents clones d'ADNc codant pour différents groupes de *lea* ont été isolés. Les trois clones de Jarvis *et al.* (1996) et le clone *PgDhn1* de cette thèse représentent les seules séquences connues chez les gymnospermes et permettent d'entrevoir que les déshydrines font partie d'une petite famille de gènes chez les conifères (chapitre III).

1.4 Les protéines riches en glycine liant l'ARN

Les protéines riches en glycine (GRPs) forment une des grandes classes de protéines membranaires chez les plantes (revue par Showalter 1993). L'expression des GRPs peut être spécifique à un tissu (Quingley *et al.* 1991, de Oliveira *et al.* 1993) ou être régulée ontogénétiquement (Lei et Wu 1991, de Oliveira *et al.* 1993). Les GRPs peuvent être synthétisées pour faire face à une variété de stimuli externes comme les infections virales (van Kan *et al.* 1988; Fang *et al.* 1991), les blessures (Condit et Meagher 1986, Keller *et al.* 1988), les stress hydriques (de Oliveira *et al.* 1990) et l'application d'acide salicylique (Kaldenhoff et Richter 1989).

Des GRPs ne possédant pas de peptide signal dans leur séquence et ne jouant pas de rôle structural dans la cellule ont été identifiées chez les plantes (Carpenter *et al.* 1994). Ces protéines riches en glycine doivent être distinguées des protéines membranaires, montrant des différences significatives dans leur structure et leur patron d'accumulation d'ARNm (Crétin et Puigdomènech 1990). Ces GRPs non structurales sont plus spécifiquement nommées protéines riches en glycine liant l'ARN (glycine-rich RNA binding protein), protéines à RNP-CS (ribonucleoprotein consensus protein) ou protéines RRM (RNA recognition motif).

Même si les fonctions cellulaires des protéines RNP riches en glycine demeurent incertaines, un rôle relié au stress par une interaction avec des molécules d'ARN a été proposé (Carpenter *et al.* 1994) ainsi qu'un rôle dans la maturation des pré-ARNs ribosomiques (Albà et Pagès 1998). Les protéines RNP sont impliquées dans le contrôle de l'expression génétique au niveau de la maturation, du transport et de la localisation cellulaire des ARNs, de la polyadénylation et de la stabilité des ARNs qui sont des étapes critiques pour l'expression et la régulation de plusieurs gènes (Mattaj 1990, Dreyfuss *et al.* 1993, Higgins 1991). Elles semblent aussi être impliquées dans la modulation de la traduction des ARNms (Dreyfuss *et al.* 1988). Des exemples de protéines RNP se retrouvent chez les bactériophages, les bactéries, les levures, les insectes, les plantes et les mammifères (Bell *et al.* 1988, Query *et al.* 1989). Les membres de cette famille de protéines liant l'ARN et possédant un RNP-CS peuvent se lier à une variété de molécules d'ARN (revue par Keene et Query 1991).

1.4.1 Les structures

Les protéines RNP possèdent deux domaines distincts : un domaine de 80-100 acides aminés liant l'ARN dans la portion amino-terminale appelé soit RRM (RNA recognition motif), CS-RBD (consensus sequence type RNA binding domain) ou RNP-CS

(ribonucleoprotein consensus) et un domaine auxiliaire, riche en glycine dans la région carboxy-terminale dans le cas des protéines RNP riches en glycine (Carpenter *et al.* 1994).

Le domaine RNP-CS possède deux motifs RNP conservés dont un octamer, le RNP-1 et un hexamer, le RNP-2 (revue par Dreyfuss *et al.* 1988, Bandziullis *et al.* 1989, Keene et Query 1991). Les séquences RNP-1 et RNP-2 contiennent des résidus aromatiques et basiques impliqués dans les interactions avec les acides nucléiques (Merrill *et al.* 1988, Nagai *et al.* 1990) et leur présence dans une protéine peut être considérée comme un très bon indicateur d'une activité de liaison de l'acide nucléique simple brin (Mattaj 1989). Les régions externes aux motifs peuvent influencer la liaison de l'ARN en maintenant la structure protéique ou le contact avec l'ARN ou être spécialisées pour une protéine donnée (Kenan *et al.* 1991). Souvent, ces protéines contiennent plusieurs RNP-CS similaires mais non-identiques et arrangés en tandem (Bandziulis *et al.* 1989), bien que les protéines du maïs, du sorgho et de l'épinette blanche n'en contiennent qu'un seul (Gomez *et al.* 1988, Crétin et Puigdomènech 1990 et chapitre IV). Les domaines auxiliaires, comme celui riche en glycine, pourraient interagir avec d'autres composantes requises pour la maturation des ARNs (Steinart *et al.* 1991) ou augmenter l'affinité de la protéine pour l'ARN comparativement à celle permise uniquement par le RNP-CS (Cobianchi *et al.* 1988).

La présence d'introns à des positions identiques dans les séquences eucaryotes connues de gènes codant pour des protéines RNP suggère que ces protéines possèdent une origine ancienne (Li *et al.* 1991). En ce qui concerne la structure génique, chez le maïs, on retrouve les RNPs riches en glycine sous la forme d'une famille de gènes de cinq membres (Didierjean *et al.* 1992). Chez *Brassica napus*, les protéines feraient partie d'une petite famille de gènes d'au moins deux membres (Bergeron *et al.* 1993). Chez la carotte, il y aurait entre un et trois de ces gènes (Sturm 1992). En fait, très peu de données sont disponibles sur la structure génique des protéines RNP possédant un domaine auxiliaire

riche en glycine. Chez *Picea glauca*, de quatre à six copies de séquences homologues à *PgRNP* («*Picea glauca* RNP motif RNA binding protein») seraient présentes (chapitre IV).

1.4.2 L'implication des protéines riches en glycine liant l'ARN dans la réponse aux stress

L'expression de certains gènes codant pour des protéines RNP riches en glycine est affectée par des stimuli environnementaux tels que les blessures (Condit et Meagher 1986, Sturm 1992, Gomez *et al.* 1988), l'acide salicylique, les infections virales, (Kan *et al.* 1988), l'ABA (Gomez *et al.* 1988, Sturm 1992), les stress hydriques et chimiques (Gomez *et al.* 1988, Didierjean *et al.* 1992), la déshydratation (Carpenter *et al.* 1994, Delseny *et al.* 1994), le froid (Carpenter *et al.* 1994) et les rythmes circadiens entraînés par la lumière (Carpenter *et al.* 1994, Heintzen *et al.* 1994). Une répression de l'accumulation des transcrits de ces gènes a également été observée lors de traitements à l'ABA (Guiltinan et Niu 1996, Carpenter *et al.* 1994).

Une expression ontogénétique est aussi remarquée chez quelques gènes. On détecte une expression élevée du gène *whgrp-1* chez le blé lors du développement des embryons, dans les tissus racinaires des semis matures et, de façon moindre, dans les feuilles (Guiltinan et Niu 1996). Les ARNms sont présents chez les embryons de maïs en dormance et sont à peine détectables après 24 heures de germination (Gomez *et al.* 1988). Ils peuvent aussi être présents dans certains organes de la plante, comme le transcrit *bngr10* qui est détecté dans les tiges et les racines mais absent des feuilles et des fleurs de *Brassica napus* (Bergeron *et al.* 1993).

Les racines de carottes matures et non blessées ont un niveau très faible de transcrits de protéines RNP, mais l'accumulation des ARNms est détectée trois heures après les

blessures. L'implication de ces protéines dans la réponse aux stress n'est pas encore connue. Cependant, un rôle associé à la maturation et au transport des ARNms produits en réponse aux blessures a été suggéré (Sturm 1992).

1.5 Objectifs de la thèse

De façon générale, on peut dire que les connaissances touchant la réponse des conifères aux divers stress sont limitées. L'objectif de cette thèse est donc de développer nos connaissances fondamentales sur l'induction de certains gènes de *P. glauca* par blessures et par différents stress et traitements chimiques. Ces connaissances pourront servir de modèle pour les autres conifères. Les objectifs à court terme étaient : 1) d'isoler des gènes de *P. glauca* impliqués dans la réponse à différents stress; 2) d'étudier les patrons d'expression et de régulation de ces gènes; 3) de déterminer si les composés chimiques impliqués dans la réponse chez d'autres plantes affectent l'expression des gènes de *P. glauca*.

Les chapitres II, III et IV sont respectivement consacrés au clonage génique et à la caractérisation moléculaire des gènes potentiels de la «chalcone synthase», d'une déshydrine et d'une protéine riche en glycine liant l'ARN.

CHAPITRE II

CHARACTERIZATION OF A PUTATIVE CHALCONE SYNTHASE GENE IN WHITE SPRUCE (*PICEA GLAUCA* (MOENCH) VOSS) INDUCED BY WOUNDING AND JASMONATE TREATMENTS

(CARACTÉRISATION D'UN GÈNE PUTATIF DE LA «CHALCONE SYNTHASE» CHEZ L'ÉPINETTE BLANCHE (*PICEA GLAUCA* (MOENCH) VOSS) INDUIT PAR LES BLESSURES ET LES TRAITEMENTS AUX JASMONATES)

Sylvie Richard: Étude d'expression de *PgCHS1*

Robert Rutledge: Isolation, séquençage et caractérisation du clone *PgCHS1*

Armand Séguin: Directeur des travaux

Cet article sera soumis à la revue *Plant Physiology*

Characterization of a putative chalcone synthase gene in white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) induced by wounding and jasmonate treatments

Sylvie Richard¹, Robert Rutledge² and Armand Séguin^{1,2,†}

¹ Centre de recherche en biologie forestière, Pavillon C.-E.-Marchand, Université Laval,
Ste-Foy, Québec, Canada, G1K 7P4

² Centre de foresterie des Laurentides, Service canadien des forêts, Ressources naturelles
Canada, Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4C7

† Author for correspondence

RÉSUMÉ

Les jasmonates ont été proposés comme étant des molécules signalisatrices associées à l'activation d'une grande variété de gènes de plante en réponse aux blessures. Le sentier des phénylpropanoïdes est particulièrement important pour les plantes en condition de stress environnemental, incluant les blessures et l'attaque par des pathogènes. Ce sentier mène à la formation de composés comme la lignine, les flavonoïdes et les phytoalexines. La «chalcone synthase» (CHS) est une enzyme clé qui catalyse la première étape menant à la biosynthèse des flavonoïdes. La technique PCR, combinée à l'utilisation d'amorces dégénérées, nous a permis d'isoler un clone partiel d'ADN complémentaire (ADNc) de la CHS (*PgCHS1*) chez l'épinette. La sonde *PgCHS1* a été utilisée pour étudier la réponse générale de la CHS aux blessures ainsi que son induction par l'acide jasmonique et le méthyle jasmonate sous forme de vapeur contenue dans l'air. Les analyses de type northern ont révélé différents patrons d'accumulation des ARNms de *CHS* dans les tissus d'aiguille à la suite de stress de blessure mécanique, de traitement à l'acide jasmonique ou au méthyle jasmonate. Des blessures mécaniques ou des traitements répétés à l'acide jasmonique donnent lieu à une plus grande accumulation de transcrits *CHS*. Une accumulation systémique des ARNms *CHS* résultant de blessures a aussi été observée.

ABSTRACT

Jasmonates are signaling molecules which are proposed to be associated with the wound-response activation of a wide variety of plant genes. The phenylpropanoid pathway has important functions for plants which have been exposed to environmental stresses, such as wounding and pathogen attack. This pathway leads to the formation of compounds including lignin, flavonoids and phytoalexins. Chalcone synthase (CHS) is a key enzyme which catalyzes the first step in flavonoid biosynthesis. The use of PCR technology and degenerate primers has allowed us to isolate a CHS partial cDNA clone (*PgCHS1*) of spruce. We have investigated the general wound-response of *CHS* as well as its inducibility by jasmonic acid and airborne methyl jasmonate. Northern analyses have revealed different patterns of *CHS* mRNA accumulation in needle tissue following mechanical wound, or signal molecules like jasmonic acid- or methyl jasmonate-treatments. Repeated mechanical wounding or jasmonic acid-treatments had an enhancing effect on transcript accumulation. A systemic accumulation of *CHS* mRNAs following wounding has also been observed.

Abbreviations: CHS, chalcone synthase; DEPC, diethylpyrocarbonate; JA, jasmonic acid; MJ, methyl jasmonate.

2.1 Introduction

Over their life cycle, plants will be exposed to numerous environmental stresses. These stresses can result from injuries caused by the attacks of insects and microbes or, by mechanical wounding which is generally referred to as wounding. Mechanical or biological stresses applied to plants can induce many biochemical changes. In plants, wounding generally induces two types of defense response, which lead to the expression of protective products either at the site of injury, or systemically in distant unwounded tissues (see Bowles, 1990; Ryan, 1990 for review). Several groups of defense-related genes have been identified with respect to insect and microbial pathogens (Smith, 1996; Hammond-Kosack and Jones, 1997). Proteins or their corresponding mRNAs that are known to accumulate systemically include protease inhibitors (Koiwa et al., 1997), chitinase (Oppenheim and Chet, 1992), phenylalanine ammonia lyase and CHS (Dixon and Paiva, 1995). Jasmonates are proposed to be signaling molecules associated with the activation of an increasing number of plant gene in response to wounding (reviewed in Creelman and Mullet, 1997; Wasternack and Parthier, 1997). Moreover, jasmonate levels in plants are rapidly and transiently increased in wounded plants (for a review on jasmonate see Sembdner and Parthier, 1993). Jasmonate gene induction takes place through a lipid-based signaling pathway called the octadecanoid pathway (Mueller, 1997). Finally jasmonic acid (JA) and its methyl ester (methyl jasmonate, MJ) was shown to be related to plant senescence and growth.

JA has been first associated in the activation of genes encoding protease inhibitors after wounding (Farmer et al., 1992), but it has also been studied with respect to induction of messenger RNA encoding for flavonoid biosynthetic enzymes (Dittrich et al., 1992; Gundlach et al., 1992) and other phenylpropanoid genes like 4-coumarate:CoA ligase (Ellard-Ivey and Douglas, 1996). This suggests a larger role of jasmonates both in the wound response, as well as in the pathogen attack response in higher plants (Creelman

and Mullet, 1997). CHS is a key enzyme of the phenylpropanoid pathway catalyzing the first step in flavonoid biosynthesis (Hahlbrock and Scheel, 1989). The flavonoids play many important roles, such as: floral pigments, antibiotics, UV protectants and insect repellents (Hahlbrock and Scheel, 1989). Flavonoids are important compounds in conifers. *Pinus sylvestris* possesses both CHS and stilbene synthase activities. Following stress treatments (nicking of the hypocotyl with a knife and in vacuo infiltration of a solution of yeast extract), Fliegmann et al. (1992) observed an augmentation of CHS as well as an induction of stilbene synthase activities in *P. sylvestris*. These enzymes are important for the formation of molecules possessing fungistatic properties (Fliegmann et al. 1992). Induction of *CHS* transcript accumulation was also reported following MJ treatment of soybean cell suspension (Creelman et al. 1992) and barley leaf tissues (Lee et al. 1996). CHS genes have been reported in many plant species including conifers (Mol et al., 1988; van der Meer et al., 1993; Holton and Cornish, 1995; Baker and White, 1996). Baker and White (1996) have been able to evaluate the genomic organization of CHS and stilbene synthase in 7 coniferous species using a PCR-generated CHS probe. Alignment of nucleotide sequences of a specific region of the genes revealed 70 to 90% identity between known CHS sequences from coniferous and angiosperm CHS, and from coniferous stilbene synthase genes (Baker and White, 1996). CHS is by far the most abundant protein in the phenylpropanoid biosynthetic pathway. The abundance of the transcript and its protein may help counteract the enzyme's poor catalytic efficiency (Hahlbrock and Scheel, 1989). CHS gene expression is influenced by many stresses and environmental factors (reviewed in Dixon and Paiva, 1995). For example, light and UV radiation have been shown to regulate and modulate CHS transcription (Gläßgen et al., 1998; Ito et al., 1997). It is well known that CHS is implicated in wound and pathogen response as well as in plant-microbe interactions (Zhu et al., 1996). In this study, we investigated *CHS* transcript accumulation of spruce in response to wounding and jasmonates, using northern analysis.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Plant material

Picea glauca (Moench) Voss seeds were germinated on moist filter paper in Petri dishes in the dark at 22°C for 2 weeks, or at 22°C under a 16 h photoperiod, light intensity of 58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. White spruce seedlings (2-year-old), provided by the ministère des Ressources naturelles du Québec, were kept under normal greenhouse conditions. Vegetative, male and female bud tissues were collected from 15-year-old field planted trees (Daoust et al., 1995) and stored on dry ice and subsequently at -80°C during the spring of 1996 (May 7th, 17th and 29th).

2.2.2 Jasmonate and wounding treatments

Time-course experiments for wounding, JA- and MJ-treatments were performed with dark grown 2-week-old seedlings (30 seedlings per experiment). Two-week-old seedlings were wounded several times with flat-bladed tweezers by random crushing them. In time-course experiments (5 plants per experiment), the 2-year-old plants were wounded by trimming the first 5-15 mm of various needle tips on every branch of the plant with scissors. To study the systemic wound response, the needles of five bottom branches from the 2-year-old seedlings were initially severely wounded with scissors by removing the needle tips and material was harvested from five identified non-wounded branches toward the apical region of the seedlings. Multiple mechanical wounding treatments on 2-year-old white spruces were carried out over the entire plant and repeated at 4-hour intervals (on 20 seedlings).

JA-treatments consisted of spraying the plants (5 plants per experiment) to saturation with a 100 μM JA solution (Farmer et al., 1992) prepared in 0.05% Tween 20 (Sigma).

Plants were treated either once at time 0 or sprayed in a 4-h interval (0, 4, 8 h). Two-week-old etiolated or light-grown seedlings were incubated in Petri dishes (30 seedlings per experiment). Two-year-old and two-week-old seedlings were sprayed with 0.05% Tween 20 alone as a control treatment (five 2-year-old plants were used per experiments and were isolated in a neighbored greenhouse to avoid cross contamination of the treatments).

Treatment with MJ (Bedoukian Research Inc.) was carried out by placing 2-year-old plants (5 per experiment) in plastic bags with a cotton swab containing 500 μ L of an ethanol: MJ solution (9:1, v/v) (Farmer et al., 1992). MJ control plants were in the same condition except that the swab contained only ethanol solution (5 plants per experiment isolated in an adjacent greenhouse). Two-week-old etiolated or light-grown seedlings were incubated in sealed Petri dishes (30 seedlings per experiment). Care was taken to ensure that plants and plantlets did not touch the swab. In this way, plants were exposed only to MJ vapors.

Two-year-old plants, which were phenologically maintained in a sustained growth stage during experiments, were kept under normal greenhouse conditions during treatments. At collection time, plant material was frozen in liquid nitrogen and/or stored at -80°C .

2.2.3 Probe construction, isolation and sequencing

Poly(A⁺) RNA, prepared from pooled fractions of total RNA isolated from needle tissue of 2-year-old white spruce seedlings wounded, MJ-treated, or JA sprayed at a 2-h interval for 8 h before harvesting, was used for the first cDNA strand reaction. Total RNA was isolated according to Chang et al. (1993) and poly(A⁺) RNA was purified with the PolyAtract mRNA Isolation System (Promega). A cDNA was made with 1 μ g of poly(A⁺) RNA and poly(dT)₁₅ primer using a first strand cDNA synthesis kit

(Boehringer Mannheim). Degenerated primers forward (5'- CGGAATTCACIACI T/A C/G IGGIGTIGA T/C ATG) and reverse (5'- GCTCTAGAGCICC G/A TCICC G/A AAlA G/A IGC T/C TG) encoding the amino acids TTSGVDM and QALFGDGA respectively were designed using two highly conserved amino acid domains found in plant CHS. They were used to amplify a portion of spruce *CHS* cDNA. One fifth of the initial first strand cDNA synthesis reaction (approximately 50 ng) was used as template in an amplification reaction using the designed forward and reverse primers. PCR amplification was carried out using 0.1 μ M of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 0.025 unit/ μ L *Taq* DNA polymerase (Boehringer Mannheim) and 1 x of the supplied reaction buffer. PCR was carried out for 35 cycles (94°C, 1 min; 50°C, 45 sec; 72°C, 1 min) followed by 10 min at 72°C in a DNA thermal cycle (Perkin Elmer). Amplicons were separated on a 2% agarose gel, and transfer onto Nytran Plus positively charged nylon membrane (Schleicher and Schuell) under alkaline transfer conditions (0.4 N NaOH), and crosslinked with UV. Subsequent hybridization have been performed with a *Picea mariana* *CHS* probe (PmCSF7 Rutledge et al., unpublished) to screen for *CHS* true amplicons. Positive amplicons were isolated and reamplified under higher stringency PCR conditions (annealing temperature at 55°C), to obtain one specific PCR-amplified DNA fragment size. PCR products were purified using QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) and cloned, using the *Eco*RI and *Xba*I sites included in the forward and reverse primers, in pBluescript™ SK+ (Stratagene) at the corresponding sites. In order to confirm the *CHS* identity of the clones, four transformed colonies were randomly chosen for sequencing. Sequences were obtained using the dideoxy chain termination method (Sanger et al., 1977) using an ABI 373 automated DNA sequencer stretch (Perkin-Elmer). Three clones were identical, the fourth clone was different at the nucleotide level, although encoding for an identical inferred peptide. One specific amplicon, *PgCHS1*, which was one of the three identical clones was chosen and used as a probe for this study.

2.2.4 DNA isolation and Southern analysis

Picea glauca genomic DNA was extracted from white spruce embryogenic calli as described by Charest et al. (1996). Genomic DNA was dissolved in water and digested with restriction enzymes (*Bgl* II, *Eco*R I and *Hind* III), fractionated by agarose gel electrophoresis (0.8% w/v), transferred onto Nytran Plus membranes according to the manufacturer's recommendations and crosslinked with UV. DNA extraction and hybridization were performed in duplicate.

2.2.5 Total RNA isolation and northern analysis

Total RNA was isolated from pooled material of needles, roots and stem from 2-year-old seedlings and whole 2-week-old seedlings and purified according to Chang et al. (1993). Non-stressed root material from 2-year-old potted plants were harvested from plants which have been washed gently by soaking their roots in tap water for 1 min to remove soil. Excess water was absorbed on Whatman paper. The roots were cut, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Total RNA from five to ten pooled vegetative, male and female buds tissues of 15-year-old field-planted trees was extracted using the Chang et al. (1993) extraction buffer together with the QIAGEN RNeasy total RNA kit. RNA was finally redissolved in DEPC-treated water and RNA concentrations were determined by absorbance value at 260 nm. Equal amounts of total RNA (10 to 30 µg) were denatured with formamide/formaldehyde and fractionated on denaturing 1.2% agarose formaldehyde gel. Total RNA quality was confirmed by ribosomal RNA integrity observed by ethidium bromide staining of the gel. The gel was blotted onto Nytran Plus positively charged nylon membranes (Schleicher and Schuell), and fractionated RNAs were subsequently crosslinked to membranes by UV radiation. Treatments and hybridization were performed in duplicate.

2.2.6 Hybridization conditions

Plasmid purification was achieved with QIA-prep-8 Plasmid Kit (QIAGEN). Probes were synthesized by PCR amplification of the *PgCHS1* clone using pBluescript™ specific primers in PCR reaction carried out using 0.1 μM of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 0.025 unit/μL *Taq* DNA polymerase (Boehringer Mannheim) and 1 x of the supplied reaction buffer. PCR was carried out for 35 cycles (94°C, 1 min; 50°C, 45 sec; 72°C, 1 min) followed by 10 min at 72°C in a DNA thermal cycle (Perkin Elmer). PCR products were purified using QIAquick PCR purification kit (QIAGEN). Purified amplicons were radioactively labeled by random priming with the High Prime labeling kit (Boehringer Mannheim). Radiolabeled probes were purified with QIAquick nucleotide removal kit (QIAGEN). Membranes were prehybridized in hybridization buffer (Church and Gilbert, 1984) for 2 h prior to adding [α -³²P]-labeled probe (1 x 10⁶ cpm/mL buffer). High-stringency hybridization conditions with northern blot analyses were achieved by hybridizing the membranes at 65°C for 16 h and washing them twice with 1 x SSC and 1% SDS at 65°C for 30 min. Membranes were stripped by boiling for 15 min. in 0.1 x SSC and 0.1% SDS and rehybridized with a white spruce 400 bp 18 S ribosomal probe to monitor RNA loading quantity. Ribosomal probe was generated by PCR reaction under above mentioned conditions using 100 ng of *P. glauca* genomic DNA as template together with the NS51 and NS61 primers (5'-GGGGGAGTATGGTCGCAAGGC-3' and 5'-TCAGTGTAGCGCGGTGCGGC-3' respectively, Simon et al., 1992). Hybridization conditions were as previously mentioned for Southern analyses except that the hybridization and washes were performed at 60°C and that washes were in 2 x SSC and 0.1% SDS. Hybridized membranes were exposed on X-OMAT™ AR Scientific Imaging Film (Kodak) for 12 to 36 h (7-10 days for Southern blot analysis) and/or exposed to a Storage Phosphor Screen where hybridization signals were recorded with a Fuji Bio imaging analyzer.

Quantification of transcript accumulation were evaluated by Phosphor imager analyzer and by densitometric measurement of autoradiograms using the RFLPscan Plus 3.0 program (Scanalytics, a division of CSP inc.). Results were normalized for an equal loading quantity of 18 S ribosomal RNA intensity. Histograms illustrate the quantification of the most representative hybridization experiment (shown) where errors bars represent the degree of error in the quantification method. In the analyses, we considered a difference of magnitude of transcript accumulation of two-fold or greater to be significant.

2.3 Results and discussion

2.3.1 Isolation and characterization of *PgCHS1* partial cDNA clone

The *PgCHS1* partial cDNA of 267 bp was isolated using a PCR strategy combined with the use of degenerate primers derived from conserved regions of other known *CHS* genes. Three randomly chosen clones were identical at the DNA level, however, the fourth sequence was different from the three others, although it encodes the same putative peptide sequence. Translation of the *PgCHS1* partial cDNA sequence yielded an open reading frame of 89 amino acids (Fig. 1 A). This predicted amino acid sequence is highly homologous to that of other known CHS proteins (Fig. 1 B), and shares 99-100% identity over the 89 amino acids with CHS from coniferous species and 95% with CHS from angiosperms. *PgCHS1* cDNA partial clone represents a very well conserved region of the *CHS* gene. Thus the *PgCHS1* probe used in this study is not gene specific but rather *CHS* gene family specific.

2.3.2 Southern hybridization analysis

Southern analyses had revealed that *PgCHS1* probe detected a *CHS* multigene family in *Picea glauca* (Fig. 2). These results confirm the results of Baker and White (1996) who showed the presence of many fragments related to *CHS* and stilbene synthase in white spruce and other gymnosperms as well. Baker and White (1996) have hypothesized that the multigenic nature of these genes in conifers may indicate that only some of them are important to defense. The importance of these genes in conifers might also reflect the need for massive production of *CHS* transcripts to obtain acceptable level of *CHS* activity. Duplicate experiments have shown identical results.

2.3.3 Tissue specific expression of *CHS*

Northern blot analysis of total RNA from various organs and tissues of non-stressed white spruces indicated that *PgCHS1* is primarily expressed in female buds as well as in the second stage of vegetative buds and the first of male buds (Fig. 3). Moderate expression was observed in the other stages of developing vegetative buds. While the second and third development stages of male buds had a low level of detected mRNAs which was similar to those detected in vegetative tissues. Needles and stems tissues had a relatively low level of *CHS* mRNA accumulation while roots had a barely detectable transcript level. *CHS* is known to be expressed in flowers, and highly associated with color production in these tissues through flavonoids biosynthesis (Mol et al., 1996). Developing buds from white spruce are colored, mainly with red pigments and female buds are more intensively colored than other bud types. It would be interesting to see if these pigments are directly associated with *CHS* activity. *CHS* could also play a defensive role in protecting the ovule or the forming seeds in the female cone against predators or microorganisms.

2.3.4 Induction of *CHS* mRNA expression by mechanical wounding and jasmonate treatments

Northern analyses revealed different patterns of accumulation of *CHS* transcripts in needle tissue following either mechanical wounding or JA treatments of white spruce seedlings. A time course experiment on 2-year-old seedlings following a single stress showed different patterns of transcript accumulation for wounding, systemic wound response and JA (Fig. 4). High level of *CHS* transcripts was observed 2 h following the wound treatment and attained a peak by 4 h. We were interested in determining if systemic accumulation of *CHS* could be obtained. Systemic wound response has been mostly characterized with respect to the production of defense products such as protease inhibitors; however systemic accumulation of *CHS* genes has also been reported (Dixon and Paiva, 1995). Such a systemic induction of *CHS* was observed and, as expected, this activation was less immediate than the response observed with the wound treatment since the maximum level of expression was reached at 8 h following wounding compare to 4 h in the wound experiment (Fig. 4). *CHS* mRNAs started to accumulate more rapidly in the wound response (2 h) than in the systemic one (4 h). The *PgCHS1* probe detected two transcripts with a size range of 1.383-1.908 kb. The number of transcripts detected could reflect the highly conserved region used as a probe for this study and likely represent different members of the family expressed during the treatment.

In the JA treatment, *CHS* transcripts started to accumulate by 8 h, reached a maximum by 10 h and remained high for up to 24 h after the occurrence of the vaporization. The delay observed in the systemic wound response as well as in JA treatment compare to wound response could possibly reflect, in the case of systemic wound response, the time required for the plant to synthesize or release enough of the signal molecule to have an influence on transcript accumulation. The similar delay in the JA response suggests a possible involvement of jasmonates in the wound activation of the *CHS* gene in spruce.

Effect of JA on *CHS* accumulation was also stronger than the effects of both wound and systemic wound treatments suggesting a more efficient activation mechanism through this putative wound response mediator. Jasmonates have already been implicated in the elicitor-induced response of culture cells by the initiation of *de novo* transcription of genes involved in the phenylpropanoid pathway (Dittrich et al., 1992; Gundlach et al., 1992; Mueller et al., 1993; Ellard-Ivey and Douglas, 1996).

Successive mechanical wounding treatments or repeated JA treatments increased the accumulation of transcripts for up to 8 h after the occurrence of the first stress treatment in 2-year-old seedlings (Fig. 5). In comparing the accumulation of *PgCHS1* transcripts after a single wound-treatment (Fig. 4) and after multiple wound treatments, it can be noted that the application of a second wound stress enhanced the level of transcript accumulation of *CHS* and led to a higher transcript level 8 h following wound treatment (Fig. 5), compared to a diminution of transcript level which was detected after the occurrence of a single wound treatment at 8 h (Fig. 4). The failure to detect a further enhancement of mRNA accumulation at 24 h could either be due to the exhaustion of the transcriptional machinery or simply to the disappearance of the signal 16 h after the last wound treatment. This enhancement of transcription activation following multiple wounds has already been observed with protease inhibitors (Graham et al., 1986). Similar to the enhancing effect of multiple wounding, an enhancing effect was observed following the second application of JA on plants. Similarly, we have failed to detect further enhancing accumulation effect following the third application of JA, which could be due to the same reasons than in the multiple wound treatment or to the volatile aspect of JA. However, in general, *CHS* mRNA levels were much higher in response to JA treatment than in response to wounding. This higher transcript accumulation achieved through an exogenous application of JA by 8 h suggests that the gene induction mechanism can be more efficiently saturated compared to what can be obtained through endogenous

production of the signal molecule following wounding and its subsequent defense response. This was also the case following a single JA-treatment application (Fig. 4).

MJ response allowed the transcript level of *CHS* to reach highest peak than multiple wounding treatment, but lower than in JA treatment. However in the time laps studied, mRNA level was still rising, and could possibly reflect a postponed response for MJ compare to JA simply on the basis of the concentration of jasmonate reached in plant tissues. As JA was directly sprayed on the plant, it was presumably absorbed faster than MJ, which had first to saturate the environment of the seedlings to reach similar concentration in tissues which was probably more gradual compare to JA vaporization. However, since no evaluation of endogenous concentration of jasmonate in the plants was realized, this is only speculative. It could also be possible that MJ activation would allow mRNA to accumulate to similar level than JA one. Results from Tween (JA control) and ethanol (MJ control) have shown no significant variation in the transcript level accumulation (data not shown). Duplicate experimental treatments have shown similar results.

Furthermore, we wanted to compare the capacity of two-week-old freshly grown seedlings to accumulate *CHS* mRNAs following wounding and jasmonate treatments with the capacity of their lignified 2-year-old counterpart. The accumulation of mRNA observed with etiolated 2-week-old seedlings (Fig. 6 A) in response to wounding and JA were weaker than those reached in the 2-year-old plants. Furthermore, MJ was lowering the level of *PgCHS1* transcripts by opposition to what was first observed in 2-year-old plants. To test if this difference was related to a light-dependent activation mechanism of *CHS* expression in *P. glauca*, experiments were undertaken with light-grown 2-week-old seedlings (Fig. 6 B), which showed a stronger effect on *CHS* transcript accumulation for all of the three treatments. In *A. thaliana* etiolated seedlings, *CHS* was transcribed at a very low level (Kubasek et al., 1992). Modulation of the transcription activity of *CHS* by

light has been observed (Takeda et al., 1993) and a light regulatory promoter element has been characterized from *CHS* (Mol et al., 1996). In a hypersensitive reaction, *CHS* transcripts were accumulating to high levels in light-exposed plants but not in dark-adapted plants which were also kept in the dark during induction (Leyva et al., 1995). According to our results, it is likely that a light-modulation element is involved in the wound response of *CHS* as well as in jasmonate induction. We have failed to detect transcripts of *CHS* in seeds of *P. glauca* 24 h after germination (data not shown). However, this was similar to results obtained in other plant species. *CHS* and flavonoid gene have already been reported to be inducible in seedlings only after a certain stage of differentiation (reviewed in van der Meer et al., 1993). *CHS* transcripts were also monitored during various period of the day (9 a.m., 3 p.m., 9 p.m., 3 a.m.) and no significant variation was observed (data not shown).

In conclusion, a new *CHS* partial cDNA clone was investigated in conifers and a correlation between *CHS* mRNA accumulation and the response to various signal molecules as well as wounding was found. Such a correlation suggests a role of *CHS* in the defense mechanism evolved during wound response as well as a role for jasmonate in mediating this response.

2.4 Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Luc Giasson for helpful discussions, Maria D. Luckevich for help with RNA extraction and for reviewing the text and François Larochelle, Claude Fortin and Henning Heinemann for technical support. This research was supported by a grant to A.S. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. S.R. was in part supported by scholarships from La Fondation de l'Université Laval, Le Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche and The Canadian Federation of University Women.

2.5 Literature cited

- Akada S, Kung SD, Dube SK (1993)** Nucleotide sequence of a soybean chalcone synthase gene with a possible role in ultraviolet-B sensitivity, Gmchs6. *Plant Physiol* **102**: 699-701
- Baker SM, White EE (1996)** A chalcone synthase/stilbene synthase DNA probe for conifers. *Theor Appl Genet* **92**: 827-831
- Bowles D (1990)** Defense-related proteins in higher plants. *Annu Rev Biochem* **59**: 873-907
- Chang S, Puryear J, Cairney J (1993)** A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* **11**: 113-116
- Charest PJ, Devantier Y, Lachance D (1996)** Stable genetic transformation of *Picea mariana* (black spruce) via particle bombardment. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **32**: 91-99
- Church GM, Gilbert W (1984)** Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1991-1995
- Creelman RA, Tierney ML, Mullet JE (1992)** Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wound soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4938-4941
- Creelman RA, Mullet JE (1995)** Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc Nat Acad Sci USA* **92**: 4114-4119
- Creelman RA, Mullet JE (1997)** Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Phys Plant Mol Biol* **48**: 355-381
- Daoust G, Plourde A, Beaulieu J (1995)** Influences of crown size and maturation on flower production and sex expression in *Picea glauca* treated with gibberellin A₄₇. *Tree Physiol* **15**: 471-475

- Dittrich H, Kutchan TM, Zenk MH (1992)** The jasmonate precursor, 12-oxo-phytodienoic acid, induces phytoalexin synthesis in *Petroselinum crispum* cell cultures. *FEBS Lett* **309**: 33-36
- Dixon RA, Paiva NL (1995)** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**: 1085-1097
- Ellard-Ivey M, Douglas CJ (1996)** Role of jasmonates in the elicitor- and wound-inducible expression of defense genes in parsley and transgenic tobacco. *Plant Physiol* **112**: 183-192
- Farmer EE, Johnson RR, Ryan CA (1992)** Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol* **98**: 995-1002
- Fliegmann J, Schröder G, Schanz S, Britsch L, Schröder J (1992)** Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Mol Biol* **18**: 489-503
- Gläßgen WE, Rose A, Madlung J, Koch W, Gleitz J, Seitz HU (1998)** Regulation of enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in carrot cell cultures in response to treatment with ultraviolet light and fungal elicitors. *Planta* **204**: 490-498
- Graham JS, Hall G, Pearce G, Ryan CA (1986)** Regulation of synthesis of proteinase inhibitors I and II mRNAs in leaves of wounded tomato plants. *Planta* **169**: 399-405
- Gundlach H, Müller MJ, Kutchan TM, Zenk MH (1992)** Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2389-2393
- Hahlbrock K, Scheel D (1989)** Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 347-369
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1997)** Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 575-607

- Holton TA, Cornish EC (1995)** Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 1071-1083
- Ito M, Ichinose Y, Kato H, Shiraishi T, Yamada T (1997)** Molecular evolution and functional relevance of the chalcone synthase genes of pea. *Mol Gen Genet* **255**: 28-37
- Koiwa H, Bressan RA, Hasegawa PM (1997)** Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant Sci* **2**: 379-384
- Kubasek WL, Shirley BW, McKillop A, Goodman HM, Briggs W, Ausubel FM (1992)** Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* **4**: 1229-1236
- Lee J, Parthier B, Löbler M (1996)** Jasmonate signalling can be uncoupled from abscisic acid signalling in barley: identification of jasmonate-regulated transcripts which are not induced by abscisic acid. *Planta* **199**: 625-632
- Leyva A, Jarillo JA, Salinas J, Martinezzapater JM (1995)** Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiol* **108**: 39-46
- Mol J, Jenkins G, Schafer E, Weiss D (1996)** Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Crit Rev Plant Sci* **15**: 525-557
- Mol J, Stuitje A, Gerats A, Koes R (1988)** Cloned genes of plant phenylpropanoid metabolism. *Plant Mol Biol Rep* **6**: 274-279
- Mueller MJ, Brodschelm W, Spannagl E, Zenk MH (1993)** Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7490-7494
- Mueller MJ (1997)** Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiol. Plant* **100**: 653-663
- Oppenheim AB, Chet I (1992)** Cloned chitinases in fungal plant-pathogen control strategies. *Trends Biotech* **10**: 392-394

- Ryan C** (1990) Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insect and pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **28**: 425-449
- Sanger F, Nicklen JA, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467
- Schröder J, Raiber S, Berger T, Schmidt A, Schmidt J, Soares-Sello AM, Bardshiri E, Strack D, Simpson TJ, Veit M, Schröder G** (1998) Plant polyketide synthases: a chalcone synthase-type enzyme which performs a condensation reaction with methylmalonyl-CoA in the biosynthesis of C-methylated chalcones. *Biochem* **37**: 8417-8425
- Sembdner G, Parthier B** (1993) The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 569-589
- Simon L, Lalonde M, Bruns TD** (1992) Specific amplification of 18 S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl Environ Microbiol* **58**: 291-295
- Smith CJ** (1996) Accumulation of phytoalexins: defense mechanism and stimulus response system. *New Phytol* **132**: 1-45
- Takeda J, Abe S, Hirose Y, Ozeki Y** (1993) Effect of light and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on the level of messenger RNAs for phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase in carrot cells cultured in suspension. *Physiol Plant* **89**: 4-10
- van der Meer IM, Stuitje AR, Mol JNM** (1993) Regulation of general phenylpropanoid and flavonoid gene expression. *In*: DPS Verma, ed, Control of plant gene expression. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 125-155
- Wasternack C, Parthier B** (1997) Jasmonate signaled plant gene expression. *Trends Plant Sci* **2**: 302-307
- Zhu Q, Dröge-Laser W, Dixon RA, Lamb C** (1996) Transcriptional activation of plant defense genes. *Curr Opin Gen Dev* **6**: 624-630

ACTACCAGTGGAGTCGACATGCCCGGAGCCGACTATCAGCTGAC
 T T S G V D M P G A D Y Q L T

AAAGCTTCTTGGCCTCCGCCCCAGCGTTAAGAGAGTCATGATGTACCAACAGGGCTGCTT
 K L L G L R P S V K R V M M Y Q Q G C F

TGCCGGAGGCACCGTTCTCCGCGTGGCTAAGGATCTGGCAGAGAACAATCGGGGAGCTCG
 A G G T V L R V A K D L A E N N R G A R

GGTTCTGGTCGTCTGCAGTGAAATCACGGCTGTAACATTCCGTGGCCCCCTCCGACACTCA
 V L V V C S E I T A V T F R G P S D T H

CCTCGACAGTATGGTCCGCCAAGCTCTCTTCGGCGATGGTGC

L D S M V G Q A L F G D G A

A

136

Picea **TTS GVDMPGADYQ LTKLLGLRPS VRRVMNYQQG CFAGGTVLRV**
G.max **TTS GVDMPGADYQ LTKLLGLRPS VRRVMNYQQG CFAGGTVLRL**
A.tha **TTS GVDMPGADYQ LTKLLGLRPS VKRLMNYQQG CFAGGTVLRI**
P.str **TTS GVDMPGADYQ MTKLLGLRPS VRRVMNYQQG CFAGGTVLRV**
P.syl **TTS GVDMPGADYQ LTKLLGLRPS VRRVMNYQQG CFAGGTVLRV**

224

Picea **AKDLAENNRG ARVLVVCSEI TAVTFRGSPD THLDSMVGQA LFGDGA**
G.max **AKDLAENNRG ARVLVVCSEI TAVTFRGSPD THLDSLVGQA LFGDGA**
A.tha **AKDLAENNRG ARVLVVCSEI TAVTFRGSPD THLDSLVGQA LFGDGA**
P.str **AKDLAENNRG ARVLVVCSEI TAVTFRGSPD THLDSMVGQA LFGDGA**
P.syl **AKDLAENNRG ARVLVVCSEI TAVTFRGSPD THLDSMVGQA LFGDGA**

B

Figure 1. A. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the amplified PCR fragment of *PgCHS1*. The amino acid sequence is given using the single-letter code. The underlined nucleotides show the position of the degenerated CHS consensus-based primers. B. Comparison of amino acid sequences of the CHS fragment from *P. glauca* (*Picea*) with other CHS proteins. The alignment was done using the program Pileup. The sources of the sequences, identity score, Swiss-Prot or GenBank accession number and references are as follows: *P. glauca*; *Glycine max* (*G. max*), 95%, P30080, Akada et al. 1993; *Arabidopsis thaliana* (*A. tha*), 95%, P13114, unpublished; *Pinus strobus* (*P. str*), 98%, AJ004800, Schröder et al. 1998; *Pinus sylvestris* (*P. syl*), 100%, P30079, Fliegmann et al. 1992. Conserved amino acids are in boldface.

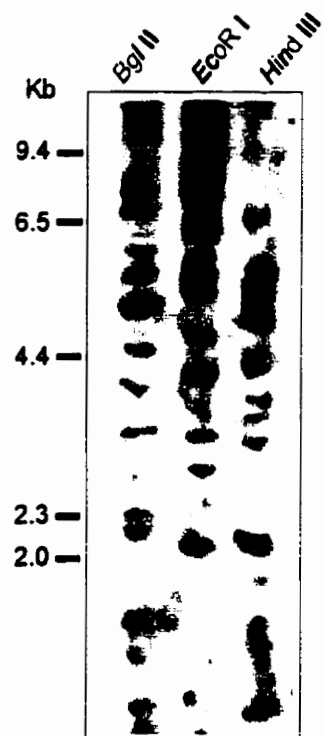


Figure 2. Southern analysis of *PgCHS1*. Genomic DNA (15 μ g) was digested with *Bgl* II, *EcoR* I and *Hind* III. DNA fragments of λ DNA digested with *Hind* III were used as molecular mass markers (indicated at the left).

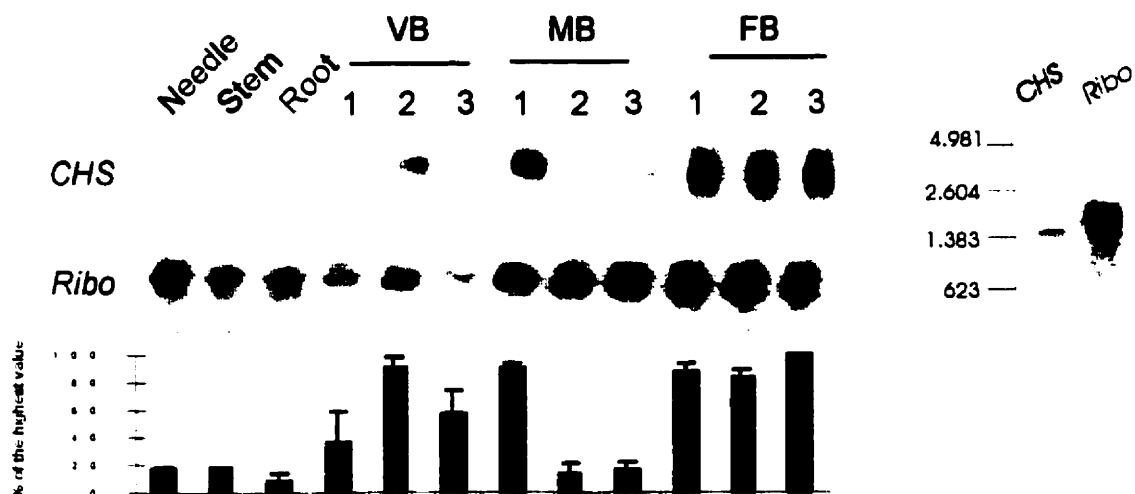


Figure 3. Northern blot analysis of *CHS* RNA accumulation in various tissues. Needle, stem and root from 2-year-old seedlings, and VB, MB, FB indicate vegetative, male and female buds respectively of 15-year-old field-planted trees. Where one to three stand for different stages of bud differentiation starting from early differentiation in spring (1) to fully expanded buds (3) and refer to the harvesting time. The membrane was stripped and rehybridized with a 400 bp 18 S *Picea glauca* ribosomal probe (Ribo) to monitor loading quality. Approximately 10 μ g of total RNA was loaded in each lane. Each sample represents RNA isolated from pooled material of five seedlings (needle, stem and roots) or five to ten buds. Right panel indicates the relative migration distance for the transcripts detected with the two probes in the needle sample and molecular weight (RNA marker, Promega). Histogram shows the normalized mean values of *CHS* relative signal intensity presented as percentage of the highest value, where FB 3 was 100% intensity. Histogram represents scanning values of the most representative hybridization experiment and is a mean of four different quantification results obtained from densitometry scan analyses as well as phosphor imager quantification. Error bars represent average deviation.

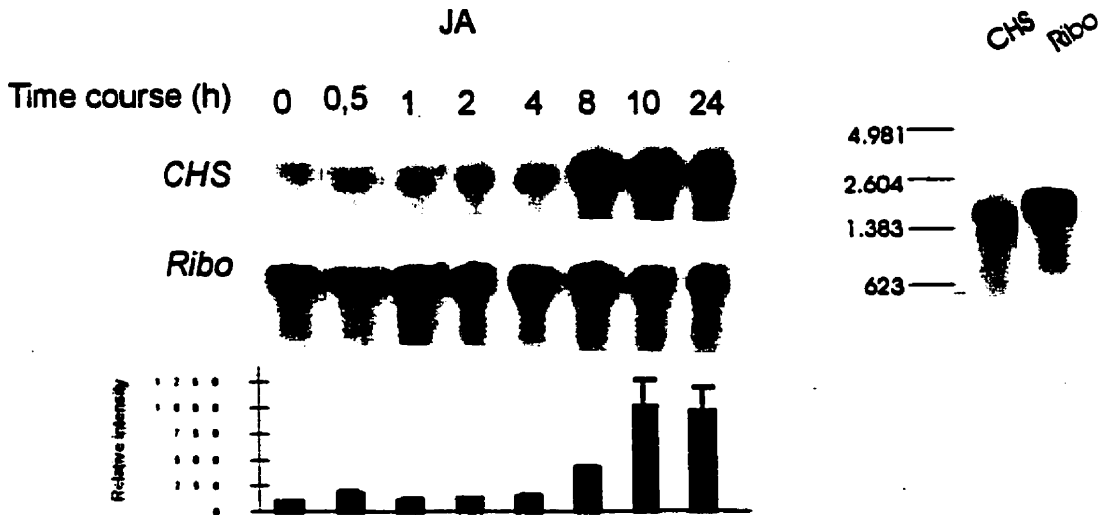
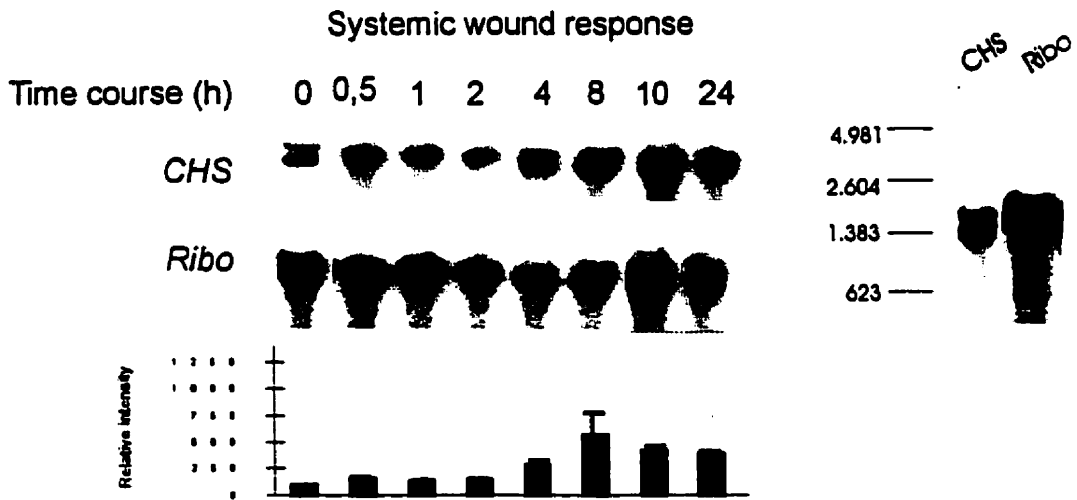
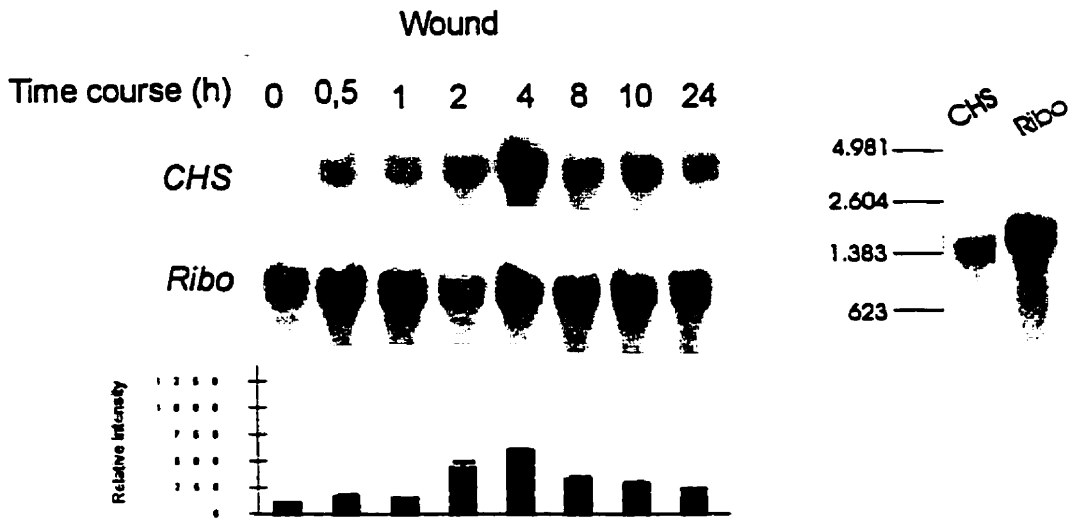


Figure 4. Northern blot analysis of the effect of wounding and JA treatments on *CHS* transcript expression. Two-year-old seedling needles were severely wounded throughout the entire plant or just on basal branches for systemic wound response at time 0. For the systemic analysis, tissue collection was only from branches above the wounded ones. A single JA-treatment consists in spraying plants to saturation at time 0. Time indicates the harvesting period following the beginning of the treatment. Each sample represents total RNA extracted from pooled material of five seedlings. Membranes were stripped and rehybridized with a 400 bp 18 S *Picea glauca* ribosomal probe (Ribo) to monitor equal loading of RNA samples. Thirty μg of total RNA was loaded in each lane. Right panels indicate the relative migration distance for the transcripts detected with the two probes in the time 0 h samples and molecular weight (RNA marker, Promega). Histograms show the normalized mean values of *CHS* presented as relative intensity values, where 0 h were chosen as 100% intensity. Intensity values represent the intensity of the two *CHS* bands detected. Histograms represent scanning values of the most representative hybridization experiment and is a mean of four different quantification results obtained from densitometry scan analyses as well as phosphor imager quantification. Error bars represent average deviation.

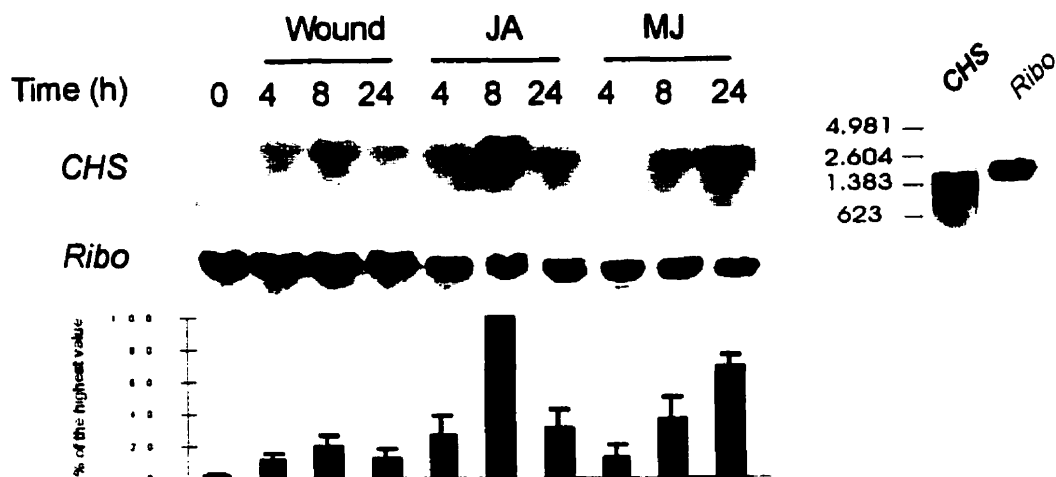


Figure 5. Northern analysis of *CHS* mRNA accumulation following multiple wound- and JA-treatments and MJ-treatment on 2-year-old white spruce seedlings. Plants were wounded or treated with JA at time 0, 4 and 8 h. MJ-treated plants were placed in plastic bags containing a cotton swab containing a MJ solution. Time 0 represents material prior to any of the mentioned treatments. Collection times of the material are indicated. Membranes were stripped and rehybridized with a 400 bp 18 S *Picea glauca* ribosomal probe (Ribo) to verify equal loading of RNA samples. Thirty μ g of total RNA was loaded in each lane. Each sample represents RNA isolated from pooled material of 20 (wound) or five seedlings (JA and MJ). Right panel indicates the relative migration distance for the transcripts detected with the two probes in the MJ 24 h sample and molecular weight (RNA marker, Promega). Histogram shows the normalized mean values of *CHS* relative signal intensity presented as percentage of the highest value, where JA 8 h was 100% intensity. Histogram represents scanning values of the most representative hybridization experiment and is a mean of four different quantification results obtained from densitometry scan analyses as well as phosphor imager quantification. Error bars represent average deviation.

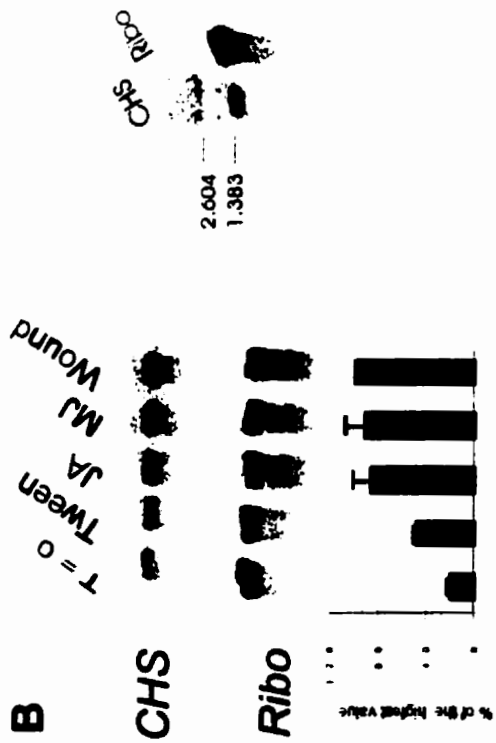
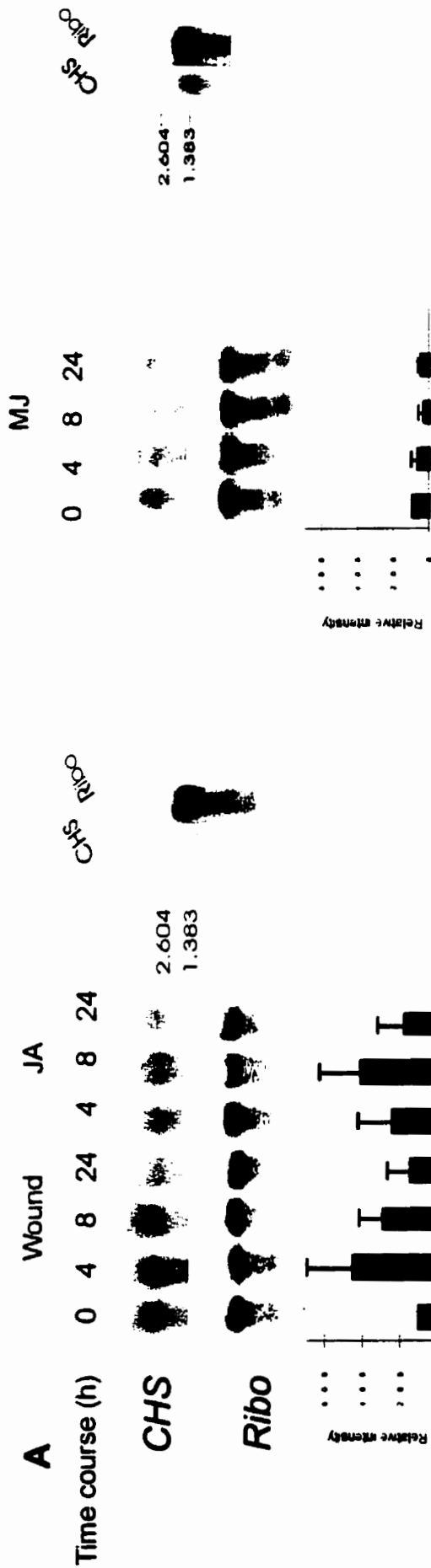


Figure 6. *CHS* mRNA accumulation in treated 2-week-old seedlings. **A.** In dark grown seedlings. Histograms show the normalized mean values of *PgCHS1* relative signal intensity presented as relative percentage value where 0 h were chosen as 100%. Thirty μg of total RNA was loaded in each lane. **B.** Light grown seedlings were treated for 6 h. Histogram represents data as percentage of the highest value, where the wound sample represent the 100% value. Ten μg of total RNA was loaded in each lane. Membranes were stripped and rehybridized with a 400 bp 18 S *Picea glauca* ribosomal probe (Ribo) to monitor equal loading of RNA samples. Right panels indicate the relative migration distance for the transcripts detected by the two probes in the 0 h samples and molecular weight (RNA marker, Promega). Each sample represents RNA isolated from pooled material from 30 seedlings. Histogram represents scanning values of the most representative hybridization experiment and is a mean of four different quantification results obtained from densitometry scan analyses as well as phosphor imager quantification. Error bars represent average deviation.

CHAPITRE III

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A PUTATIVE DEHYDRIN GENE FROM WHITE SPRUCE INDUCED UPON WOUNDING, DROUGHT AND COLD STRESSES

(ISOLATION ET CARACTÉRISATION D'UN GÈNE PUTATIF DE DÉSHYDRINE DE L'ÉPINETTE BLANCHE INDUIT PAR LES STRESS DE BLESSURE, DE SÉCHERESSE ET DE FROID)

Sylvie Richard: Fabrication de banque d'ADNc, criblage de la banque, analyse des séquences, étude d'expression.

Christine Drevet: Purification du clone *PgDhn1* et analyse des séquences.

Lise Jouanin: Direction des travaux à Versailles

Armand Séguin: Direction des travaux à Québec

Ce chapitre sera soumis dans la revue *Plant Molecular Biology*.

Isolation and characterization of a putative dehydrin gene from white spruce induced upon wounding, drought and cold stresses

Sylvie Richard¹, Christine Drevet², Lise Jouanin², and Armand Séguin^{1,3,†}

¹ Centre de recherche en biologie forestière, Pavillon C.-E.-Marchand, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada, G1K 7P4

² Laboratoire de biologie cellulaire, Institut National de la Recherche Agronomique, route de Saint-Cyr, F 78026 Versailles Cedex, France

³ Centre de foresterie des Laurentides, Service canadien des forêts, Ressources naturelles Canada, 1055 du P.E.P.S., Sainte-Foy, Québec, Canada, G1V 4C7

† author for correspondence

RÉSUMÉ

Un clone d'ADNc codant potentiellement pour un gène de déshydrine a été isolé d'une banque d'ADNc obtenue à partir d'ARNms provenant d'aiguilles de *Picea glauca*. Le clone d'ADNc, appelé *PgDhn1* (pour «*Picea glauca* dehydrin»), a une taille de 1 159 nucléotides, comprenant un cadre de lecture ouvert de 735 pb codant pour une séquence déduite de 245 acides aminés. La séquence protéique déduite de *PgDhn1* est hautement hydrophile et possède quatre segments K répétés (EKKGIMDKIKEKLPG) riches en lysine ainsi qu'une série de huit résidus sérine, commune à plusieurs déshydrines, précédant le premier segment K. Cependant, le motif conservé DEYGNP est absent de la séquence protéique putative de *PgDhn1*. Les ARNms correspondant à l'ADNc de *PgDhn1* sont induits chez des semis d'épinette blanche suivant un stress de blessures, de sécheresse ou de froid. Ils sont également induits par l'acide jasmonique (JA) et le méthyle jasmonate (MJ). Chez les plantes non-stressées, le plus haut niveau d'expression des transcrits a été détecté dans les tiges, certains stade des bourgeons mâle et végétatif et de façon moindre dans les racines. Le niveau de transcrits de *PgDhn1* dans les aiguilles et les bourgeons femelles était faible, et une augmentation d'ARNms a été observée dans les bourgeons végétatifs en développement ainsi que dans les bourgeons mâles. À la suite d'un stress de sécheresse, un fort niveau de transcrits est d'abord observé dans les tissus racinaires suivant 6 heures de traitement, puis dans les tissus foliaires suivant deux jours de sécheresse. L'induction par le froid de *PgDhn1* a été observée après 6 heures de stress chez des semis de deux semaines.

ABSTRACT

A cDNA clone encoding a putative dehydrin was isolated from a cDNA library prepared from white spruce needle mRNAs. The cDNA, designated *PgDhn1* (for *Picea glauca* dehydrin), is 1159 nucleotides long and has an open reading frame of 735 bp with a deduced amino acid sequence of 245 residues. The putative *PgDhn1* amino acid sequence is highly hydrophilic and possesses four conserved repeats of the characterized lysine rich K-segment (EKKGIMDKIKEKLPG), and an 8-serine residue stretch prior to the first lysine-rich repeat that is common to many dehydrins. However, the DEYGNP conserved motif is absent in the putative *PgDhn1* sequence. The mRNAs corresponding to *PgDhn1* cDNA were induced upon wounding, drought and cold treatment of white spruce seedlings. They were also induced by jasmonic acid (JA) and methyl jasmonate (MJ). In non-stressed plants, the highest level of transcripts was detected in stem tissue, certain stage of development from male and vegetative buds and in roots to a lesser extent. Transcript level in needles and female buds was low, and an increase in mRNAs was observed in developing vegetative buds as well as in developing male buds. Following drought stress, a high level of transcripts was observed first in root tissue after 6 h of treatment. A high level was reached in needle tissue after 2 days of drought stress. Cold-induction of *PgDhn1* transcripts was observed in 2-week-old seedlings after 6 h of treatment.

Key words: dehydrin, wounding, jasmonate, *Picea glauca*, cold, drought, stress

3.1 Introduction

During their life cycles, plants have to deal with various environmental stresses. A common element in response to many environmental stresses is cellular dehydration. A lack of soil moisture, low relative humidity, water loss from wounding [32], elevated temperatures [35] and reduced xylem conductivity caused by pathogens are among the conditions and treatments that can affect tissue water potential in plants and cause water deficiency symptoms. Plants have evolved many mechanisms to defend themselves against stresses. Dehydrin genes, which are also known as late embryogenesis abundant protein group II (LEA) or LEA D 11, have been most extensively studied in relation to drought and cold stresses. However, some examples exist where they are also induced upon wounding [36, 22, 15, 31, and for a review on dehydrin see 12, 13]. For instance in wheat, induction of transcripts of *Wcor410*, a dehydrin gene, is observed 3 h following wounding [15].

Dehydrins are characterized by conserved amino acid motifs, including a DEYGNP motif and a lysine-rich block (KIKEKLPG) often present in one or more copies [10, 11, 13, 18] and a string of serine residues, which is also a common feature of many dehydrins [40]. The lysine-rich block can also be viewed as a longer but less conserved stretch of amino acids, the K-segment (EKKGIMDKIKEKLPG) [for a review see 12, 13]. The polyserine region has been identified as a site for phosphorylation [34] and this phosphorylation is purportedly related to nuclear transport activity [22, 23, 33], but this tagging function of phosphorylation hypothesis needs further support. Other features can also be present in the dehydrin sequence like glycine-rich repeats [reviewed in 12, 13].

Dehydrins display no known enzymatic function but are predicted to act as stabilizers [4, 12, 13]. Close [12] hypothesized that dehydrin and compatible solutes act synergistically to stabilize macromolecules such as proteins and nucleic acids, thereby stabilizing the

protoplasm. This stabilization could be achieved through the hydration of the hydrophilic regions of the dehydrin resulting in the formation of an envelope of ordered water that, especially in the presence of compatible solutes, operates through a preferential exclusion mechanism to either drive a partially unfolded protein back into a folded state or at least inhibit further denaturation [12]. Immunoelectron microscopy analyses of the dehydrin Wcor410 from wheat have revealed that these proteins accumulate in the vicinity of the plasma membranes of the cells where freeze-induced dehydration is likely to be more severe [14], and these new results further support the hypothesis of stabilizing functions of dehydrins.

Using specific antibodies that recognize a dehydrin synthetic peptide (KIKEKLPG), Close *et al.* [10] reported the presence of dehydrins ranging from 15 to 120 kDa in several species of monocots and dicots and in two families of gymnosperms, the Pinaceae (*Pinus edulis* Engelm.) and the Ginkgoaceae (*Ginkgo biloba* L.). The only cloned dehydrin genes from conifers are the three DF65 cDNAs from Douglas-fir [25]. To date, studies concerning dehydrin in tree species have focused mainly on cold acclimation, stratification, freezing and desiccation tolerance [1, 3, 21, 25, 40]. Although information on dehydrin genes from various plant species is available, little is known about these genes in conifers. We report here the isolation of one cDNA clone from *Picea glauca* (Moench) Voss encoding a putative dehydrin isolated from a cDNA library derived from mRNAs that were pooled from needles of wounded, JA- or MJ-treated 2-year-old white spruce seedlings. In order to learn more about the potential role of dehydrin gene expression in conifers, we studied the effect of some stresses, as well as known mediating signal molecules of these stresses, on *PgDhn1* mRNA levels.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Plant material

Picea glauca (Moench) Voss seeds were germinated on moist filter paper in Petri dishes and grown at 22°C under a 16 h photoperiod, light intensity of 58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 2 weeks. Two-year-old white spruce seedlings, provided by the ministère des Ressources naturelles du Québec, which were phenologically maintained in a sustained growth rate during experiments, were kept under normal greenhouse conditions. Vegetative, male and female bud tissues were collected from 15-year-old field-planted trees [16] during the spring of 1996 (May 7, 17 and 29) and immediately stored on dry ice. Root material from non-stressed 2-year-old potted plants were harvested from plants that had been washed gently by soaking the roots in tap water for 1 min to remove soil or otherwise mentioned. Excess water was absorbed on Whatman paper and roots were cut and frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C.

3.2.2 Jasmonate and wounding treatments

Two-year-old plants were wounded by trimming the first 5-15 mm of various needle tips on every branch of the plant with scissors (5 plants per experiment). To study the systemic wound response, the needles of five bottom branches from the 2-year-old seedlings were initially severely wounded with scissors by removing their needle tips and material was harvested from five identified non-wounded branches toward the apical region of the seedlings (5 plants per experiment). Multiple mechanical wounding treatments on 2-year-old white spruce were carried out over the entire plant and repeated at 4-h intervals (20 plants per experiment).

JA treatments consisted in spraying the plants until they were dripping with a 100 μ M JA-solution [19] prepared in 0.05% Tween 20 (5 plants per experiment). In the time course experiment, plants were sprayed with 0.05% Tween 20 alone as a control treatment (5 plants per experiment, which were isolated in an adjacent greenhouse to avoid cross contamination of the treatments).

Plants treated with MJ (Bedoukian Research Inc.) were placed in plastic bags containing a cotton swab to which 500 μ L of a 10% MJ solution prepared in ethanol was added (5 plants per experiment) [19]. MJ control plants were in the same condition except that the swab contained only ethanol solution (5 seedlings per experiment which were isolated in a neighboring greenhouse). Care was taken to ensure that plants did not touch the swab.

Two-year-old plants were kept under normal greenhouse conditions during treatments. At collection time, plant material was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Northern analyses were performed in duplicate.

3.2.3 Drought and cold treatments

Cold treatment was performed by exposing the 2-week-old seedlings at 4°C (30 seedlings per experiment). Two-year-old seedlings (5 plants per experiment) were transferred to a growth chamber at 4°C under a 12-h photoperiod, with a light intensity of $79.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Drought stress was induced by leaving the 2-week-old shoots on dry filter paper at room temperature (30 seedlings per experiment). Two-year-old plants were washed completely to remove soil and left to dry on filter paper in the greenhouse (5 plants per experiment). To evaluate the water loss caused by the stress on 2-year-old plants, the fresh weight of the seedlings and weight prior to harvesting were measured. Relative water loss of the

plants was calculated as a ratio of water loss weight compared with initial fresh weight of the plant, which was considered as 100%.

Two-year-old plants were kept under normal greenhouse conditions during treatments unless specified. All tissues were collected at various intervals of the stress treatments, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Treatments and hybridization were done in duplicate.

3.2.4 cDNA library construction, screening, isolation and sequencing

A directionally cloned cDNA library was constructed in λ ZAP vector (Stratagene) using poly(A⁺) RNA, prepared from pooled fractions of total RNA isolated from needle tissue of 2-year-old white spruce seedlings that had been wounded, MJ-treated, or JA-sprayed at 2 h intervals for 8 h before harvesting. Total RNA was isolated according to Chang *et al.* [5] and poly(A⁺) RNA was purified with a PolyAtract mRNA Isolation System (Promega). The library contained 8.6×10^6 clones with 75% possessing an insert that varied in size from 0.5 to 4 kb (data not shown). The putative dehydrin cDNA was serendipitously isolated from the library while screening 1×10^6 clones of the library with a 358 bp PCR fragment probe bearing homology to a protein kinase gene (Richard and Séguin, unpublished). Plasmid purification was achieved using a QIA-prep-8 Plasmid Kit (QIAGEN) following *in vivo* excision of the cDNA clone. The complete nucleic acid sequence of both strands of the full length cDNA were determined using the dideoxy chain termination method [38] with an ABI 373 automated DNA sequencer stretch (Perkin-Elmer). Protein translation, nucleic acid and amino acid sequence alignments were performed using the GCG software package [17]. The hydrophathic character of the deduced protein was estimated according to Kyte and Doolittle [29] with the PEPLOT from GCG using a window of 9 residues [17].

3.2.5 Total RNA isolation and northern analysis

Total RNA from needles, roots and 2-week-old seedlings was isolated and purified according to Chang *et al.* [5] from pooled material of individuals used in each experiment. Total RNA from stems, roots of 2-year-old seedlings and from 5-10 vegetative, male and female buds of 15-year-old field-planted trees was extracted using the Chang *et al.* [5] extraction buffer together with the QIAGEN RNeasy total RNA kit. RNA was finally redissolved in DEPC-treated water and RNA concentrations were determined by absorbance value at 260 nm. Equal amounts of total RNA samples (10-30 μ g) were denatured with formamide/formaldehyde and fractionated on a 1.2% agarose formaldehyde gel [37]. Total RNA quality was confirmed by ribosomal RNA integrity observed by ethidium bromide staining of the gel. The gel was blotted onto Nytran Plus positively charged nylon membranes (Schleicher and Schuell), and fractionated RNAs were crosslinked to membranes by UV radiation.

3.2.6 Hybridization conditions

Probe production was realized through PCR amplification of the excised cDNA insert using T7 and SK primers in a reaction containing 0.1 μ M of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 100 ng of DNA, 0.025 units/ μ L *Taq* DNA polymerase (Boehringer Mannheim) and 1 x of the supplied reaction buffer. PCR was carried out for 35 cycles (94°C, 1 min; 50°C, 45 sec; 72°C, 1 min) followed by 10 min. at 72°C in a 480 DNA thermal cycle apparatus (Perkin Elmer). PCR products were purified using a QIAquick PCR purification kit (QIAGEN). Purified cDNA inserts were radioactively labeled by random priming with the High Prime labeling kit (Boehringer Mannheim). Radiolabeled probes were purified with QIAquick nucleotide removal kit (QIAGEN). Membranes were prehybridized in Church and Gilbert [8] buffer for 2 h prior to adding [α -³²P]-dCTP radiolabeled probe (1 x 10⁶ cpm/mL buffer). High-stringency hybridization conditions

were achieved by hybridizing the membranes at 65°C for 16 h and washing twice with 1 x SSC and 1% SDS at 65°C for 30 min. Membranes were stripped by boiling for 15 min in 0.1 x SSC and 0.1% SDS and rehybridized with a white spruce 400 bp 18 S ribosomal probe to monitor RNA loading quantity. The ribosomal probe was generated by PCR under the above mentioned conditions using 100 ng of *P. glauca* genomic DNA together with the primers NS51 and NS61 (5'-GGGGGAGTATGGTCGCAAGGC-3' and 5'-TCAGTGTAGCGCGGTGCGGC-3' respectively; [39]). Membranes were exposed on X-OMAT™ AR Scientific Imaging Film (Kodak) for 12-36 h and/or exposed to a Storage Phosphor Screen where hybridization signals were recorded with a Fuji Bio imaging analyzer.

Quantifications of transcript accumulation were evaluated by a Phosphor imager analyzer and by densitometric measurement of autoradiograms using the RFLPscan Plus 3.0 program (Scanalytics, a division of CSP inc.). Results were normalized for an equal loading quantity of ribosomal signals. Histograms illustrate the quantification of the most representative hybridization experiment (shown) where errors bars represent the degree of error in the quantification method. In the analyses, we considered a difference of magnitude of transcript accumulation of two-fold or greater to be significant.

3.2.7 DNA isolation and Southern

Picea glauca genomic DNA was extracted from white spruce embryogenic calli as described by Charest *et al.* [7]. Genomic DNA was dissolved in water and digested with restriction enzymes (*Bgl* II, *EcoR* I and *Hind* III), fractionated by agarose gel electrophoresis (0.8% w/v) and transferred onto Nytran Plus membranes following the manufacturer's recommendations. Hybridization conditions were as previously mentioned except that the hybridization and washes were performed at 60°C and washes

were in 2 x SSC and 0.1% SDS. DNA extraction and Southern experiments were done in duplicate.

3.3 Results and discussion

3.3.1 Isolation of *PgDhn1*, sequence analysis and comparison

The putative dehydrin cDNA was serendipitously isolated while screening for a protein kinase clone. *PgDhn1* is presumably a full-length cDNA clone encoding a putative dehydrin gene from the conifer *P. glauca*. The nucleotide sequence of *PgDhn1* is accessible on the GenBank Database under accession number AF109916. *PgDhn1* is 1159 nucleotides long and possesses an open reading frame of 735 bp encoding a deduced 245 amino acids polypeptide with a predicted molecular weight of 27 kDa and a pI of 6.9. A stop codon (TAA) is present in frame, 99 nucleotides upstream of the putative ATG translation start codon [27] (Figure 1A).

PgDhn1 is similar to the dehydrin gene from various plant species and possesses many of the characteristic features shared by several dehydrins. The deduced protein encoded by *PgDhn1* has four repeated K-segments of 15 amino acids (EKKGIMDKIKEKLPG) [12], and an 8-serine residue stretch upstream of the first K-segment (Figure 1A). In the last three K-segments, we observed, at the same position, the insertion of one amino acid at the fourth position of these segments (Figure 1B). However, the first repeat from *PgDhn1* as well as the three proteins deduced from Douglas-fir sequences [25] do not possess such an insertion and this insertion is also absent from known angiosperm K-segments as reported by Close [12]. This suggests that the insertion occurred before the segment duplication event took place in the *PgDhn1* gene but after the divergence between angiosperms and gymnosperms. So the first segment here appears ancestral to the three others. However, the lysine-rich block (KIKEKLPG) in the last three K-segments are

more similar to the angiosperm lysine-rich block than the ones observed in Douglas-fir [25]. Since the extra amino acid lies outside the highly conserved lysine-rich block, there could have been less constraints in this part of the K-segment leading to subsequent amino acid substitution. Highly conserved blocks of 13 and 7 amino acids upstream and downstream respectively of the last three K-segments were observed (Figure 1B). These conserved regions have not been reported to date in other known dehydrins, further supporting the occurrence of a duplication event of the K-segment in *PgDhn1*. This finding suggests an important role of these amino acids in the still unknown function of this K-segment. The conservation of the K-segment in *PgDhn1* confirms that gymnosperms are not different from angiosperms with respect to the dehydrin K-segment, and brings in new data to update the speculation of Close [13] on the differences observed in this segment while comparing the three known sequences of Douglas-fir [25] and other known dehydrins.

The presence of an 8-serine residue stretch in the *PgDhn1* polypeptide raises the possibility of a phosphorylatable dehydrin [34] in spruce, as well as a potential nuclear targeting function [22]. The deduced sequence of *PgDhn1* does not possess the conserved DEYGNP motif that is present in several known dehydrins; however, there are some examples of dehydrins lacking this conserved motif in angiosperms as well as in Douglas-fir [25]. The three cDNA DF65 clones isolated from a 2-week chilled Douglas-fir seed cDNA library by subtractive hybridization were found to be expressed in stratified seeds (4°C and moist dormance breakage treatment) but not in those left at 20°C [25]. The DF65 ORF was identified on the basis of strong sequence homology with class II LEA proteins. However, the lysine-rich block was not perfectly conserved and the DEYGNP motif, as well as the continuous run of nine serines, were absent from them [25]. *PgDhn1* shares the general tendency of dehydrins to be free of tryptophan and cysteine residues [9] in that it possesses no tryptophan and only two cysteine residues (Figure 1A). Many similarities exist between *PgDhn1* and a dehydrin from wheat (*Wcor410*); both share the

same ratio of glycine residues (13.5%), contain similar amounts of glutamic acid residues (13.5% and 15.3% for PgDhn1 and Wcor410 respectively) and do not possess any glycine-rich repeats [15]. Based on the glutamate-rich composition, the absence of glycine-rich repeats as well as the conserved DEYGNP, Danyluk *et al.* [15] suggested that Wcor410 was part of a subfamily of dehydrins. Given these shared similarities with Wcor410, PgDhn1 could presumably be another member of this subgroup.

The number of K-segments in dehydrin proteins being variable (between 1-11 [12]), it is therefore unusual to have a very high degree of homology over the entire length of known dehydrin sequences. It was reported that most dehydrin sequences have an average of 50% identity [2]. Comparison of angiosperm dehydrins and PgDhn1 (at the amino acid level) showed between 41.6-57.4% similarity and between 35.2-48.2% identity, where identity corresponds to proportion of shared amino acids, and similarity is the match and mismatch scores of amino acids according to a matrix of evolutionary distances between them. The highest scores (57.4% similarity, 48.2% identity) were obtained with dhnl from *Sorghum vulgare* (Figure 2). Identity scores obtained with the DF65 cDNA clones from Douglas-fir [25] were 32-34% over 54 residues (data not shown).

PgDhn1 is a highly hydrophilic protein in which only a small part, located in the first 20 amino acid residues, is hydrophobic (Figure 3), a general characteristic of dehydrins [11]. Using restriction enzymes that do not cut *PgDhn1* (*Bgl* II), Southern analysis has revealed that *PgDhn1* could possibly be part of a small gene family with two to four members in white spruce (Figure 4). Duplicate experiments have shown similar results.

3.3.2 *PgDhn1* expression in tissues of non-stressed plants

Differences in transcript levels were observed in non-stressed plant tissues of 2-year-old plants and from buds of 15-year-old field-planted trees (Figure 5). A high level of

expression was observed in stem tissue. The *PgDhn1* probe was able to detect more than one transcript reflecting the possible expression of other members of the dehydrin family in *P. glauca*. This hybridization is likely to occur based on the high homology as well as the high number of the K-segments between known sequences. In stem tissue RNAs, at least three different sized transcripts were observed compared with two in other tissues with particular transcript being more important in one tissue compared with another. This may corroborate other dehydrin studies on trees in which many dehydrins were expressed in bark tissue, with some being seasonally expressed and others constitutively [40]. The peak observed in the accumulation of *PgDhn1* in vegetative buds at stage 2 corroborates with the period when buds are decapsulating, which exposes the forming needle tissue to the air. The removal of the protective sheath from the needles probably creates drought stress. This stress then likely up-regulates *PgDhn1* accumulation to counteract the cellular dehydration stress. As needles mature and create protection through wax deposition, *PgDhn1* level returns to those of unstressed needles. In male buds, *PgDhn1* transcripts accumulate to higher level at stage 2. *PgDhn1* expression in this tissue could be related to the maturation of the pollen, which undergoes dehydration by the end of its maturation before being dispersed by the wind as cones open (stage 3). This might also be the reason why in stage 3 the transcript level is less important than in stage 2, as pollen have already started to get out of the cones. Since all bud types were collected on the same day, a climate stress caused by temperature is not likely to be involved in *PgDhn1* accumulation, otherwise a similar effect would have been expected in the female buds as well.

3.3.3 Effect of wounding and jasmonate treatments on *PgDhn1* transcript expression

Since *PgDhn1* was isolated from a cDNA library isolated from wounded and jasmonate treated white spruce, we first wanted to investigate whether or not the presence of this

putative dehydrin mRNA had been induced by these treatments or whether it was constitutively expressed.

Experiments were undertaken to analyze the expression of *PgDhn1*. Kinetics experiments were performed following the occurrence of a single treatment ($t = 0$) (Figure 6A). In the wound time course experiments, seedlings were severely wounded by cutting the needles from each branch; needles were harvested at the times indicated. No significant transcript level variation occurred following this treatment.

A systemic wound response was induced by harshly cutting the needles from basal branches at $t = 0$ and subsequently collecting material from upper branches. Systemic accumulation was observed upon wounding of basal branches. This accumulation reached a maximum level after 6 h and was lowered by 24 h and close to initial level (Figure 6A). This systemic accumulation of mRNAs involved the activation of a mediator in the wound response to activate transcript accumulation. Duplicate experiments have shown similar results.

Jasmonate refers generally to JA and MJ. These compounds are known to be involved in the wound response that results in the induction of defense proteins, like protease inhibitors and enzymes involved in the phenylpropanoid pathway [20]. Treatments were performed to determine if a wound inducible dehydrin transcript could also be induced by jasmonate. Following a single application of JA, *PgDhn1* mRNAs began to accumulate after 1 h. *PgDhn1* transcript levels remained constant up to 6 h, then began to rise suggesting that JA might act upstream of the *PgDhn1* mediator in the cascade of reaction leading to the gene activation. JA-treatment had an effect similar to that of the systemic wound response in their maximum level of accumulated transcripts. No significant variation in transcript level was observed upon the application of Tween 20 alone (JA control, data not shown). Duplicate experiments have shown similar results.

In the kinetic experiment of MJ treatment, we observed first an accumulation of mRNAs at 1 h, followed by a diminution of transcripts levels. This level was back to a non-induced level by 6 h followed by a second increase at 24 h. However, this latter increase was not significant since ethanol treatment (MJ control) had a similar effect on transcript level, while it remained stable from 0-6 h (inclusively, data not shown). Duplicate hybridizations showed a similar effect.

Further experiments were undertaken to see if there could be any cumulative effects on transcript accumulation by multiple treatments. Multiple wound treatments had a strong effect on *PgDhn1* mRNA accumulation. Transcript levels increased after 4 h following the first wound treatment and reached a maximum after 8 h (Figure 6B). As for wounding, the highest level of transcripts was observed after 8 h following the first JA application. When comparing with the JA induction observed in Figure 6A where transcript level was already diminishing after 4 h, it seems that the second JA application at 4 h resulted in a further accumulation of *PgDhn1* transcripts resulting in a higher maximum level at 8 h (Figure 6B). The only difference between MJ treatments in Figures 6 A and B was the collection time since treated plants were in constant contact with MJ vapors during the experiment. MJ-treated plants also showed an increase of expression that remained constant over the period analyzed (Figure 6B).

The difference between the transcript accumulation patterns of wound and systemic wound response likely reflects the action of an endogenous signal molecule that must migrate through the plants to systemically activate the transcript accumulation of *PgDhn1*. The cumulative effect on transcript accumulation in the multiple wound treatment is closely associated with greater water loss through more open surfaces arising in the former treatment compared with a single wound treatment.

In the kinetic analysis, the MJ response was similar to the JA response with respect to the accumulation pattern of the transcripts, however at a lower level. The difference between the results with JA and MJ could simply be a matter of differing internal concentrations of jasmonates.

3.3.4 Effect of drought and cold stresses on transcript accumulation

To investigate if *PgDhn1* mRNAs could accumulate under drought and cold treatments, seedlings were subjected to these stresses. Drought treatment of the 2-year-old seedlings induced accumulation of *PgDhn1* transcripts 6 h after the stress was imposed (Figure 7). By then, plants had already lost an average of 30% of their fresh weight in water. Transcript level was higher in roots than in needle tissue, reflecting a severe initial effect of drought treatment on the roots of the plant. After 2 days of drought, the plants had lost an average of 66% of their fresh weight in water, and at this stage, plants seemed to be beyond the possibility of recovery since needles were dried out and were falling off their branches as we handled the seedlings. At that point, root accumulation of transcripts was still high. In needles, a 2-day stress caused a higher accumulation of *PgDhn1* mRNAs than a 6-h stress. This delay might reflect the rate of water loss from needle tissue compared with roots, or the sensitivity of roots exposed to air. However in the case of root transcript accumulation, we cannot ascertain at this time whether or not this response reflects only the drought response and not a response to washing the soil from the roots, which could create a stress or a possible combination of the two stresses.

Results of the various treatments of 2-week-old seedlings after 6 h show a strong induction in cold-stressed seedlings as well as those that were wounded, or treated with JA and MJ (Figure 8). In dark grown seedlings, a 6-h drought treatment had a stronger effect on *PgDhn1* transcript accumulation than in cold treatment (data not shown). Cold treatment of 2-year-old plants led to an accumulation of mRNAs in needle tissue which

was higher after 2 days of stress than after 6 h (data not shown). Cold induction of *PgDhn1* was also observed in stratified seeds of *P. glauca* (exposed to moisture at 4°C to initiate seed germination) where transcript level was higher in comparison with the expression observed in non-stratified seeds exposed to 22°C (data not shown).

The work of Cellier *et al.* [6] has shown a correlation between drought-adaptative response and dehydrin transcript accumulation in lines of sunflowers. Differences were observed between resistant and tolerant sunflower lines, where transcripts were strongly increased in the resistant plants compared with the susceptible ones. Recent work by Danyluk *et al.* [14] has also shown that the expression of the dehydrin *Wcor410* gene was associated with freezing tolerance in several *Gramineae* species, and that the accumulation of *Wcor410* proteins correlated well with the capacity to cold acclimate and the development of freezing tolerance as well.

Even though no clear evidence exists between drought and cold resistance capacity of plants and the presence or absence of dehydrin gene in the genome, more evidence suggests that the control of the expression of these genes in plants correlates well with their ability to resist these stresses. With its accumulating characteristics upon several stresses such as cold, drought and wounding, *PgDhn1* becomes an interesting candidate to pursue for stress resistance in white spruce and other conifers. Since *PgDhn1* is closely related to *Wcor410* based on their sequence characteristics, it would be interesting to see if *PgDhn1* would also be involved in freezing and drought tolerance of white spruce.

3.4 Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Luc Giasson and Dr. Jérôme Laroche for helpful discussions, Maria D. Luckevich for help with RNA extraction and for reviewing the text, and François Laroche, Claude Fortin and Henning Heinemann for technical support.

This research was supported by a grant to A.S. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and to A.S. and L.J. from the "Programme de coopération franco-québécois en science et technologie". S.R. was in part supported by scholarships from La Fondation de l'Université Laval, Le Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche and The Canadian Federation of University Women.

3.5 References

1. Arora R, Wisniewski ME: Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus persica* [L.] Batsch). II. A 60-Kilodalton bark protein in cold-acclimated tissues of peach is heat stable and related to the dehydrin family of proteins. *Plant Physiol* 105: 95-101 (1994).
2. Artlip TS, Callahan AM, Bassett CL, Wisniewski ME: Seasonal expression of a dehydrin gene in sibling deciduous and evergreen genotypes of peach (*Prunus persica* [L.] Batsch). *Plant Mol Biol* 33: 61-70 (1997).
3. Cai Q, Moore GA, Guy CL: An unusual Group 2 LEA gene family in citrus responsive to low temperature. *Plant Mol Biol* 29: 11-23 (1995).
4. Campbell SA, Crone DE, Ceccardi TL, Close TJ: A ca. 40 kDa maize (*Zea mays* L.) embryo dehydrin is encoded by the *dhn2* locus on chromosome 9. *Plant Mol Biol* 38: 417-423 (1998).
5. Chang S, Puryear J, Cairney J: A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* 11: 113-116 (1993).

6. Cellier F, Conéjéro G, Breitler J-C, Casse F: Molecular and physiological responses to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower. *Plant Physiol* 116: 319-328 (1998).
7. Charest PJ, Devantier Y, Lachance D: Stable genetic transformation of *Picea mariana* (black spruce) via particle bombardment. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 32: 91-99 (1996).
8. Church GM, Gilbert W: Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1991-1995 (1984).
9. Close TJ, Kortt AA, Chandler PM: A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Mol Biol* 13: 95-108 (1989).
10. Close TJ, Fenton RD, Moonan F: A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide. *Plant Mol Biol* 23: 279-286 (1993).
11. Close TJ, Fenton RD, Yang A, Asghar R, DeMason DA, Crone DE, Meyer NC, Moonan F: Dehydrin: The Protein. In: Close, TJ, Bray EA (eds) *Plant responses to cellular dehydration during environmental stress*. pp. 104-117. The American Society of Plant Physiologists, Maryland (1993).
12. Close TJ: Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant* 97: 795-803 (1996).
13. Close TJ: Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant* 100: 291-296 (1997).

14. Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler B, Benhamou N, Sarhan F: Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell* 10: 623-638 (1998).
15. Danyluk J, Houde M, Rassart É, Sarhan F: Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant gramineae species. *FEBS Lett* 344: 20-54 (1994).
16. Daoust G, Plourde A, Beaulieu J: Influences of crown size and maturation on flower production and sex expression in *Picea glauca* treated with gibberellin A₄₇. *Tree Physiol* 15: 471-475 (1995).
17. Devereux J, Haerberli P, Smithies O: A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* 12: 387-395 (1984).
18. Dure L III, Crouch M, Harada J, Ho T-HD, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung ZR: Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol Biol* 12: 475-486 (1989).
19. Farmer EE, Johnson RR, Ryan, CA: Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol* 98: 995-1002 (1992).
20. Farmer EE: Fatty acid signaling in plants and their associated microorganisms. *Plant Mol Biol* 26: 1423-1437 (1994).
21. Finch-Savage WE, Pramanik SK, Bewley JD: The expression of dehydrin proteins in desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of temperate trees. *Planta* 193: 478-485 (1994).

22. Goday A, Pla M, Niogret MF, Jensen A, Figueras M, Pagès M: Regulation of the *rab17* gene in ABA-deficient and ABA-insensitive viviparous mutants of maize. In: Cherry JH (ed) Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants, NATO ASI Series, Vol II 86, pp. 335-343. Springer-Verlag, Berlin (1994).
23. Godoy JA, Lunar R, Torres-Schumann S, Moreno R, Rosa M, Pintor-Toro JA: Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol Biol* 26: 1921-1934 (1994).
24. Grossi M, Gulli M, Stanca AM, Cattivelli L: Characterization of two barley genes that respond rapidly to dehydration stress. *Plant Sci* 105: 71-80 (1995).
25. Jarvis SB, Taylor MA, MacLeod MR, Davies HV: Cloning and characterization of the cDNA clones of three genes that are differentially expressed during dormancy-breakage in the seeds of Douglas Fir (*Pseudotsuga menziesii*). *J Plant Physiol* 147: 559-566 (1996).
26. Kiyosue T, Yamaguchi-Schinozaki K, Shinozaki K: Characterization of two cDNAs (ERD10 and ERD14) corresponding to genes that respond rapidly to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 35(2): 225-231 (1994).
27. Kosak M: The scanning model for translation: An update. *J Cell Biol* 108: 229-241 (1989).
28. Kusano T, Aguan K, Abe M, Sugawara K: Nucleotide sequence of a rice *rab16* homologue gene. *Plant Mol Biol* 18: 127-129 (1992).

29. Kyte J, Doolittle RF: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105-132 (1982).
30. Lang V, Palva ET: The expression of a *rab*-related gene, *rab18*, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol Biol* 20: 951-962 (1992).
31. Luo M, Liu J-H, Mohapatra S, Hill RD, Mohapatra SS: Characterization of a gene family encoding abscisic acid- and environmental stress-inducible proteins of *Alfalfa*. *J Biol Chem* 267: 15367-15374 (1992).
32. MacHardy WE, Beckman CH: Water relations in American elm infected with *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology* 63: 98-103 (1973).
33. Meier UT, Blobel G: Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm. *Cell* 70: 127-138 (1992).
34. Plana M, Itarte E, Eritja R, Goday A, Pages M, Martinez MC: Phosphorylation of maize RAB-17 protein by casein kinase 2. *J Biol Chem* 266: 22510-22514 (1991).
35. Reid DM, Wample RL: Water Relations and Plant Hormones. In: Pharis RP, Reid DM (eds) *Hormonal Regulation of Development III. Role of Environmental Factors*. *Encyclopedia of Plant Physiology New Series*. Volume 11, pp. 513-578. Springer-Verlag, New York (1985).
36. Rouse DT, Marotta R, Parish RW: Promoter and expression studies on an *Arabidopsis thaliana* dehydrin gene. *FEBS Lett* 381: 252-256 (1996).

37. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: **Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Edn.** CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY (1989).
38. Sanger F, Nicklen JA, Coulson AR: **DNA sequencing with chain terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467 (1977).
39. Simon L, Lalonde M, Bruns TD: **Specific amplification of 18 S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots.** *Appl Environ Microbiol* 58: 291-295 (1992).
40. Wisniewski M, Close TJ, Artlip T, Arora R: **Seasonal patterns of dehydrins and 70-kDa heat-shock proteins in bark tissues of eight species of woody plants.** *Physiol Plant* 96: 496-505 (1996).

1 GAATTCGGCAGGAGCGTTTAATTCGGCTGTATATCGTCTGGAATTTTGACGAAGTTA 60
 61 TTTACTCATTCTGCTATACATATCTGGATTTGTTCTTTGAGAGCTTAAGTATTAATATGG 120
 121 CCGAACAAAGCGCCAGAGCACCAGGACCGCGGTATGTTTGGTCTATTTCGGTAAGAAGAAGG 180
 E Q A P E H Q D R G M F G L F G K K K E -
 181 AAGAGGAGGGAAGGCAGGATGATCAGATTTTCGCAGACTCCTGCCACTCATACCCACAATG 240
 E E G R Q D D Q I S Q T P A T H T H N E -
 241 AGGCTCAGACTGAGGCTGCTTCGTATTATCCAACCTCTCCGCATGAAGTAAAACACGGCC 300
 A Q T E A A S Y Y P T S P H E V K H G P -
 301 CGGGTCACGGTCACGAAGGGCAACTTACACCTGAAGAAGCTGAGCAACAGAAGCATAAGG 360
 G H G H E G Q L T P E E A E Q Q K H K G -
 361 GTTTGGTGGAAAGCTTCACCGCACGCACAGTTCCAGCTCCAGCTCTTCGAGCGATGAAG 420
 L V G K L H R T H S S S S S S S D E E -
 421 AGGAGGAAGGGCGGAAGAAGAAGAAGTGGGGAGGAAGAAGAAGGGCGCAAAGGACAAGA 480
 E E G G K K K E V G R K K K G A K D K T -
 481 CCAAGGAAAAGCTCCCCCTCGGGGACATCATTCTTCAGATCATTGTGGGGGTGAAGAGA 540
 K E K L P S G G H H S S D H C G G E E K -
 541 AGAAGAAGGGCGGTATGGTAGATAAAATCAAAGAGAAGCTCCCGGGACATCAGGAAAAGC 600
 K K A G M V D K I K E K L P G H Q E K L -
 601 TCCCCGCCGGGAGAACATTCTTCAGATCAGTGTGGGACTAAAGAGGAGAAGAAGACGG 660
 P A G G E H S S D Q C G T K E E K K T G -
 661 GTCTGCTAGATAAAATCAAAGATAAGCTCCCGGGACACCAGGAAAAGCTCCCCGGGGGGCG 720
 L L D K I K D K L P G H Q E K L P G G G -
 721 GACAGCATTCTTCAGATCAGTATGGGGTAAACAGGAGAAGAAGATGGGTTTGTAGATA 780
 Q H S S D Q Y G G K Q E K K M G L L D K -
 781 AAATCAAAGAGAAGCTCCCGGGACACGAAAACAGAACGATGGGGAAAGAGGAAGAGAAAA 840
 I K E K L P G H E E N K N D G E E E K K -
 841 AGCATCCGCATTTAATGTACTGTAAACAAGACCTTCTGCCAGATGGGAATCTGTGTTTA 900
 H P H *
 901 ACTCTTCTGGGAATCTGTGTTAACTCTTCTTGGCTTTGCTTGCGAGCATGGATGAGAA 960
 961 TAATCGTATGTGCGTGTGTGGGGTTTTAGTTAGTAATGTGCATTTGTTGAAGAGAGGAT 1020
 1021 CAAAGATATCAATGTGATCCGATCGATCTGCATTGCCATGTTTATAGTTTGGATTAGGTGG 1080
 1081 GAATTAGCTTGATAGGGTTCAGAGCACCAGCTACCTGAGCGTATGTCCGATTATCGTT 1140
 1141 TAAAGTTGAAGTTATTAAT 1159

A

E E G G K K K E V G R K K K . G A K D K T R E K L P S

G G H S S D H C G G E E	<u>K K K A G M V D K I K E K L P G</u>	H Q E K L P A
G G E H S S D Q C G T K E	<u>E K R T G L L D K I K D K L P G</u>	H Q E K L P G
G G Q H S S D Q Y G G K Q	<u>E K K M G L L D K I K E K L P G</u>	H E N K N D G

B

Figure 1. A. Nucleotide sequence and predicted translation product encoded by the *PgDhn1* cDNA clone. The amino acid sequence is given in the single-letter code. A possible polyadenylation signal, the putative transcription start site [27] and the stop codons that are marked by an asterisk are double underlined. Conserved consensus sequences are singly underlined and the lysine-rich blocks are italicized. This sequence is available from the GenBank Nucleotide Sequence Database, accession No. AF109916. **B.** Partial inferred *PgDhn1* amino acid sequence. K-segments have been aligned, for a maximal similarity, a gap was introduced in the first segment. Highly conserved amino acids surrounding the three last K-segments are framed.

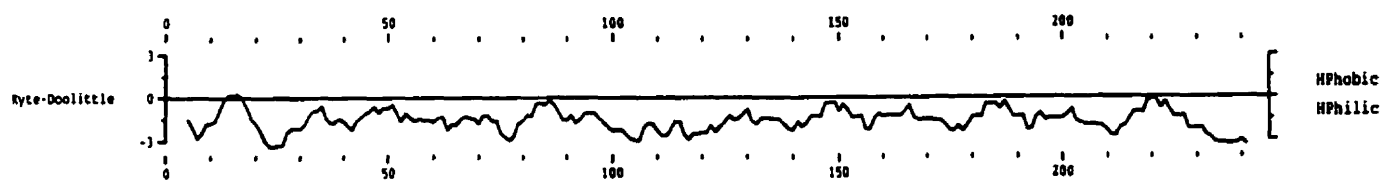


Figure 3. Hydrophobicity of PgDhn1 estimated according to Kyte and Doolittle [29].

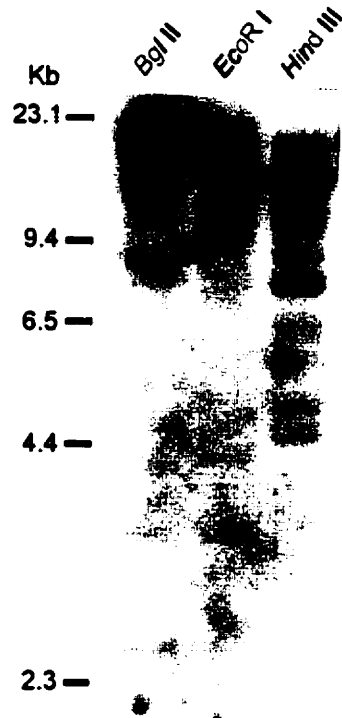


Figure 4. Southern analysis of *PgDhnI*. Genomic DNA (15 μ g) was digested with *Bgl* II, *EcoR* I and *Hind* III. DNA fragments of λ DNA digested with *Hind* III were used as molecular mass markers (indicated at the left).

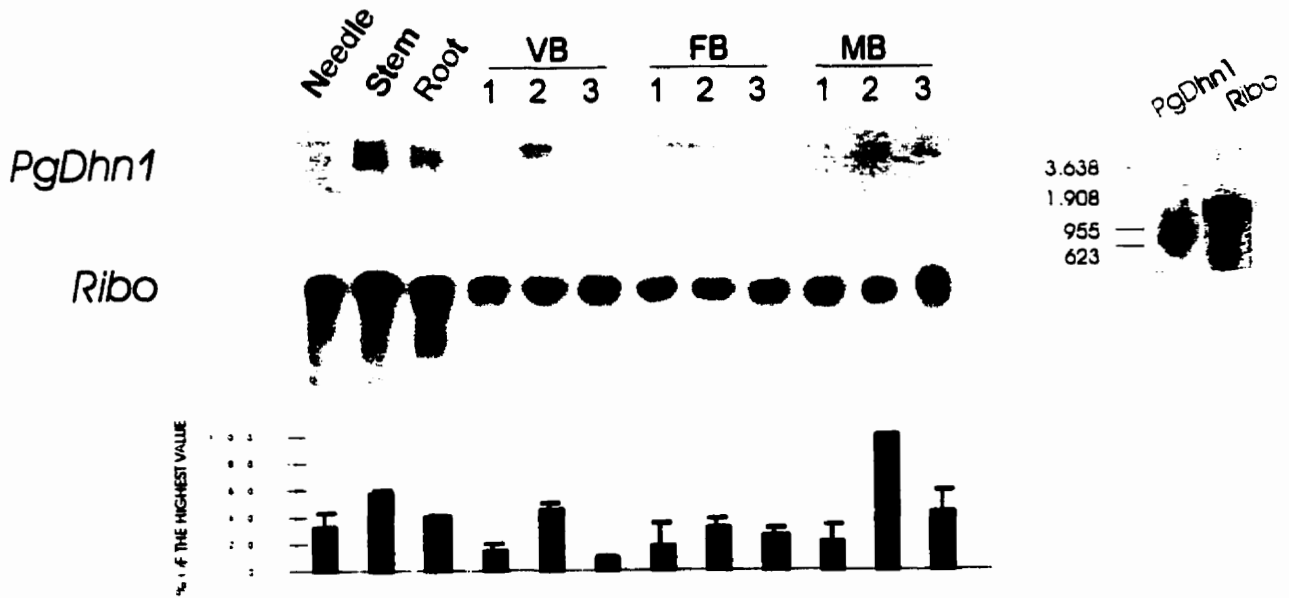
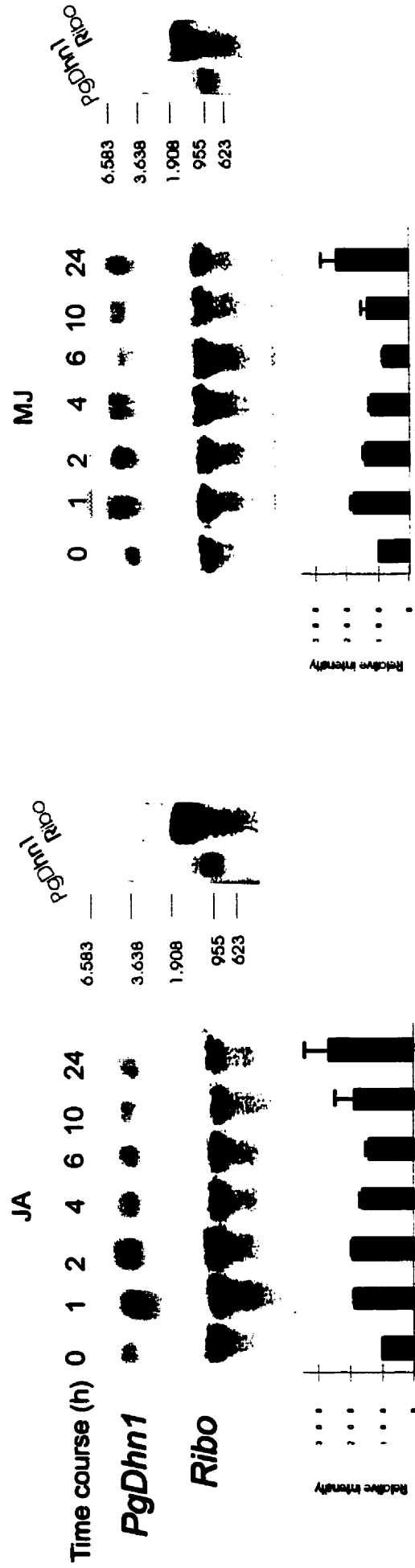
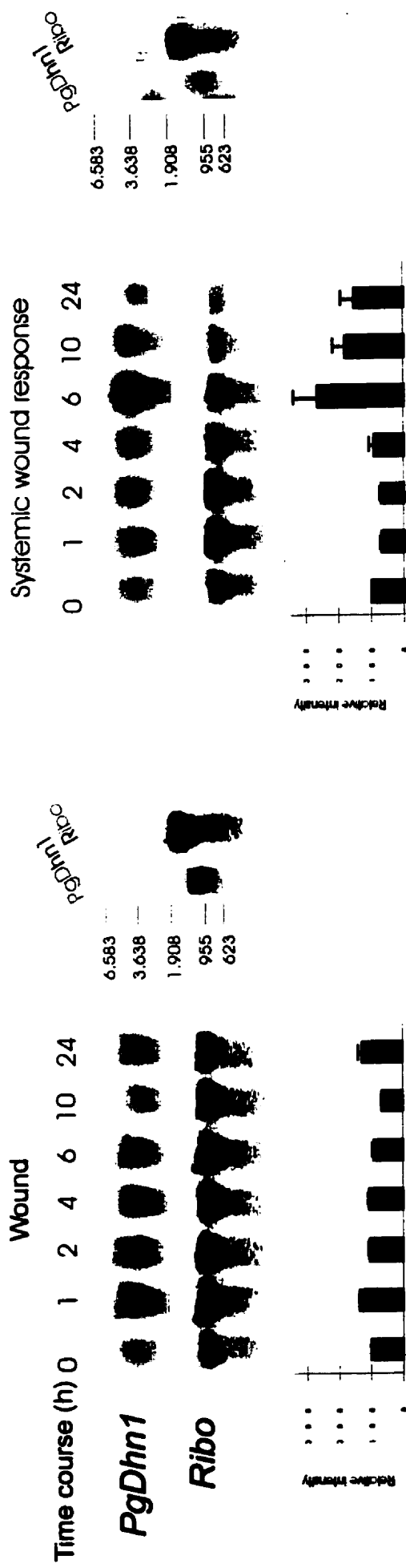


Figure 5. Tissue-specific accumulation of *PgDhn1* transcript in various tissues. Needle, stem and root from 2-year-old seedlings (pooled material from 5 seedlings), and VB (vegetative bud), FB (female bud) and MB (male bud) of 15-year-old field-planted trees (5-10 buds) and where 1 to 3 stand for different stages of bud differentiation starting from early differentiation in spring (1) to fully expanded buds (3) and refer to the harvesting time. The membrane was stripped and rehybridized with a 400 bp 18 S *Picea glauca* ribosomal probe (Ribo) to monitor loading quality. Approximately 10 μ g of total RNA were loaded in each lane. Right panel indicates the relative migration distance for the transcripts detected with the two probes in the stem sample and molecular weight (RNA marker, Promega). Histogram shows the normalized mean values of *PgDhn1* relative signal intensity presented as percentage of the highest value, where MB 2 was 100% intensity. Intensity values represent the intensity of all the detected transcripts. Histogram represents scanning values of the most representative hybridization experiment and is a mean of four different quantification results obtained from densitometry scan analyses as well as phosphor imager quantification. Error bars represent average deviation.

A



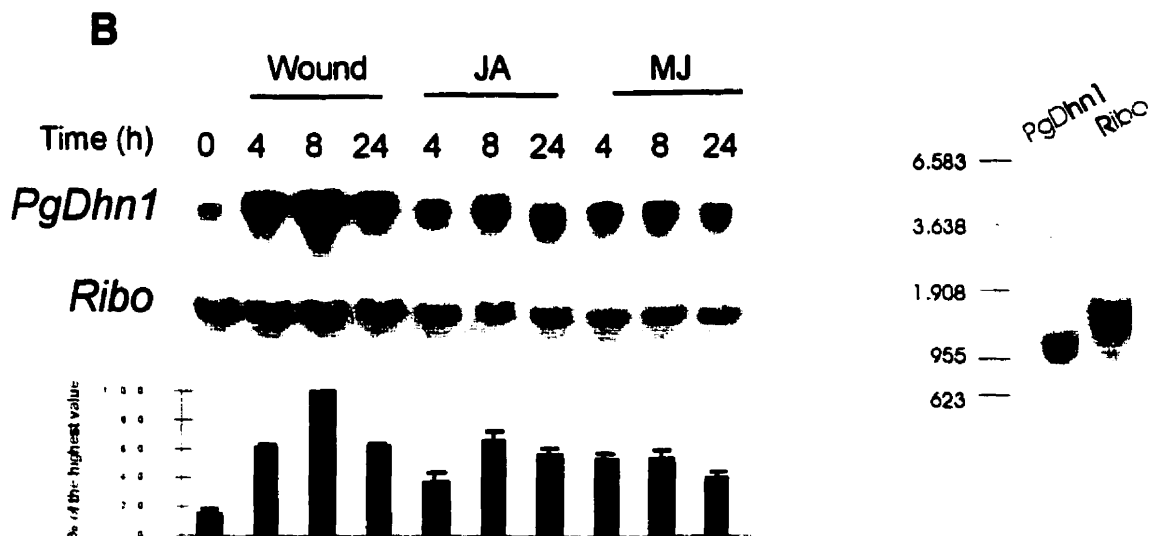


Figure 6. A. *PgDhn1* transcript accumulation in needles of 2-year-old seedlings following a single treatment. Two-year-old seedling needles were severely wounded throughout the entire plant or just on basal branches for systemic wound response at time 0. For the systemic analysis, tissue collection was only from branches above the wounded ones. A single JA-treatment consists in spraying plants to saturation at time 0. MJ-treated plants were placed in plastic bags containing a cotton swab bearing a MJ solution. Time indicates the harvesting period following the beginning of the treatment. Histograms show the normalized mean values of *PgDhn1* as relative signal intensity, where t = 0 was chosen as 100% intensity. **B.** Northern analysis of *PgDhn1* mRNA accumulation following multiple wound and JA treatments and MJ treatment on 2-year-old white spruce seedlings. Plants were wounded or treated with JA at time 0, 4 and 8. MJ-treated plants were as described in A. Time 0 represents material prior to any of the mentioned treatments. Collection times of the material are indicated. Histograms show the normalized mean values of *PgDhn1* relative signal intensity presented as percentage of the highest value, where wounding 8 h was 100% intensity. Membranes were stripped and rehybridized with a 400 bp 18 S *Picea glauca* ribosomal probe (Ribo) to monitor loading quality. Thirty μ g of total RNA were loaded in each lane. Samples represent RNA from pooled needles of five individuals except for wound in B (20 seedlings). Right panels indicate the relative migration distance for the transcripts detected with the two probes in the t = 0 samples and molecular weight (RNA marker, Promega). Intensity values represent the intensity of all the detected transcripts. Histogram represents scanning values of the most representative hybridization experiment and is a mean of four different quantification results obtained from densitometry scan analyses as well as phosphor imager quantification. Error bars represent average deviation.

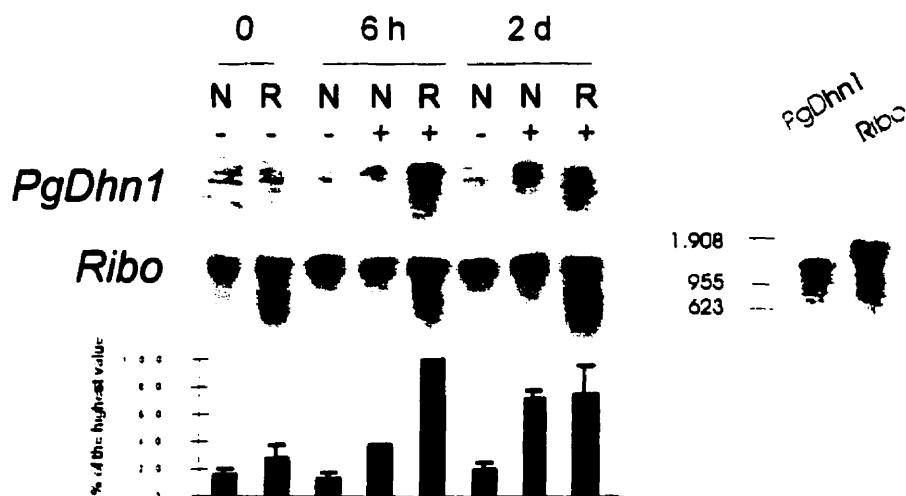


Figure 7. Northern analysis of *PgDhn1* during drought treatment of 2-year-old seedlings. N (needle), R (root), + and - signs refer to the occurrence or absence of treatment respectively. Time 0 represents tissues collected immediately after plants were washed to remove soil. Control needle expression at time 6 h and 2 days originated from non-washed plants. Membranes were stripped and rehybridized with a 400 bp 18 S *Picea glauca* ribosomal probe (Ribo) to monitor loading quality. Samples represent RNA from pooled material from five individuals. Thirty μ g of total RNA were loaded in each lane. Right panel indicates the relative migration distance for the transcripts detected in the R 6 h + sample and molecular weight (RNA marker, Promega). Histogram shows the normalized values of *PgDhn1* presented as percentage of the highest value, where R 6 h + was 100% intensity. Histogram represents scanning values of the most representative experiment and is a mean of four different quantification results obtained from densitometry scan analyses as well as phosphor imager quantification. Error bars represent average deviation.

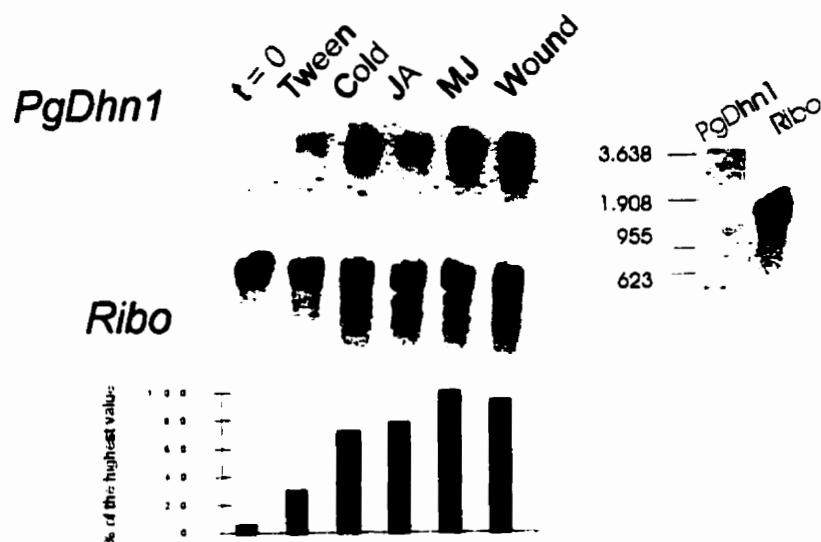


Figure 8. Comparison of *PgDhn1* mRNA accumulation upon several stresses of 2-week-old light grown seedlings. Seedlings were treated for 6 h, t = 0 represents the basal expression prior to any treatments. The membrane was stripped and rehybridized with a 400 bp 18 S *Picea glauca* ribosomal probe (Ribo) to monitor loading quality. Approximately 10 μ g of total RNA were loaded in each lane. Right panel indicates the relative migration distance for the transcripts detected in the t = 0 sample and molecular weight (RNA marker, Promega). Histogram shows the normalized values of *PgDhn1* presented as the percentage of the highest value, where MJ was 100% intensity. Samples represent RNA from pooled material from 30 seedlings. Histogram represents scanning values of the most representative hybridization experiment and is a mean of three different densitometry scan analyses.

CHAPITRE IV

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A COMPLEMENTARY DNA CLONE ENCODING A PUTATIVE WHITE SPRUCE GLYCINE-RICH RNA BINDING PROTEIN

(ISOLATION ET CARACTÉRISATION D'UN CLONE D'ADN COMPLÉMENTAIRE CODANT POUR UNE PROTÉINE PUTATIVEMENT RICHE EN GLYCINE LIANT L'ARN CHEZ L'ÉPINETTE BLANCHE)

**Sylvie Richard: Fabrication de banque d'ADNc, criblage de la banque, analyse des
séquences, étude d'expression.**

Christine Drevet: Purification du clone *PgRNP* et analyse des séquences.

Lise Jouanin: Direction des travaux à Versailles

Armand Séguin: Direction des travaux à Québec

Ce chapitre sera soumis dans la revue *Gene*.

Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a putative white spruce glycine-rich RNA binding protein

Sylvie Richard¹, Christine Drevet², Lise Jouanin², and Armand Séguin^{1,3,†}

¹ Centre de recherche en biologie forestière, Pavillon C.-E.-Marchand, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada, G1K 7P4

² Laboratoire de biologie cellulaire, Institut National de la Recherche Agronomique, route de Saint-Cyr, F 78026 Versailles Cedex, France

³ Centre de foresterie des Laurentides, Service canadien des forêts, Ressources naturelles Canada, Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4C7

† Author for correspondence

RÉSUMÉ

Un clone vraisemblablement complet d'ADN complémentaire (ADNc) codant pour une protéine riche en glycine et liant potentiellement l'ARN a été isolé d'une banque d'ADNc préparée dans le vecteur λ ZAP, à partir d'ARNms isolés d'aiguilles provenant de plants d'épinette blanche de 2 ans ayant été blessés ou traités aux jasmonates. L'ADNc, nommé *PgRNP* (pour «*Picea glauca* RNP protein»), possède un cadre de lecture de 468 pb et code pour une protéine de 155 acides aminés. Ce polypeptide possède un motif de liaison à l'ARN (le RNP-CS, pour «ribonucleoprotein consensus») et un domaine auxiliaire riche en glycine. L'alignement avec des séquences protéiques connues révèle des homologies importantes avec des protéines riches en glycine possédant le RNP-CS observées chez d'autres espèces de plantes. L'analyse génomique suggère que le gène *PgRNP* fait partie d'une petite famille constituée d'au moins quatre membres. Les analyses d'ARN montrent que les transcrits de *PgRNP* sont exprimés dans tous les tissus provenant de plants non stressés. Un niveau de transcrits constitutif a été observé dans les aiguilles de semis de 2 ans témoins ou traités au méthyle jasmonate. Le traitement de blessure n'a pas eu d'effet net sur le niveau de transcrit. Le traitement à l'acide jasmonique et la réponse systémique aux blessures ont eu un léger effet positif sur l'accumulation des transcrits. L'accumulation de transcrits n'a pas été induite par un traitement au froid dans les aiguilles et été réprimée par la sécheresse dans les tissus foliaires et racinaires des semis de 2 ans.

ABSTRACT

A presumably full-length cDNA encoding a putative glycine-rich RNA binding protein was isolated from a λ ZAP cDNA library prepared from mRNAs extracted from needles of 2-year-old white spruce seedlings, which had been either wounded or jasmonate-treated. The cDNA, designated *PgRNP* (*Picea glauca* RNP protein), presents a 468 bp open reading frame encoding a 155 amino acid protein. This polypeptide possesses an RNA binding domain (RNP-CS) and a glycine-rich domain. Comparative alignment reveals extensive homologies to glycine-rich RNA binding proteins containing an RNP-CS found in other angiosperm species. Genomic hybridization experiments suggest that the *PgRNP* gene is part of a small multigene family with at least four members. RNA blot analysis revealed that the *PgRNP* transcript is expressed in all tissues from non-stressed plants. Constitutive mRNA level was found in needle tissue from control as well as methyl-jasmonate treated plants. Wounding had no clear induction effect. Jasmonic acid treatment and systemic wound response had a slight effect on transcript accumulation. Transcript accumulation was not induced by cold in needles and repressed by drought stress in both needle and root tissues of 2-year-old plants.

Keywords: Glycine-rich RNA binding protein, ribonucleoprotein, wounding, jasmonate, conifer, gene expression

4.1 Introduction

The plant glycine-rich proteins (GRPs) have been subdivided into classes. The first and most characterized class in plants represents a family of cell wall proteins (reviewed in Showalter 1993). These GRPs have been shown to be involved in wound healing following viral infection (Fang et al. 1991) and wounding (Condit and Meagher 1987, Keller et al. 1988, Showalter et al. 1992). The second class plays no structural role but could bind a variety of RNA molecules and could participate at several levels in RNA biosynthesis and processing, such as polyadenylation, stabilization or repression (Kenan et al. 1991, Guiltinan and Niu 1996). These modifications of RNA molecules can result from ontogenic processes or from environmental and stress responses. The function of glycine-rich RNA binding proteins is still unknown, although some findings in maize and tobacco proteins suggest a role in pre-rRNA processing (reviewed in Albà and Pagès 1998). Glycine-rich RNA binding proteins contain a large RNA binding domain of about 90 amino acids called RNP-CS (for ribonucleoprotein consensus), which is present in one or more copies and which contains two highly conserved RNP (ribonucleoprotein) motif sequences; RNP 1 consists of eight amino acids (RGFGFVTF) and RNP 2, of six amino acids (CFVGGL). This RNP-CS is thought to be required for RNA recognition, where RNP 1 and RNP 2 have been involved in nucleic acid interactions (Merril et al. 1988, Nagai et al. 1990), whereas the glycine-rich domain would interact with other components required for RNA processing (Steinart et al. 1991). Translational control as well as specific mRNA degradation is often mediated by RNA binding proteins (Alexander et al. 1998). Many well-characterized RNA-binding proteins exist that do not contain this motif (reviewed in Bandziulis 1989) and the RNP motif is present in only one class of RNA-binding proteins. The remainder of an RNP RNA binding protein is characterized by an auxiliary domain, which can be glycine-rich, proline-rich or glutamic and aspartic acid-rich. These auxiliary domains would play a role in protein-protein interactions, but could also influence the polynucleotide binding properties.

In plants, several glycine-rich RNA binding proteins possessing an RNP motif have been identified. It has been suggested that some may play a role in stress response as their mRNA accumulation level was modified following exposure to cold (Horvath and Olson 1998, Bergeron et al. 1993, Carpenter et al. 1994), wounding (Sturm 1992, Gomez et al. 1988), acute hypersensitive response (Naqvi et al. 1998), ABA treatment (Carpenter et al. 1994, Gomez et al. 1988, Bergeron et al. 1993), salicylic acid treatment (Naqvi et al. 1998), water stress (Carpenter et al. 1994, Gomez et al. 1988, Bergeron et al. 1993), and exposure to heavy metal (Naqvi et al. 1998, Didierjean et al. 1992). However, these proteins have been characterized primarily in angiosperm species. In this study, we report the isolation and sequence analysis of a presumably full-length cDNA clone encoding a putative glycine-rich RNA binding protein in the gymnosperm white spruce. This is the first report concerning this type of protein in conifers and in gymnosperms as well. PgRNP possesses one RNP-CS including both highly conserved motifs RNP 1 and RNP 2, and a glycine-rich auxiliary domain. In this paper, we describe the cloning of an individual member of the glycine-rich RNA binding protein gene family of *Picea glauca*. Expression studies at the RNA transcript level accumulation of this gene in response to wounding as well as with other environmental stresses and the effect of some compounds known to mediate plant response to these stresses are presented.

4.2 Experimental, results and discussion

4.2.1 Isolation of PgRNP cDNA clone

We have constructed a cDNA library in λ ZAP vector (Stratagene) using poly(A⁺) RNA, prepared from pooled fractions of total RNA isolated from needles of white spruce seedlings, which had been previously wounded, or jasmonate treated at 2 h intervals for 8 h before harvesting. Total RNA was isolated according to Chang et al. (1993) and poly(A⁺) RNA was purified with the PolyAtract mRNA Isolation System (Promega). A

cDNA was serendipitously isolated during plaque hybridization screening the λ ZAP library (Sambrook et al. 1989) with a [α - 32 P] dCTP-labeled probe of a 306 bp PCR fragment bearing homology to a protein kinase gene (Richard and Séguin, unpublished). The cloned cDNA insert and the pBluescript plasmid contained within the lambda vector was excised *in vivo* according to the manufacturer's (Stratagene) recommendations. Plasmid DNA bearing this cDNA was purified with a QIA-prep-8 Plasmid Kit (QIAGEN). The complete nucleic acid sequence of both strands of the presumably full-length cDNA (GenBank accession No. AF109917) was determined using the dideoxy chain termination method (Sanger et al. 1977) with an ABI 373 automated DNA sequencer (Perkin-Elmer). The complete sequence, including the deduced primary structure of PgRNP protein, is shown in Fig. 1. *PgRNP* encodes a putative glycine-rich RNA binding protein possessing an RNP-CS sequence. This cDNA is 930 nucleotides long with an open reading frame starting and ending at nucleotide number 117 and 584 respectively. The cDNA sequence contains several putative polyadenylation signals (AATAT/A) that are underlined in the 3' untranslated region. The deduced protein encodes a 155 amino acid peptide, with the conserved regions typical of these proteins such as RNP 1 and RNP 2 sequences in the larger RNP-CS sequence, as well as a glycine-rich domain (Figs. 1, 2).

4.2.2 Sequence comparison

The relationship between PgRNP and known glycine-rich RNP RNA binding proteins from various plant species is shown in a multiple alignment of amino acid sequences (Fig. 2). This alignment shows that PgRNP shares high similarity in the RNP-CS as well as in the glycine-rich portions with the protein sequence of other glycine-rich RNA binding proteins containing an RNP-CS. Similarities range from 72% to 82% and identities from 67% to 77%, where identity corresponds to proportion of shared amino acids, and similarity is the match and mismatch scores of amino acids according to a matrix of

evolutionary distances between them. The highest homology scores (82% similarity and 77% identity) were obtained with the *grpla* gene from the white mustard *Sinapis alba* (Heintzen et al. 1994). Sequences from different species reported in Fig. 2 were approximately the same size. Hydropathy plots with a window of nine residues (Kyte and Doolittle 1982) shows that the glycine-rich portion of PgRNP is highly hydrophilic (data not shown). It has been suggested that this portion of the protein (the auxiliary domain) is involved in protein-protein interactions and may also influence the RNA-binding activity of the protein (Bandziulis 1989). This inferred protein has an evaluated molecular weight of ca. 15 kDa and an isoelectric point of 8.0.

4.2.3 Southern hybridization analysis

P. glauca genomic DNA was extracted from white spruce embryogenic calli as described by Charest et al. (1996) and used to determine the structural organization of the *PgRNP* gene. Genomic DNA was digested with various restriction enzymes and analyzed by Southern hybridization using *PgRNP* full cDNA sequence as the probe (Fig. 3). Digestion with restriction enzymes that do not cut the cDNA sequence (*Bam*H I, *Eco*R I, *Hind* III) released at least four major fragments. These results suggest that the *PgRNP* gene is member of a small multigene family of four to six members. In other plants, glycine-rich RNA binding proteins have been shown to be either present as single copy genes (Li et al. 1991) or as members of small multigene families (Horvath and Olson 1998, Didierjean et al. 1992, Bergeron et al. 1993). The *PgRNP* probe hybridized strongly to a 2.6 kb *Hind* III fragment, suggesting that two genes of this family could possibly be tandemly linked in the white spruce genome.

4.2.4 Organ-specific transcript expression of *PgRNP* in non-stressed plants

In non-stressed plants, *PgRNP* mRNAs of the expected size (ca. 955 bases) were detected in all tissues analyzed, with steady-state levels being more important in buds, especially female cones and in the first stage of male and vegetative buds of 15-year-old field-planted trees. A larger transcript was also detected in northern analyses; this larger transcript of ca. 1.908 kb was detected more intensively in buds and was undetectable in differentiated vegetative tissue (Fig. 4). However it was sometimes detected in needle tissue (Fig. 5). This larger transcript could represent a pre-mRNA or the expression of a larger member of this gene family. Alternative splicing of pre-mRNA generating two different proteins was reported for a RNP protein gene (Buvoli et al. 1990).

4.2.5 Effect of wounding and jasmonate treatment on transcript accumulation

The pattern of expression of the *PgRNP* gene was examined under various stress conditions. Some glycine-rich RNA binding proteins in plants have been shown to be wound-inducible (Sturm 1992, Gomez et al. 1988). Jasmonates are also known to mediate wound response in plants (Farmer 1994). We investigated the possible implication of *PgRNP* activation in wound response of *P. glauca* and the potential of jasmonate in mediating this response. Needles of 2-year-old plants, which were phenologically in their sustained growth phase period and kept under greenhouse conditions, were harshly cut with scissors by trimming the first 5-15 mm of tips on every branch of the plant. To study the systemic wound response, the needles of five bottom branches from the 2-year-old seedlings were initially severely wounded with scissors by removing their needle tips and material was harvested from five identified non-wounded branches toward the apical region of the seedlings. JA treatments consisted in spraying plants with a 100 μ M JA solution (Farmer et al. 1992) prepared in 0.05% Tween 20 (Sigma) until they were dripping. JA-control plants were sprayed with 0.05% Tween 20 alone. Methyl jasmonate

(MJ, Bedoukian Research Inc.) treated plants were placed in plastic bags containing a cotton swab to which 500 μL of a 10% MJ solution prepared in ethanol was added (Farmer et al. 1992). MJ-control plants were incubated in similar conditions but with cotton swabs containing only 500 μL of ethanol. Care was taken to ensure that plants did not touch the swab. JA and MJ control treatments were achieved in a different greenhouse to prevent cross contamination between treatments. *PgRNP* transcript levels were constitutive in controls (tween and ethanol) and MJ-treatment (Fig. 5A). Level of the ca. 0.955 kb transcript varied slightly during wound treatment, however no clear rise or decrease in the amount of mRNA could be correlate to the wound response. The systemic wound response led to an increment in the level of *PgRNP* transcript 10 h following wound treatment. This systemic induction of transcript accumulation suggests involvement of a signal molecule that acts systemically in the plant to modulate transcript accumulation of *PgRNP*. In JA-treated plants, a similar rise in transcript level was observed starting 4 h after the onset of the treatment and increasing to 24 h. From the results of this study, no clear conclusions could be drawn to explain the seemingly random presence of the ca. 1.908 kb transcript detected by the *PgRNP* probe. That could represent either another member of the family or a pre-mRNA that could be further maturate through alternative splicing.

To investigate further *PgRNP* accumulation during early seed development, white spruce seeds were germinated on moist filter paper in Petri dishes in the dark at 22°C for 2 weeks. Subsequently, the plant material was wounded several times with flat-bladed tweezers by crushing the seedlings randomly all over, or spraying with JA or incubating in sealed Petri dishes with a swab saturated with a 10% MJ solution. No significant transcript accumulation was observed in wounding except after 24 h at which point a decrease was observed. Nor was any significant variation observed in the JA, nor the MJ treatments (Fig. 5B). Similar wounding and jasmonate treatments of 2-year- and 2-week-

old seedlings led to significant accumulation of CHS transcripts (Richard et al. unpublished)..

Differences observed in expression kinetics might reflect, in the case of wounding, the delay required for the synthesis of an internal mediator, jasmonate for example, to repress *PgRNP* transcript accumulation. Differences observed between 2-week- and 2-year-old plants might be the consequence of ontogenic differences, a light modulation effect is not likely to occur since no significant variation was observed in diurnal cycle expression (Fig 6B.). RNA levels of *PgRNP* in briefly imbibed seeds (24 h) were higher than in 2-week-old seedlings, suggesting a specific function of *PgRNP* in seed development or a role in protection against environmental stresses.

4.2.6 Effect of drought, cold and diurnal cycle on transcript accumulation

Desiccation stress generally causes various physiological effects in plants, including stomatal closure, reduced transpiration rate and a drop in photosynthesis. This biotic stress is also associated with the accumulation of transcript of many genes including RNP proteins (Carpenter et al. 1994, Gomez et al. 1988, Bergeron et al. 1993). Drought stress treatments were conducted on 2-year-old plants from which soil was removed, and they were left to dry on filter paper in a greenhouse for either 6 h or 2 days. To evaluate the water loss caused by the stress, fresh weight of the seedlings, and the weight prior to harvesting were measured. Relative water loss of the plants was calculated as a ratio of water weight loss compared with initial fresh weight of the plant taken as 100%. Following 6 h of drought stress, the seedlings had lost an average of 30% of their fresh weight, and caused a reduction in the level of detected *PgRNP* mRNAs in needle and root tissues (Fig. 6A). *PgRNP* transcripts were almost undetectable after 2 days, at which point plants had lost an average of 66% of their fresh weight (Fig. 6A). At this stage, plants seemed to be at a point of impossible stress recovery since needles were dried out

and the needle abscission phenomenon had already started. Drought treatments performed on 2-week-old etiolated seedlings for 6 h had a similar effect by lowering the detected transcript level of *PgRNP* (data not shown). Transcript level diminution has also been reported for some of these genes in response to ABA treatment (Guiltinan and Niu 1996, Carpenter et al. 1994). Since it is generally accepted that dehydration stress causes ABA accumulation in plants, it would be interesting to know if the transcript reduction observed here is simply a response to drought stress and/or a response to an endogenous rise of ABA content in *P. glauca*. Transcript accumulation of *Picea glauca* dehydrin was observed upon similar stress conditions (Richard et al. unpublished).

We further analyzed the induction of *PgRNP* transcript accumulation in response to various environmental stresses. It has been previously shown that the expression of some of these proteins was transcriptionally modified upon exposure of the plants to cold (Bergeron et al. 1993, Carpenter et al. 1994, Horvath and Olson 1998). Cold treatments were performed by transferring 2-year-old seedlings for either 6 h or 2 days in growth chambers at 4°C under a 12-h-photoperiod, with a light intensity of 79.3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Northern analysis revealed that cold treatment had no significant effect on *PgRNP* transcript level (Fig. 6A). No evident variation was observed during diurnal expression (Fig. 6B).

4.3 Conclusions

- (1) We have described the cloning and characterization of a full-length cDNA, *PgRNP*, a putative glycine-rich RNA binding protein in *P. glauca*, a coniferous species.
- (2) The inferred amino acid sequence shows high homology to known glycine-rich RNA binding proteins containing the RNP-CS and conserved RNP 1 and RNP 2 motifs observed in angiosperms.

- (3) This gene is part of a small multigene family of at least four members.
- (4) The transcripts detected by the *PgRNP* probe are of the expected size of 0.955 kb as deduced from the cDNA sequence. A longer transcript of approximately 1.908 kb could be another member of the gene family or an immature transcript that will be further processed or alternatively spliced to generate two transcripts.
- (5) Transcripts are present in all tissue types of non-stressed materials, with a larger transcript being more prominent in buds. The presence of high levels of mRNAs in seeds suggests a role in seed development or in protection against environmental stresses.
- (6) *PgRNP* was not regulated by wounding or MJ treatments in 2-year-old plants under greenhouse conditions. However, systemic wound response as well as JA treatment had an effect on transcript accumulation, suggesting a more or less indirect effect of wounding on *PgRNP* accumulation, which could reflect the regulating action of a wound signal molecule on *PgRNP* transcript accumulation. This could also be true for JA. *PgRNP* mRNA level is low under drought stress. Cold treatment had no significant effect on transcript accumulation.

```

1 GCACGAGCCTGGTTCTCTTTGTTTCGGTTCGTTTCCGGTTCCTGGTTCTGGTCCCTGTGTGA 60
61 GTGGTTTCTTGCTCTCTCTTTTTTCTGTCAAGTTTGCTTATACGTCAGTCTGAGAAGATGG 120
                                                                M A
121 CTTCAGCAGATGTTGAGTTCGGTGCTTCGTTGGAGGCCCTTGCATGGTCCACAGATGATA 180
    S A D V E F R C F V G G L A W S T D D R
181 GAAGCCTGCAGGAGGCTTTTCAGTCCATATGGCGAAGTCGTGGAATCCAAGATTATTAGTG 240
    S L Q E A F S P Y G E V V E S K I I S D
241 ATCGGGAAACCGGTAGATCTCGTGGATTTGGCTTCGTGACCTTCAACGATGAGCAATCAA 300
    R E T G R S R G F G F V T F N D E Q S M
301 TGAGGGATGCCATCGATGCAATGAATGGCAAGATGCTTGACGGGAGGAGCATCACCGTTA 360
    R D A I D A M N G K M L D G R S I T V N
361 ACCCGGCCCAATCCAGAGGGAACGGCGGTGGTGGCGGGCGGGTGGTTCCGGTGGTTACC 420
    P A Q S R G N G G G G G G G S R G Y R
421 GTGGAGGCGGGCGGTGGCGGGCGGTACGGTGGTAGCCGTGACCGTGGTGACCGTGGTTATG 480
    G G G G G G G Y G G S R D R G D R G Y G
481 GCGGTGGTGGTGGCGGCTATGGCGGGCGGGTGGTGGTTACGGTGGCGGTGGCGGTTCTC 540
    G G G G G Y G G G G G Y G G G G S R
541 GCTATGGTGGAGGTGGTTCTGAGGGCGGTAGCTGGAGGAGATAAGCATGATGATGTTGGT 600
    Y G G G G S E G G S W R R *
601 GATCGGTTAGGGTGTAGTTTTGCTCTCGTGGTCTTATGTTTTGGTTCGTAAATAATCCTGT 660
661 TGGTGGTAGAGCTTTATGCTGGTAAGTGTCTTGGTCTTGGTGTTCGATGTTCTGTTAA 720
721 CTCATGTCTGGTTTTTGGATCTGGATCTCTGTGGCTCTTGGTGTGAGCTGTATCAAAAACGGAA 780
781 AATCTGGTTCTAATAATTTTGAATGGCAATATCAATATGCAATATACGGGTTTTAATGTA 840
841 TCTCTCTTGTCATGGTTTATGGTTTTGATCAGCTTTGTAAATCTTGCTTTAATATTTGGAA 900
901 ACTAAATTTAAAAA 930

```

Fig. 1. Nucleotide sequence and predicted translation product encoded by the *PgRNP* cDNA clone. *PgRNP* translation was performed using the GCG software package (Devereux et al. 1984). The amino acid sequence is given using the single-letter code. Possible polyadenylation signals, the poly(A) tail, the putative transcription start site (Kozak 1989) and the stop codon, which is marked by an asterisk, are singly underlined. Conserved RNP 1 and RNP 2 sequences are doubly underlined. This sequence is available from GenBank Nucleotide Sequence Database, accession No. AF109917.

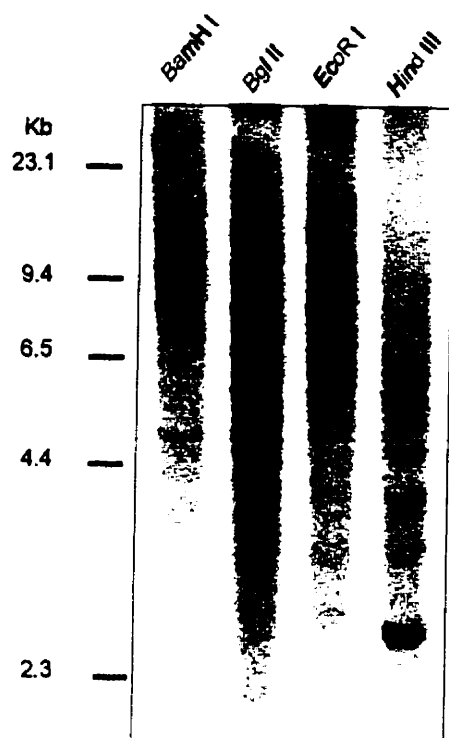


Fig. 3. Genomic Southern blot analysis of *PgRNP*. Genomic DNA samples (15 μ g) were digested with *Bam*H I, *Bgl* II, *Eco*R I, and *Hind* III. The samples were fractionated by agarose gel electrophoresis (0.8% w/v) and transferred onto a Nytran Plus nylon membrane cross linked with UV (Schleicher and Schuell). Probes containing the entire coding region of *PgRNP* were synthesized through PCR amplification of cDNA insert (cDNA purification was achieved with QIA-prep-8 Plasmid Kit (QIAGEN)) using T7 and SK primers in a PCR reaction containing 0.1 μ M of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 100 ng of DNA, 0.025 unit/ μ L *Taq* DNA polymerase (Boehringer Mannheim) and 1 x of the supplied reaction buffer. PCR was carried out for 35 cycles (94°C, 1 min; 50°C, 45 sec; 72°C, 1 min) followed by 10 min at 72°C in a 480 DNA thermal cycle apparatus (Perkin Elmer). PCR products were purified using QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) and labeled with [α -³²P]dCTP by random priming using the High Prime labeling kit (Boehringer Mannheim). Radiolabeled probes were purified with QIAquick nucleotide removal kit (QIAGEN). The membrane was prehybridized in Church and Gilbert (1984) buffer for 2 h prior to the addition of the probe (1 x 10⁶ cpm/mL buffer). Hybridization was achieved at 60°C for 16 h. The membrane was then washed two times in 2 x SSC and 0.1% SDS at 60°C for 30 min. The membrane was exposed for 12 h to a Storage Phosphor Screen and hybridization signals were recorded with a Fuji Bio imaging analyzer. λ DNA digested with *Hind* III was used as a molecular mass marker (indicated on the left).

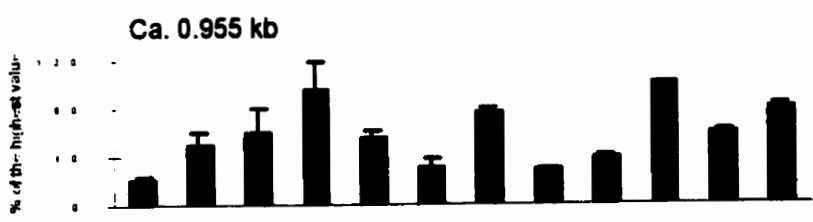
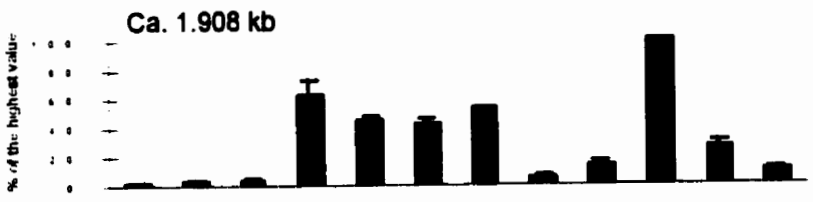
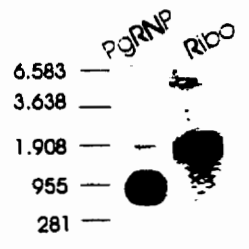
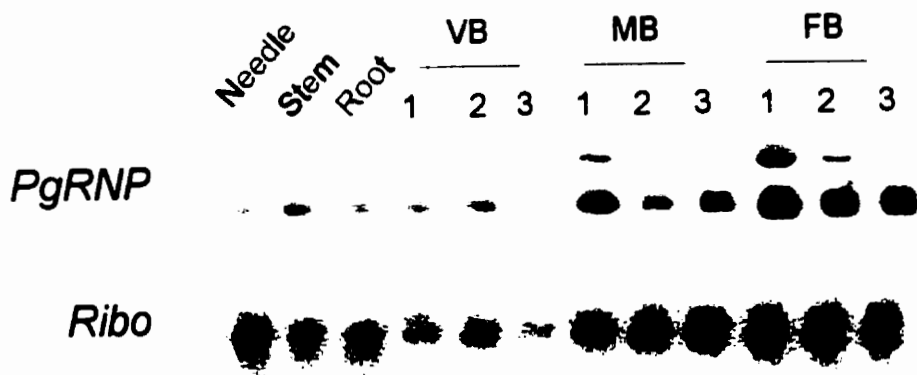
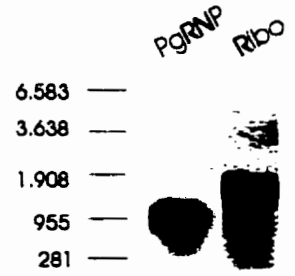
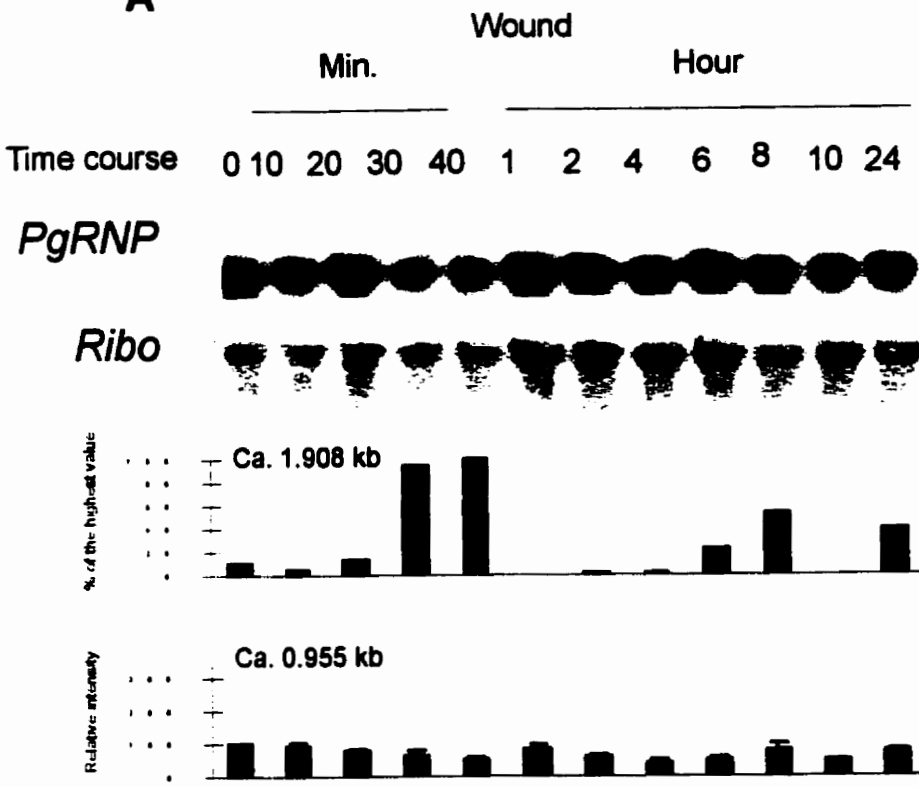
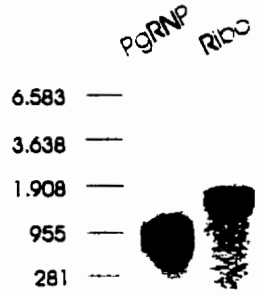
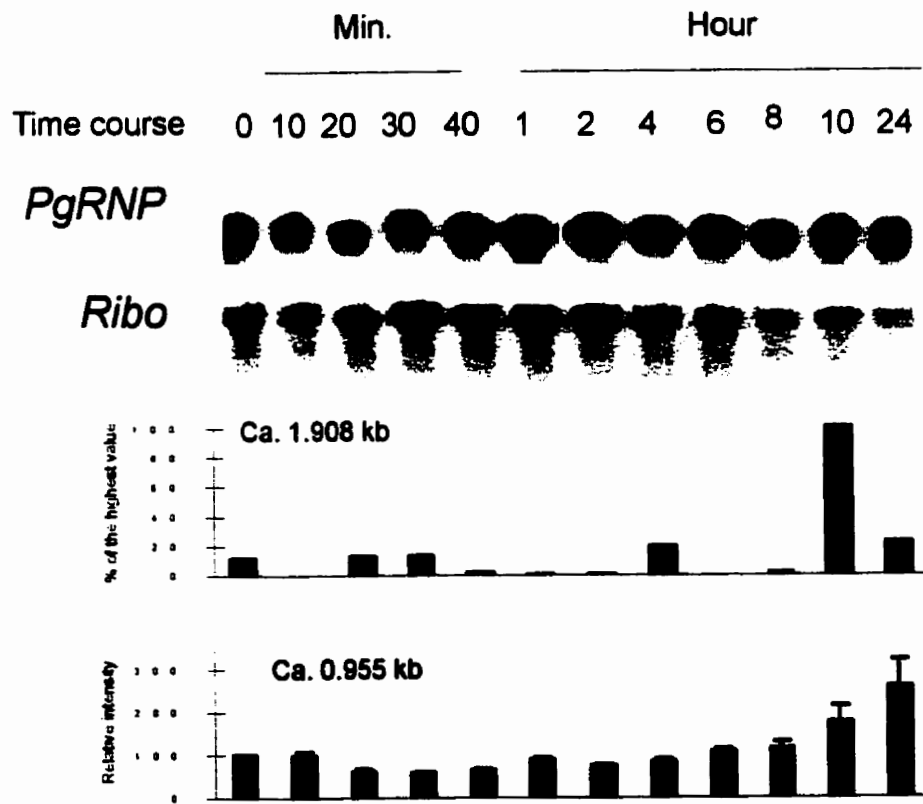


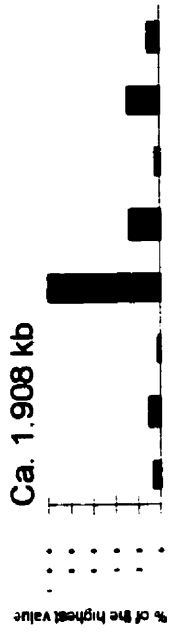
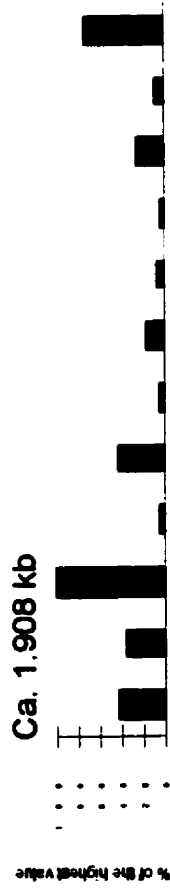
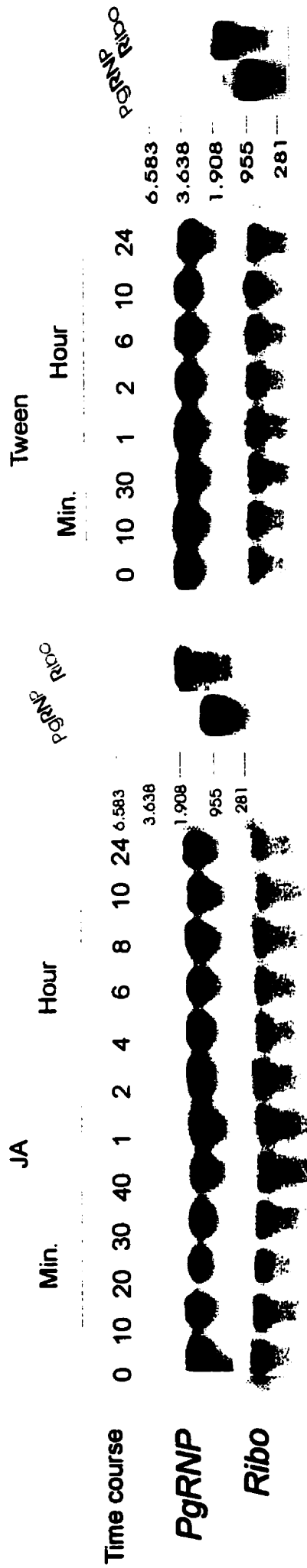
Fig. 4. Northern analysis of organ-specific expression of *PgRNP* in non-stressed plants. Total RNA (approximately 10 µg per lane) was extracted according to Chang et al. (1993) from needle (N), stem (S) and root (R) tissues from 2-year-old seedlings maintained in a sustained phenological growth state and from vegetative (VB), male (MB) and female (FB) bud tissues from 15-year-old field-planted trees (Daoust et al. 1995) that were extracted with the Chang et al. (1993) extraction buffer together with the QIAGEN RNeasy total RNA extraction kit. The numbers 1 to 3 stand for different stages of bud maturation starting from early differentiation in spring (1, May 7th; 2, May 17th) to fully expanded buds (3, May 29th) where female buds were fully opened, most of the pollen was dispersed from male buds and where needles were fully expanded from maturing vegetative buds. Collected buds were kept on dry ice and then stored at -80°C. Total RNA was redissolved in diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water and RNA concentrations were determined by absorbance value at 260 nm. Equal amounts of total RNA were denatured with formamide/formaldehyde and fractionated on denaturing 1.2% (w/v) agarose formaldehyde gel (Sambrook et al. 1989). RNA quality was confirmed by ribosomal RNA integrity observed by ethidium bromide. The gels were blotted onto Nytran Plus nylon membranes (Schleicher and Schuell), and fractionated RNAs were crosslinked to membranes by UV radiation. The membranes were probed with the full-length cDNA sequence of *PgRNP* as described for Fig. 3. Membranes were stripped by boiling for 15 min. in 0.1% SDS and 0.1 x SSC and rehybridized with a 400 bp 18 S *Picea glauca* ribosomal probe (Ribo), to assess equal loading of RNA samples. The Ribo probe was synthesized through PCR conditions as described in Fig. 3 with the use of the primers NS51 and NS61 (5'-GGGGGAGTATGGTCGCAAGGC-3' and 5'-TCAGTGTAGCGCGCGTGCGGC-3' respectively, Simon et al. 1992) and 100 ng *P. glauca* genomic DNA. High-stringency hybridization conditions were achieved by incubation at 65°C for 16 h and by washing the membranes two times in 1 x SSC and 1% SDS at 65°C for 30 min and exposed on X-OMAT™ AR (Kodak) for 12 h or exposed to a Storage Phosphor Screen where hybridization signals were recorded with a Fuji Bio imaging analyzer. Each sample represents RNA isolated from pooled material of five seedlings (needle, stem and roots) or 5-10 buds. Right panel indicates the relative migration distance for the transcripts detected with the two probes in the FB 3 sample and molecular weight (RNA marker, Promega). Upper histogram shows the normalized mean values of the ca. 1.908 kb *PgRNP* relative signal intensity presented as percentage of the highest value, where FB 1 was 100% intensity. Lower histogram shows the normalized mean values of the ca. 0.955 kb *PgRNP* relative signal intensity presented as percentage of the highest value, where FB 1 was 100% intensity. Histogram represents scanning values of the most representative hybridization experiment and is a mean of four different quantification results obtained from densitometry scan analyses as well as phosphor imager quantification. Error bars represent average deviation. Histograms illustrate the quantification of the most representative hybridization experiment (shown) where errors bars represent the degree of error in the quantification method. In the analyses, we considered a difference of magnitude of transcript accumulation of two-fold or greater to be significant.

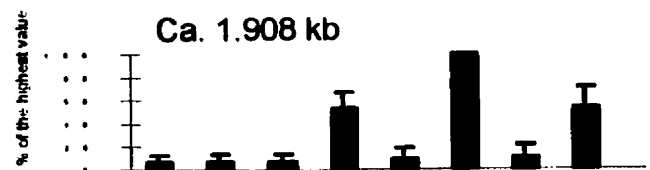
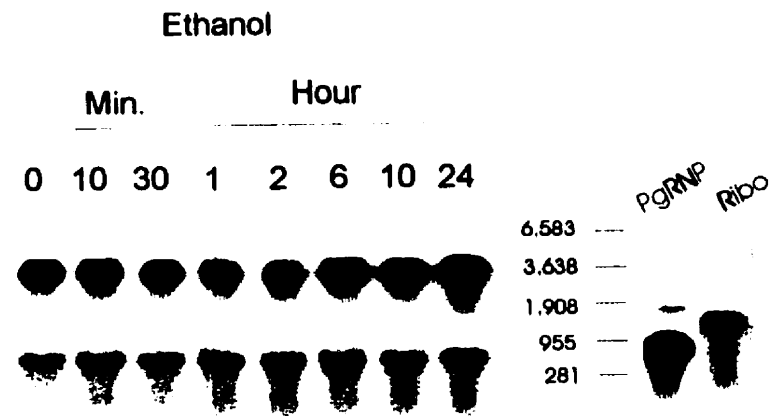
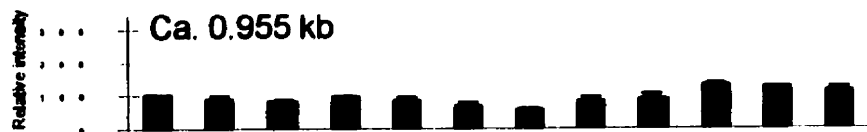
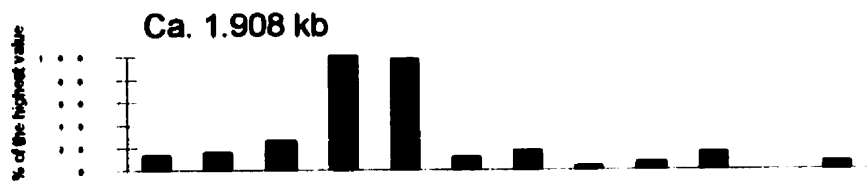
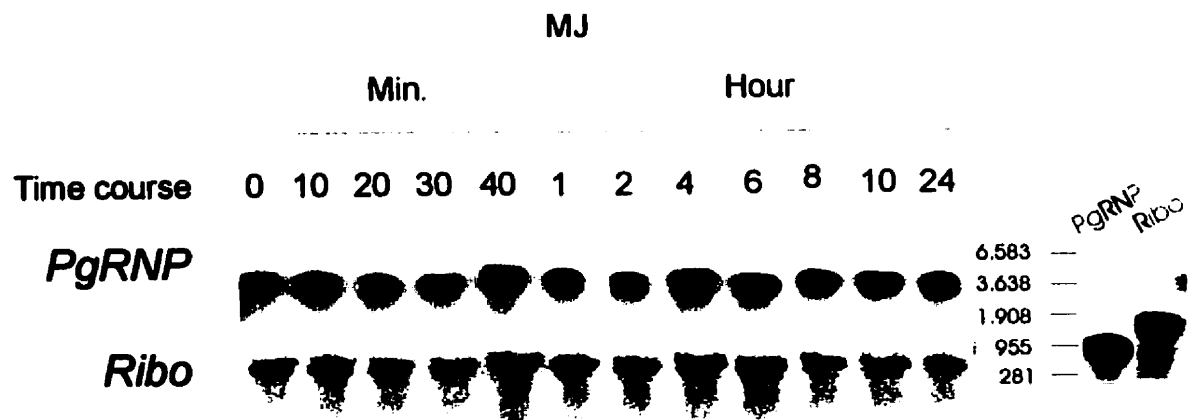
A



Systemic wound response







B

Wound

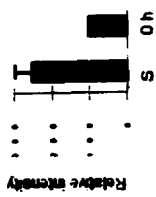
Time course (h)

0 2 4 8 24

PgRNP



Ribo



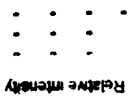
6.583
3.638
1.908
955
281

PgRNP
Ribo



JA

0 2 4 8 24



6.583
3.638
1.908
955
281

PgRNP
Ribo

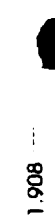


MJ

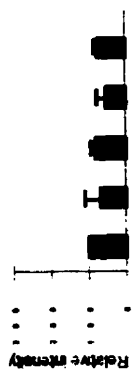
Time course (h)

0 2 4 8 24

PgRNP



Ribo



6.583
3.638
1.908
955
281

PgRNP
Ribo



Fig. 5. *PgRNP* expression in response to wounding and jasmonate treatments. Total RNA (30 µg) (A) from needles of wounded, or jasmonate-treated of material pooled from five 2-year-old seedlings, (B) from 30 dark grown 2-week-old seedlings wounded or jasmonate-treated. JA (jasmonic acid), Tween (JA-control; 0.05% Tween 20 treatment alone, plants were isolated in a different greenhouse), MJ (methyl jasmonate), ethanol (MJ-control; ethanol treatment alone, plants were isolated in a different greenhouse), time 0 represents control expression prior to the treatments, S: total RNA extracted from 30 seeds after imbibing for 24 h. Membranes were stripped and rehybridized with a 400 bp 18 S *Picea glauca* ribosomal probe (Ribo) to assess equal loading of RNA samples. Membranes were exposed on X-OMAT™ AR (Kodak) for 12 h. Right panel indicates the relative migration distance for the transcripts detected with the two probes in the 24 h sample in Fig. 5A and the 0 h sample in Fig. 5B and molecular weight (RNA marker, Promega). A. Upper histograms show the normalized mean values of the ca. 1.908 kb *PgRNP* relative signal intensity presented as percentage of the highest value. Upper histograms represent scanning values of the most representative hybridization experiment and is a mean of three different densitometry scan analyses. Lower histograms show the normalized mean values of the ca. 0.955 kb *PgRNP* relative signal intensity presented as a relative intensity where 0 h was chosen as 100% intensity. Lower histogram represents scanning values of the most significant hybridization experiment and is a mean of four different quantification results obtained from densitometry scan analyses as well as phosphor imager quantification. B. Histograms show the normalized mean values of *PgRNP* relative signal intensity presented as a relative intensity where 0 h was chosen as 100% intensity. Histograms represent scanning values of the most representative hybridization experiment and is a mean of four different quantification results obtained from densitometry scan analyses as well as phosphor imager quantification. Error bars represent average deviation. Histograms illustrate the quantification of the most representative hybridization experiment (shown) where errors bars represent the degree of error in the quantification method. In the analyses, we considered a difference of magnitude of transcript accumulation of two-fold or greater to be significant.

A Drought

0h	6h			2d		
N	R	N	R	N	N	R
-	-	-	+	+	-	+

PgRNP

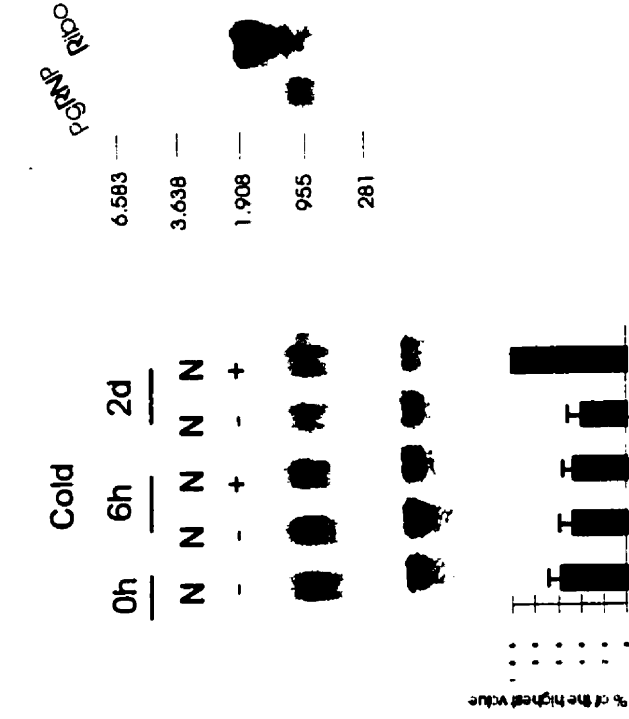
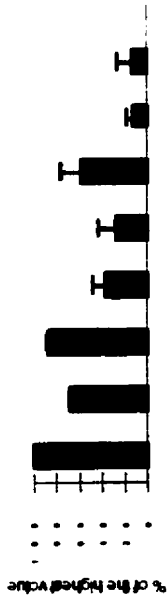


6.583
3.638
1.908
955
281

PgRNP
Ribo



955
281



B

a.m. p.m. p.m. a.m.

Time (h) ⬇ ⬆ ⬆ ⬆

PgRNP



6.583
3.638
1.908
955
281

PgRNP
Ribo

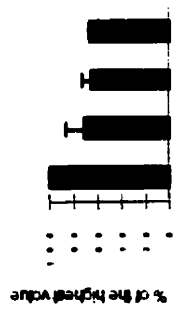


Fig. 6. Northern analysis of *PgRNP* during drought and cold treatments and diurnal cycle. A. Drought and cold treatments of 2-year-old seedlings. Needle (N) and root (R) tissue expressions at time 0, 6 h and 2 days (+). Control tissues (-). In the case of drought treatment, control at 0 h represents expression found immediately after soil removal. Control expression in the case of cold and other drought time points represents expression from non-stressed plants that remained potted. B. Diurnal cycle expression in needle tissue of 2-year-old seedlings. Tissues were sampled at 9 a.m., 3 p.m., 9 p.m. and 3 a.m. Membranes were stripped and rehybridized with a 400 bp 18 S *Picea glauca* ribosomal probe (Ribo) to assess equal loading of RNA samples. Membranes were exposed on X-OMAT™ AR (Kodak) for 12 h. Ten µg of total RNA was loaded in each lane. Right panel indicates the relative migration distance for the transcripts detected with the two probes in the needle 0 h samples in Fig. 6A and the 9 a.m. sample in Fig. 6B and molecular weight (RNA marker, Promega). Histograms show the normalized mean values of the ca. 0.955 kb *PgRNP* relative signal intensity presented as percentage of the highest value. Histograms represent scanning values of the most representative hybridization experiment and are a mean of four different quantification results obtained from densitometry scan analyses as well as phosphor imager quantification. Error bars represent average deviation. Histograms illustrate the quantification of the most representative hybridization experiment (shown) where errors bars represent the degree of error in the quantification method. In the analyses, we considered a difference of magnitude of transcript accumulation of two-fold or greater to be significant.

4.4 References

- Albà, M.M. and Pagès, M. (1998) Plant proteins containing the RNA recognition motif. *Trends Plant Sci.* 3, 15-21.
- Alexander, C., Faber, N. and Klaff, P. (1998) Characterization of protein-binding to the spinach chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region. *Nucleic Acids Res.* 26, 2265-2272.
- Bandziulis, R.J., Swanson, M.S. and Dreyfuss, G. (1989) RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes Dev.* 3, 431-437.
- Bergeron, D., Beauseigle, D. and Bellemare, G. (1993) Sequence and expression of a gene encoding a protein with RNA-binding and glycine-rich domains in *Brassica napus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1216, 123-125.
- Buvoli, M., Cobianchi, F., Bestagno, M.G., Mangiarotti, A., Bassi, M.T., Biamonti, G. and Riva, S. (1990) Alternative splicing in the human gene for the core protein A1 generates another hnRNP protein. *EMBO* 9, 1229-1235.
- Carpenter, C.D., Kreps, J.A. and Simon, A.E. (1994) Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiol.* 104, 1015-1025.
- Chang, S., Puryear, J. and Cairney J. (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11, 113-116.

- Charest, P.J., Devantier, Y. and Lachance, D. (1996) Stable genetic transformation of *Picea mariana* (Black Spruce) via particle bombardment. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 32, 91-99.
- Church, G.M. and Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1991-1995.
- Condit, C.M. and Meagher, R.B. (1987) Expression of a gene encoding a glycine-rich protein in petunia. *Mol. Cell. Biol.* 7, 4273-4279.
- Daoust, G., Plourde, A. and Beaulieu, J. (1995) Influences of crown size and maturation on flower production and sex expression in *Picea glauca* treated with gibberellin A₄₇. *Tree Physiol.* 15, 471-475.
- Devereux, J., Haerberli, P. and Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.
- Didierjean, L., Frendo, P. and Burkard, G. (1992) Stress responses in maize: Sequence analysis of cDNAs encoding glycine-rich proteins. *Plant Mol. Biol.* 18, 847-849.
- Fang, R.-X., Pang, Z., Gao, D.-M., Mang, K.-Q. and Chua, N.-H. (1991) cDNA sequence of a virus-inducible, glycine-rich protein gene from rice. *Plant Mol. Biol.* 17, 1255-1257.
- Farmer, E.E. (1994) Fatty acid signaling in plants and their associated microorganisms. *Plant Mol. Biol.* 26, 1423-1437.
- Farmer, E.E., Johnson, R. and Ryan, C. (1992) Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol.* 98, 995-1002.

- Gomez, J., Sanchez-Martinez, D., Stiefel, V., Rigau, J., Puigdomènech, P. and Pagès, M. (1988) A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. *Nature* 334, 262-264.
- Gultinan, M.J. and Niu, X. (1996) cDNA encoding a wheat (*Triticum aestivum* cv. Chinese Spring) glycine-rich RNA-binding protein. *Plant Mol. Biol.* 30, 1301-1306.
- Heintzen, C., Melzer, S., Fuscher, R., Kappeler, S., Apel, K. and Staiger, D. (1994) A light and temperature-entrained circadian clock control expression of transcripts encoding nuclear proteins with homology to RNA-binding proteins in meristematic tissue. *Plant J.* 5, 799-813.
- Hirose, T., Sugita, M. and Sugiura, M. (1993) cDNA structure, expression and nucleic acid-binding properties of three RNA-binding proteins in tobacco: occurrence of tissue-specific alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 21, 3981-3987.
- Horvath, D.P. and Olson, P.A. (1998) Cloning and characterization of cold-regulated glycine-rich RNA-binding protein genes from leafy spurge (*Euphorbia esula* L.) and comparison to heterologous genomic clones. *Plant Mol. Biol.* 38, 531-538.
- Keller, B., Sauer, N. and Lamb, C.J. (1988) Glycine-rich cell wall proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vacuolar system. *EMBO J.* 7, 3625-3633.
- Kenan, D.J., Query, C.C. and Keene, J.D. (1991) RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 16, 214-220.

- Kosak, M. (1989) The scanning model for translation: An update. *J. Cell Biol.* 108, 229-241.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- Li, Y., Ye, L., Sugita, M. and Sugiura, M. (1991) Tobacco nuclear gene for the 31 kd chloroplast ribonucleoprotein: genomic organization, sequence analysis and expression. *Nucleic Acids Res.* 19, 2987-2991.
- Merril, B.M., Stone, K.L., Cobianchi, F., Wilson, S.H. and Williams, K.R. (1988) Phenylalanines that are conserved among several RNA-binding proteins form part of a nucleic acid-binding pocket in the A1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein. *J. Biol. Chem.* 263, 3307-3313.
- Nagai, K., Oubridge, C., Jessen, T.H., Li, J. and Evans, P.R. (1990) Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. *Nature* 348, 515-520.
- Naqvi, S.M.S., Park, K.-S., Yi, S.-Y., Lee, H.-W., Bok, S.H. and Choi, D. (1998) A glycine-rich RNA-binding protein gene is differentially expressed during acute hypersensitive response following Tobacco Mosaic Virus infection in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 37, 571-576.
- van Nocker, S. and Vierstra, R.D. (1993) Two cDNAs from *Arabidopsis thaliana* encode putative RNA binding proteins containing glycine-rich domains. *Plant Mol. Biol.* 21, 695-699.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) **Molecular Cloning. A laboratory Manual, 2nd Edn. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY.**
- Sanger, F., Nicklen, J.A. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Showalter, A.M. (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5, 9-23.
- Showalter, A.M., Butt, A.D. and Kim, S. (1992) Molecular details of tomato extensin and glycine-rich protein gene expression. *Plant Mol. Biol.* 19, 205-215.
- Simon, L., Lalonde, M. and Bruns, T.D. (1992) Specific amplification of 18 S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 291-295.
- Steinart, P.M., Mack, J.W., Korge, B.P., Gan, S.-Q., Haynes, S.R. and Steven, A.C. (1991) Glycine loops in proteins: their occurrence in certain intermediate filament chains, loricrins and single stranded RNA binding proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* 13, 130-139.
- Sturm, A. (1992) A wound-inducible glycine-rich protein from *Daucus carota* with homology to single-stranded nucleic acid-binding proteins. *Plant Physiol.* 99, 1689-1692.

4.5 Acknowledgments

We are grateful to Dr. Luc Giasson for scientific input and reviewing the manuscript; Maria D. Luckevich for help with RNA extraction and reviewing the manuscript; and François Larochelle, Henning Heinemann and Claude Fortin for technical support; and the Ministère des Ressources Naturelles du Québec for providing white spruce bulk seeds and seedlings. This research was supported by grants to A.S. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and to A.S. and L.J. from the “Programme de coopération franco-québécois en science et technologie”. S.R. was in part supported by scholarships from La Fondation de l’Université Laval, Le Fonds pour la Formation de Chercheurs et l’Aide à la Recherche du Québec and The Canadian Federation of University Women.

CONCLUSION GÉNÉRALE

À l'aube de l'an 2000, force est de constater que la nature dans son ensemble vit des bouleversements considérables. Nous vivons dans une ère anthropologique où la majorité des activités humaines mènent à des changements, voire à des perturbations climatiques et environnementales importantes. La diminution de la couche d'ozone, la croissance quasi exponentielle de la population planétaire (une augmentation de 90-100 millions d'habitants par année, Lalancette et Librowicz 1998), la disparition de certaines espèces et l'expansion de certaines autres, les variations climatiques brusques et inattendues à la surface du globe appartiennent dorénavant à la réalité moderne. En cette fin de siècle, l'une des conclusions les plus évidentes qui puissent être tirées de ces bouleversements est sans contredit que l'équilibre de la nature est très fragile et qu'un simple débalancement peut avoir des conséquences importantes. La présence de cette multitude de variations a, en quelque sorte, concentré les efforts d'un nombre grandissant de scientifiques afin d'en comprendre les effets dans le but de les éviter, les contrer ou pour, à tout le moins, pouvoir les prévoir et les prévenir. Chez les plantes, tous ces bouleversements sont souvent perçus comme des stress. La portée de ces recherches est donc de mieux pallier aux carences subséquentes ou encore de contrecarrer les effets causés par ces stress chez les plantes.

L'accroissement de la mécanisation et de l'industrialisation de ce siècle a créé de lourdes perturbations de l'environnement causées par une augmentation de la pollution à des taux dommageables. Quelques uns des dommages ainsi engendrés ont été un réchauffement global de la Terre et la diminution de la couche d'ozone laquelle diminution permet maintenant à une plus grande quantité de rayons ultra-violets d'atteindre la surface de la Terre (revue dans Bharti et Khurana 1997).

Les effets des radiations UV et des variations climatiques appartiennent à ces considérations qui prennent une importance de plus en plus grande chez les scientifiques puisqu'elles amènent une réduction de la biomasse produite. L'adaptation des plantes aux variations de température afin de leur permettre de survivre et de continuer leur production de biomasse revêt donc un caractère impératif ; la réduction de biomasse pourrait en effet nuire aux efforts des chercheurs qui tentent au contraire de l'augmenter. En raison des difficultés subies par les plantes, les dernières décennies ont donc permis de mettre l'accent sur l'étude des systèmes de défense des plantes et sur l'importance de comprendre ces mécanismes. Cependant, ces connaissances concernent majoritairement les espèces agricoles, en raison du besoin toujours omniprésent de nourrir l'humanité. Par conséquent, les connaissances reliées au système de défense des essences forestières sont plus limitées. L'avancement des recherches sur les arbres, et plus particulièrement de celles portant sur les conifères, a jusqu'à présent ressemblé à leur longue et lente vie : un temps de génération très long, reflet, somme toute, du temps requis pour l'avancement des connaissances dans ce domaine. Heureusement, l'avènement de nouvelles technologies toujours plus performantes permet d'entrevoir des jours meilleurs et une percée plus rapide des connaissances dans les années à venir.

Les plantes pérennes, en raison de leur cycle vital plus long, doivent en théorie avoir développé, tout comme les plantes annuelles, des systèmes de défense efficaces leur permettant d'atteindre la maturité et de pouvoir se reproduire. À cause de cette longue vie, les arbres auront donc à subir de nombreux stress et à survivre à ce qui nous semble être des catastrophes naturelles. De plus, des mécanismes d'adaptation aux stress hydriques et aux températures froides sont indispensables chez les plantes à génération longue pour survivre d'une année à l'autre, et plus spécifiquement pour les conifères, qui doivent protéger leurs aiguilles tout l'hiver durant.

Cette thèse s'est donc arrêtée sur certains systèmes de défense de *Picea glauca* (Moench) Voss. Les travaux ont plus spécifiquement porté sur les stress de blessures, le potentiel des jasmonates en tant que médiateurs chimiques soupçonnés d'être impliqués dans la réponse à ces stress chez les angiospermes et les mécanismes impliqués dans certains stress de température. Les objectifs de cette thèse étaient d'isoler des gènes d'épinette blanche impliqués dans la réponse à ces différents stress, d'étudier leur expression et d'observer l'implication possible de certains composés chimiques comme médiateurs dans ces réponses.

La technique PCR, combinée à l'utilisation d'amorces dégénérées, nous a permis d'isoler un clone partiel d'ADNc codant potentiellement pour la CHS (*PgCHS1*) chez l'épinette. L'étude d'expression de *CHS* nous a permis de voir que la CHS est potentiellement impliquée dans les processus de défense contre les blessures chez l'épinette blanche. Cette réponse aux blessures a aussi été plus importante lors de l'application d'un stress plus sévère, soit un traitement répété de blessure. Il est intéressant de noter la présence d'une communication interne chez la plante qui induit de façon systémique l'accumulation de transcrits *CHS*. Les jasmonates ont été proposés comme étant des molécules signalisatrices associées à l'activation d'une grande variété de gènes de plantes en réponse aux blessures. Il semble que les jasmonates soient impliqués dans le processus de réponse aux stress en ce qui concerne *CHS* chez l'épinette, ou que ceux-ci puissent répondre à leur présence de façon similaire à celle des angiospermes. La *CHS* pourrait de même posséder, tout comme certaines *CHS* d'angiospermes, un élément de régulation par la lumière. Les résultats présentés dans cette thèse confirment en quelque sorte ce qui était déjà connu chez les angiospermes. Les résultats obtenus avec un clone codant présumément pour la *CHS* ont permis de vérifier sa capacité à être induite par les jasmonates (Lamb et Dixon 1994) et par les blessures (van der Meer *et al.* 1993). L'accumulation des transcrits *CHS* après blessure vient aussi valider les résultats des travaux de Fliegmann *et al.* (1992), dans

lesquels une augmentation du niveau catalytique de la CHS suivant la blessure de l'hypocotyle de *Pinus sylvestris* avait été observée.

Un clone d'ADNc a été isolé d'une banque fabriquée à partir d'ARN provenant d'aiguilles de semis d'épinette blanche blessés ou traités aux jasmonates. À partir d'homologie de séquences, ce clone, nommé *PgDhn1*, code potentiellement pour un gène de déshydrine. Les déshydrines auraient vraisemblablement un rôle de protection permettant de prévenir les dommages cellulaires causés lors de la déshydratation. Les ARNms de *PgDhn1* sont induits par les stress de blessures, de sécheresse et de froid. Il ne semble pas que les jasmonates soient directement impliqués dans la production des déshydrines, du moins chez *P. glauca*, puisque leur effet sur le taux d'accumulation des transcrits était plus faible que celui obtenu avec *CHS*. L'augmentation du niveau de transcrits lors de la décapsulation des bourgeons végétatifs en développement, de même que dans les bourgeons mâles, suggère un rôle protectif de *PgDhn1* pour du matériel jeune ne possédant pas encore suffisamment, dans le cas des aiguilles, de cire pour se protéger contre l'assèchement causé par l'air ambiant et le soleil. Les résultats de la déshydrine sont donc semblables à ceux connus chez les autres espèces, par sa capacité à être induite par divers stimuli. La séquence même de *PgDhn1* permet de réajuster les hypothèses avancées prudemment par Close (1997) pour tenter d'expliquer les différences importantes existant entre les séquences connues des angiospermes et celles des gymnospermes (Jarvis *et al.* 1996).

L'exploitation du clone *PgDhn1* pourrait d'une part s'avérer utile dans les plantes transgéniques pouvant résister au froid et, d'autre part, servir comme marqueur de résistance au froid et à la sécheresse. Il pourrait ainsi être possible de repousser les limites de plantation de certaines essences forestières très recherchées par les industries en élargissant la superficie de plantation de ces conifères dans des endroits plus reculés comme le nord québécois, où l'on reboise présentement avec certaines espèces spécifiques

comme le pin gris. L'exploitation de *PgDhn1*, qui pourrait s'avérer être un marqueur de résistance aux stress de froid/gel et de sécheresse, pourrait permettre un reboisement avec des semences et des semis plus résistants aux cycles répétés de gel-dégel que doivent subir les plants, diminuant ainsi les pertes économiques causées par l'endommagement du matériel végétal imputable à ces stress. Il se peut également que cette résistance plus accrue au climat se reflète dans une plus grande production de biomasse annuelle, ce qui pourrait donc se traduire par un plus haut rendement ou encore une diminution du temps de génération nécessaire avant la récolte. Même si Finch-Savage et coll. (1994) soutiennent que la présence/absence des déshydrines ne peut être considérée comme un critère absolu de tolérance des semences au froid, la catégorie de déshydrines dont parlent Danyluk et coll. (1994, 1998) et à laquelle semble également appartenir *PgDhn1* permet d'entrevoir l'utilisation du niveau d'expression de cette protéine comme marqueur de discrimination entre les individus résistants et susceptibles au froid/gel et à la sécheresse. Le niveau d'expression de *PgDhn1* pourrait de plus s'avérer un marqueur très utile en culture *in vitro*, entre autres pour déterminer les lignées qui seraient les plus résistantes lors de la cryoconservation. Il serait également possible de transformer les lignées transgéniques possédant un gène important ou les lignées à fort potentiel au champ pour augmenter leur résistance aux variations de température et ainsi accroître les chances de réinduction du matériel cryocongelé.

Nous avons isolé un second clone vraisemblablement complet d'ADNc, nommé *PgRNP*, codant potentiellement pour une protéine riche en glycine et liant l'ARN. L'analyse génomique suggère que ce gène *PgRNP* fasse partie d'une famille de gènes constituée d'au moins quatre membres. Les transcrits *PgRNP* sont exprimés dans tous les tissus provenant de plants non stressés. Les transcrits s'accumulent à la suite d'un traitement à l'AJ et par une réponse systémique aux blessures. Par contre, les traitements de blessure et de MJ n'ont pas eu d'effet net sur leur accumulation. La sécheresse a conduit à une baisse du niveau de transcrits dans les tissus foliaire et racinaire. Plusieurs GRPs sont

reconnues pour leur implication dans les réponses de défense contre les blessures (Showalter 1993). Les protéines riches en glycine et liant l'ARN font cependant partie d'une autre catégorie de GRP. Les résultats obtenus à ce jour chez d'autres espèces permettent de croire qu'elles sont impliquées dans les mécanismes de défense à divers stress. *PgRNP* possède les caractéristiques nécessaires pour faire partie intégrante de cette catégorie de protéines (Dreyfuss *et al.* 1988). Les résultats obtenus avec *PgRNP* ne nous permettent cependant pas d'affirmer son implication directe en présence de stress de blessures. Toutefois, ces résultats suggèrent que *PgRNP* serait peut-être induite par des stress utilisant certains médiateurs biochimiques impliqué dans la réponse aux blessures. Il serait par ailleurs intéressant de vérifier si une réaction d'hypersensibilité ne causerait pas une augmentation des transcrits *PgRNP*.

De nombreuses avenues pourraient permettre d'approfondir cette étude. D'un côté, en caractérisant les médiateurs biochimiques internes impliqués lors de l'application des stress comme les jasmonates ou d'autres hormones potentiellement impliquées dans la médiation de ces stress tels les acides abscissique, indole acétique ou salicylique tandis que, d'un autre côté, on pourrait caractériser davantage l'implication de ces gènes dans une plus grande diversité de stress. En ce qui concerne *PgDhn1* et *PgRNP*, une étude fondamentale pourrait aussi être réalisée afin de comprendre leurs mécanismes d'action et leurs fonctions. Enfin, dans le cas de la *PgRNP*, la caractérisation des ARNs avec lesquels elle interagit et les circonstances de ces interactions seraient importantes à définir pour comprendre son rôle et son implication potentielle dans la gestion des stress.

Dans la poursuite des travaux, on devra caractériser et repêcher les promoteurs de ces gènes qui se sont avérés inductibles par les stress. Ces promoteurs pourront ensuite être utilisés dans les constructions de transformation pour les conifères. L'utilisation de promoteurs et de gènes homologues en transformation permettra de diminuer les risques de méthylation de ces gènes à long terme, afin que les gènes introduits puissent demeurer

actifs tout au long de la vie des conifères. Le développement de nouveaux promoteurs reposera également sur le repêchage de nouveaux gènes inductifs par différents stress. La technique PCR combinée à l'utilisation d'amorces dégénérées est bien efficace, mais s'avère inefficace pour découvrir des gènes inconnus inductibles par blessure ou par d'autres stress. L'utilisation du criblage différentiel, qui consiste à hybrider une sonde d'ADNcs témoins sur une banque d'ADNcs traitée, est une technique très laborieuse et très difficile puisqu'elle consiste à repérer les clones qui seront négatifs parmi une multitude de clones positifs. Par contre, le développement de la technique dite du «differential display» pourra permettre d'isoler rapidement des gènes induits par les divers stress. Ces gènes pourront être déjà connus chez d'autres espèces, mais il se peut que les résultats nous amènent aussi vers de nouveaux potentiels de régulation et de mécanismes de défense.

En considérant les avantages que les biotechnologies et le génie génétique peuvent apporter aux besoins toujours grandissants de la population, nous devons sûrement leur ménager une place plus importante dans l'avenir forestier. Pour cibler un peu plus l'importance de leur utilisation, je cite ici un exemple agricole américain où, pour obtenir les mêmes quantités des 17 principaux produits obtenus en 1990 et en se reportant aux conditions, techniques et rendement de 1940, il aurait fallu une superficie supplémentaire de 188 millions d'hectares cultivables, ce qui se traduirait par la transformation de 60% des forêts et des régions boisées américaines en terres agricoles (Lalancette et Librowicz 1998). L'impact direct sur la proportion de terrain disponible pour la forêt est donc bien visible. L'explosion démographique et industrielle empiétant toujours plus sur la superficie de terre vouée à l'agriculture, elle se traduit généralement par une diminution des terres destinées à la production forestière, du moins en forêt privée. Connaissant l'importance de la forêt tant au niveau écologique que récréatif ou comme ressource naturelle, on peut d'ores et déjà mesurer l'importance, tout comme en agriculture, d'utiliser et de développer des espèces de plus en plus performantes, permettant de plus

forts rendements et résistant à divers stress afin de répondre à la demande croissante de cette matière première. Bien évidemment, ces percées technologiques ne reposeront pas uniquement sur l'utilisation de plants transgéniques, mais également sur une génétique classique et sur le développement de marqueurs qualitatifs (QTLs) visant à reconnaître et à exploiter le potentiel existant déjà à l'état naturel. Ces progrès pourront permettre d'améliorer le rendement à l'hectare et de réduire l'utilisation de fertilisants, d'insecticides et de fongicides. Ils auront par conséquent un impact positif net à court et à long terme sur la qualité et la conservation des sols, des nappes phréatiques et de l'environnement.

L'utilisation de l'ingénierie génétique forestière au niveau entomologique comme outil aura certes bien des bénéfices. Reboiser activement avec, par exemple, des lignées ayant intégré le gène codant pour la toxine de *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) pourrait aider à contrôler la population de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Cette technologie est d'ailleurs déjà utilisée avec succès en agriculture, notamment pour la résistance à la pyrale chez le maïs. De plus en plus d'ententes contractuelles se signent présentement entre les fournisseurs (Monsanto, Pioneer) et les cultivateurs achetant les semences «hybrides» *B.t.* (selon le terme employé par les compagnies!), pour que ceux-ci sèment également des parcelles de terrain avec du maïs non-transformé. Ce territoire, équivalant à un minimum de 5% de la superficie totale semée en maïs, ne sera traité avec aucun insecticide afin de permettre à la pyrale de survivre, tout en abaissant la pression de sélection sur la population d'insectes ciblée par le *B.t.* Les cultivateurs peuvent également choisir d'ensemencer 20% de leur superficie totale de maïs avec du maïs non-transformé sur lequel ils pourront utiliser, si cela s'avérait nécessaire, des insecticides autres que ceux à base de *B.t.* (Butzen 1998). Il sera donc important d'utiliser une telle stratégie au niveau forestier. De toute façon, que l'on considère le problème de la tordeuse des bourgeons de l'épinette ou celui de tout autre insecte ou pathogène nuisible, il ne s'agit pas de viser la disparition complète des populations, mais plutôt de tendre vers un contrôle de celles-ci

qui éviterait qu'elles ne prennent des proportions épidémiques causant beaucoup de ravage.

Puisque les résultats obtenus dans cette thèse semblent démontrer une certaine homologie entre le système de défense de l'épinette blanche et celui des angiospermes en général, on pourrait, au niveau stratégique, tirer plus d'analogies dans les schémas d'amélioration génétique. Les conifères ne semblent pas être totalement différents des plantes à courte génération et, à tout le moins, les considérations de prudence à employer avec les espèces agricoles devraient être également prises en considération. En considérant la longue période pendant laquelle les plants transformés seront au champ et les risques vécus au niveau agricole avec la résistance d'insectes, il sera primordial de bien cerner la stratégie la plus sage et la mieux adaptée, selon les connaissances que nous possédons aujourd'hui, pour développer une stratégie adéquate pouvant servir pendant plusieurs années. Évidemment, les avantages devront être considérables si l'on souhaite que les compagnies forestière consentent à reboiser avec des individus modifiés génétiquement, étant donné qu'ils seront plus coûteux lors de l'investissement initial, tant au niveau du matériel forestier que des coûts de reboisement.

À l'échelle planétaire, des choix et des décisions sont et devront être pris quant à l'utilisation de produits issus de l'utilisation des biotechnologies. Il serait grand temps d'ailleurs que les solutions adoptées ne reposent pas uniquement entre les mains d'une certaine élite scientifique, mais qu'elles fassent plutôt l'objet d'une concertation réelle de gens tenant compte de l'opinion des utilisateurs. D'ailleurs, on le voit bien depuis quelques années, la crainte des produits dit «transformés» a créé un mouvement perceptible poussant certains consommateurs vers l'achat de produits dits «biologiques». Or, on ne peut retourner en arrière : le besoin de la population de produire toujours plus et de la façon la plus efficace qui soit pour fournir le strict nécessaire aux populations est bien réel. Cependant, même avec les techniques les plus sophistiquées, un grand

apprentissage devra être fait pour que toutes les nations, à tous les niveaux, puissent bénéficier de ces percées technologiques, le progrès ne correspondant pas automatiquement à un partage équitable des richesses et des ressources. L'explosion démographique étant également concentrée dans les régions les plus pauvres et en voie de développement, on assiste encore bien malheureusement à un enrichissement des plus nantis au détriment des plus pauvres.

Les connaissances acquises durant cette thèse et surtout celles qui pourront en découler permettront, du moins je l'espère, de développer de nouveaux outils tels que de nouveaux marqueurs potentiels de résistance au froid et à la sécheresse, ainsi que des outils de biologie moléculaire plus adaptés aux conifères, tels que des promoteurs inductifs par blessure ou autres stress. En terminant, je peux dire que les objectifs de cette thèse ont été atteints. Nous avons réussi à isoler de nouveaux gènes chez *Picea glauca* et à étudier leur expression sous diverses conditions de stress, ainsi que le potentiel des jasmonates à les induire.

À regarder trop attentivement un seul arbre, on en oublie la forêt.

(Anonyme)

LISTE DES OUVRAGES CITÉS

- Adam SA, Nakagawa T, Swanson MS, Woodruff TK et Dreyfuss G. 1986. mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. Mol. Cell. Biol. 6: 2932-2943.**
- Akada S, Kung SD et Dube SK. 1993. Nucleotide sequence of a soybean chalcone synthase gene with a possible role in ultraviolet-B sensitivity, Gmchs6. Plant Physiol. 102: 699-701.**
- Albà MM et Pagès M. 1998. Plant proteins containing the RNA recognition motif. Trends Plant Sci. 3(1): 15-21.**
- Aldridge DC, Galt S, Giles D et Turner WB. 1971. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. pp. 1623-1627.**
- Alexander C, Faber N et Klaff P. 1998. Characterization of protein-binding to the spinach chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region. Nucleic Acids Res. 26(10): 2265-2272.**
- Arora R et Wisniewski ME. 1994. Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus persica* [L.] Batsch). II. A 60-Kilodalton bark protein in cold-acclimated tissues of peach is heat stable and related to the dehydrin family of proteins. Plant Physiol. 105: 95-101.**
- Artlip TS, Callahan AM, Bassett CL et Wisniewski ME. 1997. Seasonal expression of a dehydrin gene in sibling deciduous and evergreen genotypes of peach (*Prunus persica* [L.] Batsch). Plant Mol. Biol. 33: 61-70.**
- Baker J, Steele C et Dure L III. 1988. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. Plant Mol. Biol. 11: 277-291.**
- Baker SM et White EE. 1996. A chalcone synthase/stilbene synthase DNA probe for conifers. Theor. Appl. Genet. 92: 827-831.**
- Bandziulis RJ, Swanson MS et Dreyfuss G. 1989. RNA-binding proteins as developmental regulators. Genes Dev. 3: 431-437.**

- Beaulieu J, Daoust G et Plourde A. 1993. De l'ADN à la semence. Compte rendu de la journée d'échanges sur la recherche et le développement en génétique de l'épinette blanche au Québec. Rapport d'information LAU-X-105B, Ressources Naturelles Canada. Centre de Forestrerie des Laurentides, 23 mars 1993, pp. 27-29.
- Bell LR, Maine EM, Schedl P et Cline TW. 1988. Sex-lethal, a *Drosophila* sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similarity to RNA binding proteins. *Cell* 55: 1037-1046.
- Bergeron D, Beauseigle D et Bellemare G. 1993. Sequence and expression of a gene encoding a protein with RNA-binding and glycine-rich domains in *Brassica napus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1216: 123-125.
- Bergey DR, Howe GA et Ryan CA. 1996. Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12053-12058.
- Bewley JD, Reynolds TL et Olivier MJ. 1993. Evolving strategies in the adaptation to dessication. *Dans*: Close TJ et Bray EA (eds.). *Plant responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress*. *Curr. Top. Plant Physiol. Series Vol. 10*. The American Society of Plant Physiologists. Maryland, pp193-201.
- Bharti AK et Khurana JP. 1997. Mutants of *Arabidopsis* as tools to understand the regulation of phenylpropanoid pathway and UVB protection mechanisms. *Photochem. Photobiol.* 65(5): 765-776.
- Bingham PM, Chou T-B, Mims I et Zachar Z. 1988. On/off regulation of gene expression at the level of splicing. *Trends Genet.* 4: 134-138.
- Blackman SA, Wettlaufer SH, Obendorf RL et Leopold AC. 1991. Maturation proteins associated with dessication tolerance in soybean. *Plant Physiol.* 96: 868-874.
- Bordeleau C et Boulet B. 1989. Insectes et maladies des arbres: Québec-1988. *Suppl. For. Conserv.* 56. 32 p.
- Bowles D. 1990. Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 873-907.

- Butzen S. 1998. Conserver l'efficacité *Bt* grâce à la gestion de la résistance. TCN 69: 22.
- Buvoli M, Cobianchi F, Bestagno MG, Mangiarotti A, Bassi MT, Biamonti G et Riva S. 1990. Alternative splicing in the human gene for the core protein A1 generates another hnRNP protein. EMBO 9: 1229-1235.
- Cai Q, Moore GA et Guy CL. 1995. An unusual Group 2 LEA gene family in citrus responsive to low temperature. Plant Mol. Biol. 29: 11-23.
- Campbell MM et Ellis BE. 1992. Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures. III. Purification and characterization of phenylalanine ammonia-lyase. Plant Physiol. 98: 62-70.
- Campbell SA, Crone DE, Ceccardi TL, Close TJ. 1998. A ca. 40 kDa maize (*Zea mays* L.) embryo dehydrin is encoded by the *dhn2* locus on chromosome 9. Plant Mol. Biol. 38: 417-423.
- Carpenter CD, Kreps JA et Simon AE. 1994. Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. Plant Physiol. 104: 1015-1025.
- Cellier F, Conéjéro G, Breitler J-C, Casse F. 1998. Molecular and physiological responses to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower. Plant Physiol. 116: 319-328.
- Chandler PM, Munns R et Robertson M. 1993. Regulation of dehydrin expression. Dans: Close TJ et Bray EA (eds). Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. Curr. Top. Plant Physiol. Series Vol. 10. The American Society of Plant Physiologists. Maryland, pp.159-166.
- Chang S, Puryear J et Cairney J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Mol. Biol. Rep. 11: 113-116.
- Charest PJ, Devantier Y et Lachance D. 1996. Stable genetic transformation of *Picea mariana* (black spruce) via particle bombardment. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 32: 91-99.

- Chen R-D, Campeau N, Greer AF, Bellemare G et Tabaeizadeh Z. 1993. Sequence of a novel abscisic acid- and drought-induced cDNA from wild tomato (*Lycopersicon chilense*). *Plant Physiol.* 103: 301.
- Christie PJ, Alfenito MR et Walbot V. 1994. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194: 541-549.
- Church GM et Gilbert W. 1984. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991-1995.
- Claudot AC, Jay-Allemand C, Magel EA et Drouet A. 1993. Phenylalanine ammonia-lyase, chalcone synthase and polyphenolic compounds in adult and rejuvenated hybrid walnut tree. *Trees* 7: 92-97.
- Close TJ, Kortt AA et Chandler PM. 1989. A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Mol. Biol.* 13: 95-108.
- Close TJ et Chandler PM. 1990. Cereal dehydrins: serology, gene mapping and potential functional roles. *Aust. J. Plant Physiol.* 17: 333-344.
- Close TJ, Fenton RD et Moonan F. 1993a. A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide. *Plant Mol. Biol.* 23: 279-286.
- Close TJ, Fenton RD, Yang A, Asghar R, DeMason DA, Crone DE, Meyer NC et Moonan F. 1993b. Dehydrin: The Protein. *Dans*: Close TJ et Bray EA (eds). *Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. Current Topics in Plant Physiology. Series Vol. 10.* The American Society of Plant Physiologists. Maryland, pp. 104-117.
- Close TJ. 1996. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant.* 97: 795-803.
- Close TJ. 1997. Dehydrins: A commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plant.* 100: 291-296.

- Cobianchi F, Karpel RL, Williams KR, Notario V et Wilson SH. 1988. Mammalian heterogeneous ribonucleoprotein complex protein A1. *J. Biol. Chem.* 263: 1063-1071.
- Cohen Y, Gisi U et Nidermann T. 1993. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. *Phytopathology* 83(10): 1054-1062.
- Conconi A, Smerdon MJ, Howe GA et Ryan CA. 1996. The octadenoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature* 383: 826-829.
- Condit CM et Meagher RB. 1986. A gene encoding a novel glycine-rich structural protein of petunia. *Nature* 323: 178-181.
- Condit CM et Meagher RB. 1987. Expression of a gene encoding a glycine-rich protein in petunia. *Mol. Cell. Biol.* 7: 4273-4279.
- Constabel CP, Bergey DR et Ryan CA. 1995. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadenoid defense signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 407-411.
- Cramer CL, Bell JN, Ryder TB, Bailey JA, Schuch W, Bolwell GP, Robbins MP, Dixon RA et Lamb CJ. 1985. Co-ordinated synthesis of phytoalexin biosynthetic enzymes in biologically-stressed cells of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *EMBO J.* 4(2): 285-289.
- Creelman RA, Tierney ML et Mullet JE. 1992. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wound soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4938-4941.
- Creelman RA et Mullet J. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4114-4119.
- Creelman RA et Mullet JE. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 355-381.

- Crétin C et Puigdomènech P. 1990. Glycine-rich RNA-binding proteins from *Sorghum vulgare*. *Plant Mol. Biol.* 15: 783-785.
- Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler B, Benhamou N et Sarhan F. 1998. Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell* 10: 623-638.
- Danyluk J, Houde M, Rassart É et Sarhan F. 1994. Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant gramineae species. *FEBS Lett.* 344: 20-54.
- Daoust G, Plourde A, Beaulieu J. 1995. Influences of crown size and maturation on flower production and sex expression in *Picea glauca* treated with gibberellin A₄₇. *Tree Physiol.* 15: 471-475.
- Demole E, Lederer E et Mercier D. 1962. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helv. Chim. Acta.* 45: 675-685.
- Delseny M, Gaubier P, Hull G, Saez-Vasquez J, Gallois P, Raynal M, Cooke R et Grellet F. 1994. Nuclear genes expressed during seed desiccation: relationship with responses to stress. *Dans: Basra AS (ed.). Stress-induced gene expression in plants.* Hardwood Academic Publishers, USA, pp. 25-59.
- Devereux J, Haeberli P et Smithies O. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12: 387-395.
- Didierjean L, Frendo P et Burkard G. 1992. Stress responses in maize: Sequence analysis of cDNAs encoding glycine-rich proteins. *Plant Mol. Biol.* 18: 847-849.
- Dittrich H, Kutchan TM et Zenk MH. 1992. The jasmonate precursor, 12-oxo-phytodienoic acid, induces phytoalexin synthesis in *Petroselinum hortense* cell cultures. *FEBS Lett.* 309: 33-36.
- Dixon RA et Paiva NL. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.

- Doares SH, Narvaez-Vasquez J, Conconi A et Ryan CA. 1995. Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol.* 108: 1741-1746.
- Dreyfuss G, Swanson MS et Pinol-Roma S. 1988. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends Biochem. Sci.* 13: 86-91.
- Dreyfuss G, Matunis MJ, Pinol-Roma S et Burd CG. 1993. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 289-321.
- Dure L III, Crouch M, Harada J, Ho T-HD, Mundy J, Quatrano R, Thomas T et Sung ZR. 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 12: 475-486.
- Dure L III. 1993a. A repeating 11-mer amino acid motif and plant dessication. *Plant J.* 3: 363-370.
- Dure L III. 1993b. Structural Motifs in Lea Proteins. *Dans: Close TJ et Bray EA (eds). Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. Current Topics in Plant Physiology. Series Vol. 10. The American Society of Plant Physiologists. Maryland, pp. 91-103.*
- Ebel J et Cosio EG. 1994. Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 148: 1-36.
- El Euch C, Jay-Allemand C, Pastuglia M, Doumas P, Charpentier JP, Capelli P et Jouanin L. 1998. Expression of antisense chalcone synthase RNA in transgenic hybrid walnut microcuttings. Effect on flavonoid content and rooting ability. *Plant Mol. Biol.* 38: 467-479.
- Ellard-Ivey M et Douglas CJ. 1996. Role of jasmonates in the elicitor- and wound-inducible expression of defense genes in parsley and transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 112: 183-192.
- Estruch JJ, Carozzi NB, Desai N, Duck NB, Warren GW et Koziel MG. 1997. Transgenic plants: An emerging approach to pest control. *Nature Biotech.* 15: 137-141.

- Fang R-X, Pang Z, Gao D-M, Mang K-Q et Chua N-H. 1991. cDNA sequence of a virus-inducible, glycine-rich protein gene from rice. *Plant Mol. Biol.* 17: 1255-1257.
- Farmer EE et Ryan CA. 1990. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7713-7716.
- Farmer EE, Johnson RR et Ryan CA. 1992. Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol.* 98: 995-1002.
- Farmer EE et Ryan CA. 1992. Octadecanoid precursors of jamonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4(2): 129-134.
- Farmer EE. 1994. Fatty acid signalling in plants and their associated microorganisms. *Plant Mol. Biol.* 26: 1423-1437.
- Feinbaum RL et Ausubel FM. 1988. Transcriptional regulation of the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase gene. *Mol. Cell. Biol.* 8: 1985-1992.
- Feinbaum RL, Storz G et Ausubel FM. 1991. High intensity and blue light regulated expression of chimeric chalcone synthase genes in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *Mol. Gen. Genet.* 226: 449-456.
- Finch-Savage WE, Pramanik SK et Bewley JD. 1994. The expression of dehydrin proteins in dessication-sensitive (recalcitrant) seeds of temperate trees. *Planta* 193: 478-485.
- Fink J, Jeblick W, Blaschek W et Kauss H. 1987. Ca²⁺ and polyamines activate the plasma membrane located 1,3-β-glucan synthase. *Planta* 171: 130-135.
- Fliegmann J, Schröder G, Schanz S, Britsch L et Schröder J. 1992. Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Mol. Biol.* 18: 489-503.
- Forêt de chez nous. Supplément de LaTerre de chez nous. 1998. 9 (2): 16-17.
- Ge H, Zuo P et Manley JL. 1991. Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with drosophila regulators. *Cell* 66: 373-382.

- Gilmour SJ, Artus NN et Thomashow MF. 1992. cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 18: 13-21.
- Gläßgen WE, Rose A, Madlung J, Koch W, Gleitz J et Seitz HU. 1998. Regulation of enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in carrot cell cultures in response to treatment with ultraviolet light and fungal elicitors. *Planta* 204: 490-498
- Goday A, Jensen AB, Culianez-Macia FA, Mar Alba M, Figueras M, Serratosa J, Torrent M et Pages M. 1994a. The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell* 6: 351-360.
- Goday A, Pla M, Niogret MF, Jensen A, Figueras M et Pagès M. 1994b. Regulation of the rab17 gene in ABA-deficient and ABA-insensitive viviparous mutants of maize. *Dans: Cherry, JH (ed.) Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants. NATO ASI Series, Vol II 86. Springer-Verlag, Berlin, pp. 335-343.*
- Godoy JA, Pardo JM et Pinto-Toro JA. 1990. A tomato cDNA inducible by salt stress and abscisic acid: nucleotide sequence and expression pattern. *Plant Mol. Biol.* 15: 695-705.
- Godoy JA, Lunar R, Torres-Schumann S, Moreno R, Rosa M, Pintor-Toro JA. 1994. Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol. Biol.* 26: 1921-1934.
- Gomez J, Sanchez-Martinez D, Stiefel V, Rigau J, Puigdomènech P et Pagès M. 1988. A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. *Nature* 334: 262-264.
- Graham JS, Hall G, Pearce G et Ryan CA. 1986. Regulation of synthesis of proteinase inhibitors I and II mRNAs in leaves of wounded tomato plants. *Planta* 169: 399-405.
- Grossi M, Gulli M, Stanca AM et Cattivelli L. 1995. Characterization of two barleys genes that respond rapidly to dehydration stress. *Plant Sci.* 105: 71-80.

- Guilinan MJ et Niu X. 1996. cDNA encoding a wheat (*Triticum aestivum* cv. Chinese Spring) glycine-rich RNA-binding protein. *Plant Mol. Biol.* 30: 1301-1306.
- Gundlach H, Mueller MJ, Kutchan TM et Zenk MH. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-treated in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2389-2393.
- Hahlbrock K et Scheel D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 347-369.
- Hammond-Kosack KE et Jones JDG. 1997. Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 575-607.
- Han B et Kermodé AR. 1996. Dehydrin-like proteins in castor bean seeds and seedlings are differentially produced in response to ABA and water-deficit-related stresses. *J. Exp. Bot.* 47(300): 933-939.
- Harrison MJ et Dixon RA. 1993. Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 643-654.
- Harrison MJ et Dixon RA. 1994. Spatial patterns of expression of flavonoids/isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Globus versiforme*. *Plant J.* 6: 9-20.
- Heintzen C, Melzer S, Fuscher R, Kappeler S, Apel K et Staiger D. 1994. A light and temperature-entrained circadian clock control expression of transcripts encoding nuclear proteins with homology to RNA-binding proteins in meristematic tissue. *Plant J.* 5: 799-813.
- Higgins CF. 1991. Stability and degradation of mRNA. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 3: 1013-1018.

- Hildmann T, Ebnet M, Pena-Cortés H, Sanchez-Serrano JJ et Willmitzer L. 1992. General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* 4: 1157-1170.
- Hirose T, Sugita M et Sugiura M. 1993. cDNA structure, expression and nucleic acid-binding properties of three RNA-binding proteins in tobacco: occurrence of tissue-specific alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 21(17): 3981-3987.
- Hollick JB et Gordon MP. 1993. A poplar tree proteinase inhibitor-like gene promoter is responsive to wounding in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 22: 561-572.
- Holton TA et Cornish EC. 1995. Genetics and biochemistry of anthocianin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1071-1083.
- Horvath DP et Olson PA. 1998. Cloning and characterization of cold-regulated glycine-rich RNA binding protein genes from leafy spurge (*Euphorbia esula* L.) and comparison to heterologous genomic clones. *Plant Mol. Biol.* 38: 531-538.
- Houde M, Danyluk J, Laliberté J-F, Rassart E, Dhindsa RS et Sarhan F. 1992. Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding a 50-kilodalton protein specifically induced by cold acclimation in wheat. *Plant Physiol.* 99: 1381-1387.
- Ito M, Ichinose Y, Kato H, Shiraishi T et Yamada T. 1997. Molecular evolution and functional relevance of the chalcone synthase genes of pea. *Mol. Gen. Genet.* 255: 28-37
- Jarvis SB, Taylor MA, MacLeod MR, Davies HV. 1996. Cloning and characterization of the cDNA clones of three genes that are differentially expressed during dormancy-breakage in the seeds of Douglas Fir (*Pseudotsuga merziesii*). *J. Plant Physiol.* 147: 559-566.
- Kaldenhoff R et Richter G. 1989. Sequence of cDNA for a novel light-induced glycine-rich protein. *Nucleic Acids Res.* 17(7): 2853.
- van Kan JAL, Cornelissen BJC et Bol JF. 1988. A virus-inducible tobacco gene encoding a glycine-rich protein shares putative regulatory elements with the ribulose

- biphosphate carboxylase small subunit gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1(3): 107-112.
- Keene JD et Query CC. 1991. Nuclear RNA-binding proteins. *Prog. Nucleic Acid Res.* 41: 179-202.
- Keller B, Sauer N et Lamb CJ. 1988. Glycine-rich cell wall proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vacuolar system. *EMBO J.* 7(12): 3625-3633.
- Kenan, DJ, Query CC et Keene JD. 1991. RNA recognition: Towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 16: 214-220.
- Kiyosue T, Yamaguchi-Schinozaki K et Shinozaki K. 1994. Characterization of two cDNAs (ERD10 and ERD14) corresponding to genes that respond rapidly to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 35(2): 225-231.
- Klopfenstein NB, McNabb Jr. HS, Hall RB, Hart ER et Thornburg RW. 1991. Potential for heterologous promoters to regulate expression of chimeric plant defense genes in transgenic hybrid poplar. *Dans: International Symposium on The Applications of Biotechnology to Tree Culture, Protection and Utilization.* August 5-8, 1991. Columbus, Ohio.
- Koda Y. 1997. Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events. *Physiol. Plant.* 100: 639-646.
- Koiwa H, Bressan RA et Hasegawa PM. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant. Sci.* 2: 379-384.
- Koes RE, Spelt CE, Mol JNM et Gerats AGM. 1987. The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida* (V30): Sequence homology, chromosomal localisation and evolutionary aspects. *Plant Mol. Biol.* 10: 375-385.
- Koes RE, Spelt CE et Mol JNM. 1989a. The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida* (V30): Differential, light-regulated expression during flower development and UV light induction. *Plant Mol. Biol.* 12: 213-225.

- Koes RE, Spelt CE, van den Elzen PJM et Mol JNM. 1989b. Cloning and molecular characterisation of the chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida*. *Gene* 81: 245-257.
- Kosak M. 1989. The scanning model for translation: An update. *J. Cell Biol.* 108: 229-241.
- Kreuzaler F, Ragg H, Heller W, Tesch R, Witt I, Hammer D et Hahlbrock K. 1979. Flavanone synthase from *Petroselinum hortense*. Molecular weight, subunit composition, size of messenger RNA and absence of pantetheinyl residue. *Eur. J. Biochem.* 99: 89-96.
- Kubasek WL, Shirley BW, McKillop A, Goodman HM, Briggs W et Ausubel FM. 1992. Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 4: 1229-1236.
- Kusano T, Aguan K, Abe M et Sugawara K. 1992. Nucleotide sequence of a rice rab16 homologue gene. *Plant Mol. Biol.* 18: 127-129.
- Kyte J et Doolittle RF. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- Labhili M, Joudrier P et Gautier M-F. 1995. Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. *Plant Sci.* 112 :219-230.
- Lalancette D et Librowicz. 1998. L'industrie agroalimentaire mondiale à la croisée des chemins. *Le Monde Alimentaire* 2(4): 24-27.
- Lamb CJ et Dixon RA. 1994. Molecular mechanisms underlying induction of plant defence gene transcription. *Biochem. Soc. Symp.* 60: 241-248.
- Lang V et Palva ET. 1992. The expression of a *rab*-related gene, *rab18*, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol. Biol.* 20: 951-962.
- Larkin PJ. 1981. Plant Protoplast agglutination and immobilization. *Rec. Adv. Phytochem.* 15: 135-160.

- Lee J, Parthier B et Löbler M. 1996. Jasmonate signalling can be uncoupled from abscisic acid signalling in barley: identification of jasmonate-regulated transcripts which are not induced by abscisic acid. *Planta* 199: 625-632.
- Lehmann J, Atzhorn R, Brückner C, Reinbothe S, Leopold J, Wasternack C et Parthier B. 1995. Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments. *Planta* 197: 156-162.
- Lei M et Wu R. 1991. A novel glycine-rich cell wall protein gene in rice. *Plant Mol. Biol.* 16: 187-198.
- Levitt J. 1980. Response of Plants to Environmental Stresses: Chilling, Freezing and High Temperature Stresses. Dans: Kozlowski TT (ed.) *Physiological Ecology: A Serie of Monographs, Texts and Treatises*, vol 1, 2ième ed. Academic Press, New York. pp. 23-64.
- Leyva A, Jarillo JA, Salinas J, Martinez-Zapater JM. 1995. Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiol.* 108: 39-46.
- Li Y, Ye L, Sugita M et Sugiura M. 1991. Tobacco nuclear gene for the 31 kd chloroplast ribonucleoprotein: genomic organization, sequence analysis and expression. *Nucleic Acids Res.* 19(11): 2987-2991.
- Lipphardt S, Brettschneider R, Kreuzaler F, Schell J et Dangl JL. 1988. UV-inducible transient expression in parsley protoplasts identifies regulatory *cis*-elements of a chimeric *Antirrhinum majus* chalcone synthase gene. *EMBO J.* 7(13): 4027-4033.
- Luo M, Liu J-H, Mohapatra S, Hill RD et Mohapatra SS. 1992. Characterization of a gene family encoding abscisic acid- and environmental stress-inducible proteins of *Alfalfa*. *J. Biol. Chem.* 267: 15367-15374.
- MacHardy WE et Beckman CH. 1973. Water relations in American elm infected with *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology* 63: 98-103.
- Mattaj IW. 1989. A binding consensus: RNA-protein interactions in splicing, snRNPs, and sex. *Cell* 57: 1-3.

- Mattaj IW. 1990. Splicing stories and poly(A) tales: An update on RNA processing and transport *Curr. Opin. Cell Biol.* 2: 528-538.
- Mayne MB, Coleman JR et Blumwald, E. 1996. Differential expression during drought conditioning of a root-specific S-adenosylmethionine synthase from jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) seedlings. *Plant Cell Env.* 19: 958-966.
- van der Meer IM, Stuitje AR et Mol JNM. 1993. Regulation of general phenylpropanoid and flavonoid gene expression. *Dans: Verma DPS (ed.)*. Control of plant gene expression. Boca Raton, Fl: CRC Press, pp. 125-155.
- Meier UT et Blobel G. 1992. Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm. *Cell* 70: 127-138.
- Merril BM, Stone KL, Cobianchi F, Wilson SH et Williams KR. 1988. Phenylalanines that are conserved among several RNA-binding proteins form part of a nucleic acid-binding pocket in the A1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein. *J. Biol. Chem.* 263: 3307-3313.
- Messner B et Boll M. 1993. Elicitor-mediated induction of enzymes of lignin biosynthesis and formation of lignin-like material in a cell suspension culture of spruce (*Picea abies*). *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 34: 261-269.
- Miyamoto K, Oka M et Ueda J. 1997. Update on the possible mode of action of the jasmonates: Focus on the metabolism of cell wall polysaccharides in relation to growth and development. *Physiol. Plant.* 100: 631-638.
- Mizukami H, Tabira Y et Ellis BE. 1993. Methyl jasmonate-induced rosmarinic biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 12: 706-709.
- Mol J, Jenkins G, Schafer E et Weiss D. 1996. Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15: 525-557.
- Mol J, Stuitje A, Gerats A et Koes R. 1988. Cloned genes of plant phenylpropanoid metabolism. *Plant Mol. Biol. Rep.* 6: 274-279.

- Mueller MJ, Brodschelm W, Spannagl E et Zenk MH. 1993. Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7490-7494.
- Mueller MJ. 1997. Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiol. Plant.* 100: 653-663.
- Müller-Uri F, Parthier B et Nover L. 1988. Jasmonate-induced alteration of gene expression in barley leaf segments analyzed by *in vivo* and *in vitro* protein synthesis. *Planta* 176: 241-248.
- Nagai K, Oubridge C, Jessen TH, Li J et Evans PR. 1990. Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. *Nature* 348: 515-520.
- Naqvi SMS, Park K-S, Yi S-Y, Lee H-W, Bok SH and Choi D. 1998. A glycine-rich RNA-binding protein gene is differentially expressed during acute hypersensitive response following Tobacco Mosaic Virus infection in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 37: 571-576.
- van Nocker S et Vierstra RD. 1993. Two cDNAs from *Arabidopsis thaliana* encode putative RNA binding proteins containing glycine-rich domains. *Plant Mol. Biol.* 21 (4): 695-699.
- Nordin K, Vahala T et Palva ET. 1993. Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol. Biol.* 21: 641-653.
- Ohta H, Suzuki G, Awai K, Masuda T, Kato T, Shibata D et Takamiya K-I. 1997. Distinct pathways for jasmonate- and elicitor-induced expressions of a cytochrome P450 gene in soybean suspension-cultured cells. *Physiol. Plant.* 100: 647-652.
- de Oliveira DE, Seurinck J, Inzé D, Van Montagu M et Botterman J. 1990. Differential expression of five *Arabidopsis* genes encoding glycine-rich proteins. *Plant Cell* 2: 427-436.

- de Oliveira DE, Franco LO, Simoens C, Seurinck J, Coppieters J, Botterman J et van Montagu M. 1993. Inflorescence-specific genes from *Arabidopsis thaliana* encoding glycine-rich proteins. *Plant J.* 3(4): 495-507.
- Oppenheim AB et Chet I. 1992. Cloned chitinases in fungal plant-pathogen control strategies. *Trends Biotech.* 10: 392-394.
- Palva TE. 1994. Gene expression under low temperature stress. *Dans: Basra, AS (ed.). Stress-induced gene expression in plants.* Hardwood Academic Publishers, USA, pp. 103-130.
- Pelah D, Wang W, Altman A, Shoseyov O et Bartels D. 1997. Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response. *Physiol. Plant.* 99: 153-159.
- Pena-Cortés H, Sanchez-Serrano J, Rocha-Sosa M et Willmitzer L. 1988. Systemic induction of proteinase-inhibitor-II gene expression in potato plants by wounding. *Planta* 174: 84-89.
- Pena-Cortés H, Liu X, Sanchez Serrano J, Schmid R et Willmitzer L. 1992. Factors affecting gene expression of patatin and proteinase-inhibitor-II gene families in detached potato leaves: Implications for their co-expression in developing tubers. *Planta* 186(4): 495-502.
- Pena-Cortés H, Albrecht T, Prat S, Weiler EW et Willmitzer L. 1993. Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* 191: 123-128.
- Pena-Cortés H et Willmitzer L. 1995. The Role of Hormones in Gene Activation in response to wounding. *Dans: Davies PJ (ed). Plant Hormones.* Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 395-414.
- Pla M, Gomez J, Goday A et Pages M. 1991. Regulation of the abscisic acid-responsive gene *rab28* in maize *viviparous* mutants. *Mol. Gen. Genet.* 230: 394-400.
- Plana M, Itarte E, Eritja R, Goday A, Pages M et Martinez MC. 1991. Phosphorylation of maize RAB-17 protein by casein kinase 2. *J. Biol. Chem.* 266: 22510-22514.

- Query CC, Bentley RC et Keene JD. 1989. A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell* 57: 89-101.
- Quigley F, Villiot M-L et Mache R. 1991. Nucleotide sequence and expression of a novel glycine-rich protein gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 17: 949-952.
- Reid DM et Wample RL. 1985. Water Relations and Plant Hormones. *Dans: Pharis RP et Reid DM (eds). Hormonal Regulation of Development III. Role of Environmental Factors. Encyclopedia of Plant Physiology New Series. Volume 11. Springer-Verlag, New York, pp. 513-578.*
- Reinbothe S, Reinbothe C et Parthier B. 1993a. Methyl jasmonate represses translation initiation of a specific set of mRNAs in barley. *Plant J.* 4: 459-467.
- Reinbothe S, Reinbothe C et Parthier B. 1993b. Methyl jasmonate-regulated translation of nuclear-encoded chloroplast proteins in barley. *J. Biol. Chem.* 268: 10606-10611.
- Reinbothe S, Mollenhauer B et Reinbothe C. 1994. JIPs and RIPs: The Regulation of Plant Gene Expression by Jasmonates in Response to Environmental Cues and Pathogens. *Plant Cell* 6: 1197-1209.
- Robertson M, Cuming AC et Chandler PM. 1995. Sequence analysis and hormonal regulation of a dehydrin promoter from barley, *Hordeum vulgare*. *Physiol. Plant.* 94: 470-478.
- Rouse DT, Marotta R et Parish RW. 1996. Promoter and expression studies on an *Arabidopsis thaliana* dehydrin gene. *FEBS Lett.* 381: 252-256.
- Ryan C. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insect and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 425-449.
- Ryan CA. 1992. The search of the proteinase inhibitor-inducing factor, PIIF. *Plant Mol. Biol.* 19 (1): 123-133.
- Ryder TB, Hedrick SA, Bell JN, Liang X, Clouse SD et Lamb CJ. 1987. Organization and differential activation of a gene family encoding the plant defense enzyme chalcone synthase in *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Gen. Genet.* 210: 219-233.

- Sakai A et Larcher W. 1987. Frost survival of plants. Springer Verlag, Berlin, 321 pp.
- Sambrook J, Fritsch EF et Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A laboratory Manual, 2nd Edn. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger F, Nicklen JA et Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.
- Schmid J, Doerner PW, Clouse SD, Dixon RA et Lamb CJ. 1990. Developmental and environmental regulation of a bean chalcone synthase promoter in transgenic tobacco. Plant Cell 2: 619-631.
- Schröder J, Raiber S, Berger T, Schmidt A, Schmidt J, Soares-Sello AM, Bardshiri E, Strack D, Simpson TJ, Veit M et Schröder G. 1998. Plant polyketide synthases: a chalcone synthase-type enzyme which performs a condensation reaction with methylmalonyl-CoA in the biosynthesis of C-methylated chalcones. Biochem 37 (23): 8417-8425.
- Schweizer P, Gees R et Mösinger E. 1993. Effect of jasmonic acid on the interaction of barley (*Hordeum vulgare* L.) with powdery mildew *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. Plant Physiol. 102: 503-511.
- Sembdner G et Parthier B. 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44: 569-589.
- Shen L, Outlaw WH Jr et Epstein LM. 1995. Expression of an mRNA with sequence similarity to pea dehydrin (Psdhn 1) in guard cell of *Vicia faba* in response to exogenous abscisic acid. Physiol. Plant. 95: 99-105.
- Showalter AM, Butt AD et Kim S. 1992. Molecular details of tomato extensin and glycine-rich protein gene expression. Plant Mol. Biol. 19: 205-215.
- Showalter AM. 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. Plant Cell 5: 9-23.
- Simon L, Lalonde M, Bruns TD. 1992. Specific amplification of 18 S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. Appl. Environ. Microbiol. 58: 291-295.

- Sinha KM, Sachdev A, Johari RP et Mehta SL. 1996. *Lathyrus dehydrin*: A drought inducible cDNA clone - Isolation and Characterization. *J. Plant Biochem.* 5: 97-101.
- Smith CWJ, Patton JG et Nadal-Ginard B. 1989. Alternative splicing in the control of gene expression. *Annu. Rev. Genet.* 23: 527-577.
- Smith CJ. 1996. Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. *New Phytol.* 132: 1-45.
- Staswick PE. 1992. Jasmonate, genes, and fragrant signals. *Plant Physiol.* 99: 804-807.
- Steinart PM, Mack JW, Korge BP, Gan S-Q, Haynes SR et Steven AC. 1991. Glycine loops in proteins: their occurrence in certain intermediate filament chains, loricrins and single stranded RNA binding proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* 13: 130-139.
- Stermer BA, Schmid J, Lamb CJ et Dixon RA. 1990. Infection and stress activation of bean chalcone synthase promoters in transgenic tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3(6): 381-388.
- Sturm A. 1992. A wound-inducible glycine-rich protein from *Daucus carota* with homology to single-stranded nucleic acid-binding proteins. *Plant Physiol.* 99: 1689-1692.
- Suzuki G, Ohta H, Kato T, Igarashi T, Sakaki F, Shibata D, Takano A, Masuda T, Shioi Y et Takamiya K. 1996. Induction of a novel cytochrome P450 (CYP93 family) by methyl jasmonate in soybean suspension-cultured cells. *FEBS Lett.* 383: 83-86.
- Takeda J, Abe S, Hirose Y et Ozeki Y. 1993. Effect of light and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on the level of messenger RNAs for phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase in carrot cells cultured in suspension. *Physiol. Plant.* 89: 4-10.
- Tropf S, Lanz T, Rensing SA, Schröder J et Schröder G. 1994. Evidence that stilbene synthase have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. *J. Mol. Evol.* 38: 610-618.

- Vilardell J, Goday A, Freire MA, Torrent M, Martinez C, Torne JM et Pages M. 1990. Gene sequence, developmental expression and protein phosphorylation of RAB 17 in maize. *Plant Mol. Biol.* 14: 423-432.
- Wasternack C et Parthier B. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci.* 2(8): 302-307.
- Weidhase RA, Kramell H, Lehmann J, Liebisch HW, Lerbs W, Parthier B. 1987. Methyl jasmonate-induced changes in the polypeptides pattern of senescing barley leaf segments. *Plant Sci.* 51: 177-186.
- Welin BV, Olson A, Nylander M, Palva TE. 1994. Characterization and differential expression of *dhn/lea/rab*-like genes during cold acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 26: 131-144.
- Wienand U, Weydemann U, Niesbach-Klösigen U, Peterson PA et Saedler H. 1987. Molecular cloning of the C2 locus of *Zea mays* the gene coding for chalcone synthase. *Mol. Gen. Genet.* 203: 202-
- Wisniewski M, Close J, Artlip T, Arora R. 1996. Seasonal patterns of dehydrins and 70-kDa heat-shock proteins in bark tissues of eight species of woody plant. *Physiol. Plant.* 96: 496-505.
- Wolfraim LA, Langis R, Tyson H et Dhindsa RS. 1993. cDNA sequence, expression, and transcript stability of a cold acclimation-specific gene, *cas18*, of alfalfa (*Medicago falcata*) cells. *Plant Physiol.* 101: 1275-1282.
- Wood AJ et Goldsbrough PB. 1997. Characterization and expression of dehydrins in water-stressed *Sorghum bicolor*. *Physiol. Plant.* 99: 144-152.
- Xu Y, Chang P-FL, Liu D, Narasimhan ML, Raghothama KG, Hasegawa PM et Bressan RA. 1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* 6: 1077-1085.
- Zhu Q, Dröge-Laser W, Dixon RA et Lamb C. 1996. Transcriptional activation of plant defense genes. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 6: 624-630.

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available

UMI