

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
Cátedra de Biología Celular y Molecular



**“Estudios funcionales de los factores
de transcripción de girasol de tipo
HD-Zip en el desarrollo vegetal
y la adaptación al medio ambiente”**

Autora: Lic. Eva Carolina Rueda

Directora: Dra. Raquel Lía Chan

Año: 2008

Indice	3
Agradecimientos	7
“Dedicada a ...”	8
Antecedentes	11
I.- ABREVIATURAS	13
II.- RESUMEN	16
III.- ABSTRACT	19
IV.- INTRODUCCIÓN GENERAL	22
IV.1.- EL DESARROLLO VEGETAL	23
IV.2.- FOTOMORFOGÉNESIS	25
IV.3.- EL DESARROLLO FLORAL	30
IV.3.1.-Influencia de la luz en la floración	34
IV.3.2.- Las giberelinas promueven la floración	37
IV.3.3.- La vía autónoma y la vernalización	39
IV.4.- EL ESTRÉS EN EL DESARROLLO VEGETAL.	40
IV.4.1.- Mecanismo de <i>Shade-avoidance</i>.	43
IV.4.3.- El estrés oxidativo.	47
IV.4.3.1.- Estrés oxidativo generado por altas intensidades lumínicas	50
IV.4.3.2.- Estrés oxidativo generado por herbicidas.	54
IV.5.- FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO VEGETAL	57
IV.5.1.- Familia HD-Zip	59
IV.5.2.- Proteínas HD-Zip de <i>Helianthus annuus</i>.	65
IV.6.- <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Helianthus annuus</i>.	66
IV.6.1.- <i>Arabidopsis thaliana</i>	66
IV.6.2.- <i>Helianthus annuus</i>.	68
V.- OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS.	73

VI.- MATERIALES Y MÉTODOS.	75
VI.1.- ESPECIES VEGETALES UTILIZADAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.	76
VI.1.1.- Cultivo y tratamientos de plantas de girasol.....	76
VI.1.2.- Cultivo, transformación y tratamientos de plantas <i>Arabidopsis thaliana</i>	77
VI.2.- CEPAS BACTERIANAS.	82
VI.3.- PLÁSMIDOS.	83
VI.4.- SOLUCIONES Y REACTIVOS.	84
VI.5.- OLIGONUCLEÓTIDOS Y SONDAS.	86
VI.6.- MÉTODOS PARA EL CLONADO DE FRAGMENTOS DE ADN Y ANÁLISIS DE RECOMBINANTES.	87
VI.6.1.- Minipreparación de ADN plasmídico.	87
VI.6.2.- Digestión del ADN con endonucleasas de restricción	89
VI.6.3.- Ligación de moléculas de ADN.	89
VI.6.4.- Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa.	89
VI.6.5.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa.	90
VI.6.6.- Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.	91
VI.6.7.- Transformación de bacterias.	92
VI.6.7.1.- Electrotransformación de <i>Escherichia coli</i>	92
VI.6.7.2.- Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	92
VI.6.8.- Marcación de fragmentos de ADN doble hebra por el método de cebado al azar.	93
VI.6.9.- Determinación de la secuencia de moléculas de ADN.	94
VI.6.10.- Clonado de los genes de interés en el vector pBI 121.3	94
VI.7.- PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS VEGETALES.	97
VI.7.1.- Preparación de ARN total de girasol.	97
VI.7.2.- Preparación de ARN total de <i>Arabidopsis thaliana</i>	98

VI.7.3.- Minipreparación de ADN total de <i>Arabidopsis thaliana</i>	98
VI.7.4.- Cuantificación de ácidos nucleicos.	99
VI.8.- MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.	99
VI.8.1.- Electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes. ...	100
VI.8.2.- Transferencia del ARN a membranas de nylon.	100
VI.8.3.- Hibridización de membranas de nylon.	101
VI.8.4.- PCR en tiempo real.	101
VII.- RESULTADOS.	103
Capítulo 1: <i>HAHB1</i>, un gen de girasol perteneciente a la subfamilia HD-Zip I.	104
1.1.- ESTRUCTURA DEL GEN.	105
1.1.1.- Características generales.	105
1.1.2.- Comparación de secuencias dentro de la subfamilia.	107
1.1.3.- El gen <i>HAHB1</i> presenta un intrón en una posición atípica	113
1.2.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>HAHB1</i>	116
1.2.1.- Niveles de expresión en órganos y tejidos de girasol.	116
1.2.2.- Regulación de la expresión por factores ambientales.	118
1.3.- ESTUDIOS FUNCIONALES DEL GEN <i>HAHB1</i> EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>Arabidopsis thaliana</i>	121
1.3.1.- Obtención de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformadas que expresan el gen <i>HAHB1</i>	122
1.3.2.- Fenotipo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformadas en condiciones normales de crecimiento.	124
1.3.3.- Análisis del fenotipo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformadas crecidas en condiciones de estrés salino.	128
1.3.5.- Análisis del efecto de las condiciones de iluminación en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformadas.	130
1.4.- DISCUSIÓN.....	132
Capítulo 2: <i>HAHB10</i>, un gen de girasol perteneciente a la subfamilia HD-Zip II.	141
2.1.- ESTRUCTURA DEL GEN.	142
2.1.1.- Características generales.	142

2.1.2.- Comparación de secuencias dentro de la subfamilia.	144
2.2.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>HAHB10</i>	147
2.2.1.- Niveles de expresión en distintos órganos y tejidos de girasol.	149
2.2.2.- Regulación de la expresión por factores ambientales.	151
2.3.- ESTUDIOS FUNCIONALES DEL GEN <i>HAHB10</i> EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>Arabidopsis thaliana</i>	153
2.3.1.- Fenotipo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que expresan el gen <i>HAHB10</i> , crecidas en condiciones normales.	153
2.3.2.- Análisis del fenotipo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformadas tratadas con hormonas vegetales.	159
2.3.3.- Análisis del fenotipo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformadas en respuesta a diferentes condiciones de iluminación.	161
2.3.4.- Análisis del fenotipo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformadas tratadas con Metil Viológeno.	168
2.4.- DISCUSIÓN	174
VIII.- CONSIDERACIONES GENERALES.	186
IX.- CONCLUSIONES.	189
X.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	193

AGRADECIMIENTOS

A las Instituciones que a través de subsidios y becas hicieron posible el desarrollo de la presente Tesis:

- A la empresa BIOCERES SA por haberme otorgado la beca (octubre de 2003 hasta marzo de 2004).
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por haberme otorgado la beca de posgrado tipo I (abril de 2004 hasta marzo de 2008).
- Asimismo a la ANPCyT, CONICET, Universidad Nacional del Litoral y BIOCERES SA, que financiaron a lo largo del tiempo distintas etapas del proyecto de investigación del cual forma parte el presente trabajo.

A la Dra. Raquel Chan por haberme aceptado como becaria y dirigir el presente trabajo.

Al Dr. Daniel Gonzalez, co-director de beca, por sus aportes científicos.

Al Dr. Juan Claus por su predisposición.

A mis compañeros de laboratorio, por tantas horas de trabajo compartidas.

Dedicada a ...

Quiero dedicar esta Tesis a todos los que me levantaron, empujaron, y acompañaron para que hoy, a esta hora, esté sentada escribiendo estas líneas. A todos los que en innumerables oportunidades preguntaron ¿cómo vas con la tesis?. Hace meses que esperaba llegar a este punto, y ahora me doy cuenta que es el capítulo más difícil de escribir. Tal vez, más fácil sería concluir la oración aquí, y quedo bien con “todos”...¿verdad? No, creo que lo mejor es nombrarlos, porque están conmigo, aquí adentro...

- A mi mamá y a mi papá, **Susana y Rubén**, por todo (es mucho y como decís vos papá, el ejemplo reduce el concepto).
- A mis hermanos **Lauri** y **Juancho**, por todo también.
- Al resto de mi familia **tíos, abuelos, cuñados** y a **María Elena**, por todo el cariño y apoyo.
- A mis amigos...¿Por dónde empezar? Están en todos lados, desde Santa Fe hasta Suiza.

Y si, aunque no te lo merecés, **Ernesto**, sos el primero que viene a mi cabeza cuando pienso en amigos. Gracias por acompañarme y ayudarme con el diseño de la Tesis.

A la **Romi** y a **Leyla** ... Gracias por acompañarme siempre.

A la colorada, **Ale**, gracias por escucharme y acompañarme... me agarraste en los momentos más críticos... (aunque ahora estás lejos suertuda...!)

Eli, Elina, Rubia, Welchen... El día que nos conocimos, no me diste bolilla. Dos días más tarde, me regalaste un portalámparas para que vea mejor en el laboratorio y hace no mucho tiempo atrás, te jugaste por mí, y me defendiste con tu cabeza. Sos una persona muy linda y muy especial. Gracias por todo el cariño, la confianza incondicional, y todos los momentos que compartimos. Y aunque no me gusta, te lo digo: tenés razón.

A los de la banda:, **Ana, Fede**, la **Tia** (Georgina), **Rosina** y **Alejandro**

A la **Cele**, a **Silvina** (otra colorada), la **lala** y a **Hipólito** por la oreja prestada.

- A quienes compartieron conmigo las tareas de docencia: Graciela, Rosa, Esteban, Martuchi, Eduardo y Carolina. Gracias por tantas horas, parcialitos, discusiones y anécdotas compartidas.
- A Adriana Tron, gracias **Adri**, por tu apoyo de siempre, tus consejos y por tu amistad.
- A **Daniel Gonzalez**, por todas las charlas, por compartir recitales y música.
- A la Jefa **Rosa Markariani**... Gracias Rosa, por "empujarme" (no digo como me decís vos, porque quedaría grosero...), por las oportunidades, por la buena onda, y sobretodo por el cariño que demostrás.
- A alguien que tiene que aguantarme ahora: **Pato**, muchas gracias por escucharme y entenderme.
- Al **Ale** y **Analía**... sin ustedes, no estaría sentada escribiendo en donde estoy.
- A los Trento (**Tere y Alfredo**), gracias por acompañarme en este camino, por todos los consejos.
- A quienes nunca se van a enterar: los que me sufrieron como docente: alumnos, gracias por ayudarme a crecer. A Charly García, a The Beatles, Roger Waters, Mafalda y Los Simpsons: más allá de la dura realidad que me muestran, gracias por convencerme de que es posible mejorar. A la Lisa y al Leopoldo, por divertirme.
- A todos los "locos" que se animan a "ver más allá..."

- A **Santino**, que me enseña a ser mamá, me tiene paciencia. Gracias hijito, por todas las horas prestadas, por todas las sonrisas y los llantos, por los amigos que trajiste desde que estás acá. Gracias por invitarme a ser feliz.
- A quien me enseñó amar sanamente, a querer, a ser apasionada, a no aflojar, a llorar, a discutir sin agredir (aunque todavía no rendí esa materia), a tolerar, a quien "...me hace querer ser una persona mejor...", quien me acompaña, me entiende, me quiere. A quien acompaño, entiendo y amo, **ALDITO**, GRACIAS.

ANTECEDENTES

El trabajo de investigación que se describe en esta Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas ha sido realizado en la Cátedra de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. Los resultados han sido dados a conocer parcialmente en las siguientes publicaciones científicas y presentaciones en congresos.

Publicación.

Rueda, E.C.; Dezar, C.A.; Gonzalez, D.H.; Chan, R.L. (2005). "*Hahb-10, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is involved in the response to dark/light conditions and promotes a reduction of the life cycle when expressed in Arabidopsis*". Plant and Cell Physiology 46: 1954 - 1963

Patente internacional:

Inventores: Chan R.L.; Rueda, E.C.; Gonzalez, D.H.; Dezar, C.A.
Objeto de la patente: "*Construcciones de ADN que contienen la secuencia codificante del gen Hahb-10 de Helianthus annuus, método para generar plantas con el ciclo de vida acortado y con alta tolerancia a herbicidas y plantas transgénicas con dicha secuencia*"

Presentada en INPI en marzo 2006.

<http://www.freepatentsonline.com/y2007/0234439.html>

Presentaciones en congresos.

- Rueda, E.C.; Chan, R.L.

"Hahb-1, a sunflower hd-zip transcription factor, negatively regulates developmental rate in response to osmotic stress."

XLI National Meeting of the Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology (SAIB).

Diciembre de 2005, Pinamar, Buenos Aires, Argentina.

- Rueda, E.C.; Dezar, C.A.; González, D.H.; Chan, R.L.

“Los genes Hahb-1 y Hahb-10 de girasol están involucrados en la respuesta adaptativa de las plantas a las condiciones ambientales”.

II Encuentro Bioquímico del Litoral.

Junio de 2005, Santa Fe, Argentina.

- Rueda, E.C.; Dezar C.A.; González, D.H.; Chan, R.L.

“Hahb-10, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is involved in the response to dark/light conditions.”

XL National Meeting of the Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology (SAIB).

Diciembre de 2004, Misiones, Argentina.

- Rueda, E.C.; Dezar, C.A.; Gonzalez, D.H.; Chan, R.L.

“Los genes Hahb-1 y Hahb-10 de girasol están involucrados en la respuesta adaptativa de las plantas a las condiciones ambientales”

XXV Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal (SAFV).

Septiembre de 2004, La Pampa, Argentina.

- Chan, R.L.; Gonzalez, D.H.; Dezar, C.A.; Rueda, E.C.; Fedrigo, G.

“Obtención de plantas tolerantes a estrés hídrico por Ingeniería Genética”

Stand Bioceres S.A., Feriagro

Marzo 2004, Buenos Aires, Argentina.

- Rueda, E.C.; Dezar, C.A.; Tron, A.E.; Ceaglio, N.; Chan, R.L.; González, D.H.

“La sobreexpresión del factor de transcripción Hahb-10 de girasol altera la respuesta a la luz en plantas de Arabidopsis thaliana”

II Asociación Argentina de Girasol (ASAGIR).

Agosto 2003, Buenos Aires, Argentina



I.- Abreviaturas

I.- ABREVIATURAS

ABA	ácido abscícico (del inglés, <i>abscisic acid</i>)
Ac	acetato
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ADNr	ADN que codifica ARN ribosomal
APS	persulfato de amonio
ARN	ácido ribonucleico
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ATHB	<i>Arabidopsis thaliana homeobox</i> – proteínas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que tienen un homeodominio
CaMV35S	promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor
cm	centímetro
CPHB	<i>Craterostigma plantagineum homeobox</i> – proteínas de <i>Craterostigma plantagineum</i> que tienen un homeodominio
col.	colaboradores
dATP	desoxiadenosina-trifosfato
dCTP	desoxicistidina-trifosfato
dGTP	desoxiguanosina-trifosfato
dNTP	desoxinucleótidos-trifosfato
dTTP	desoxitimidina-trifosfato
EDTA	ácido etilen-diamino-tetra-acético
EROs	especies reactivas del oxígeno
g	fuerza centrífuga por aceleración de gravedad
GA	fitohormona giberelina
GA₃	ácido giberélico
GUS	enzima β -glucuronidasa
<i>gus</i>	gen que codifica la enzima β -glucuronidasa de <i>E. coli</i> .
HD-Zip	<i>homeodomain-leucine zipper</i> - familia de factores de transcripción que tienen un homeodominio asociado a un cierre de leucinas.
HEPES	ácido N-[2-hidroxietil]-piperazina-N'-[2-etanosulfónico]

HIR	<i>high irradiance responses</i> - respuestas a alta irradiancia lumínica.
IA₃	ácido indol-acético
LB	medio de Luria-Bertania
LFR	<i>low fluence responses</i> - respuestas a baja fluencia de luz.
LHC	<i>light harvesting complex</i> - complejo antena.
MS	medio de cultivo formulado por Murashige y Skoog
MV	metil viológico
NADPH	nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato, forma reducida
OSHOX	<i>Oryza sativa homeobox</i> – proteínas de <i>Oryza sativa</i> que tienen un homeodominio
pb	pares de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> – reacción en cadena de la polimerasa
PHY	<i>phytochrome</i> - fitocromo
PS	photosystem - fotosistema
qE	disipación de la energía no-fotoquímica
R	luz roja
RL	luz roja-lejana
SDS	dodecil sulfato de sodio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
VLFR	<i>very low fluence responses</i> – respuestas a muy baja fluencia de luz
Gpb	giga pares de bases



II.- Resumen

II.- RESUMEN

Las proteínas HD-Zip conforman una familia de factores de transcripción exclusiva del reino vegetal. Existe abundante bibliografía que propone a estas proteínas como reguladoras del desarrollo en respuesta a factores ambientales.

En esta Tesis, se presentan los resultados obtenidos de la caracterización funcional de dos factores de transcripción de girasol de la familia HD-Zip: HAHB1 (*Helianthus annuus homeobox 1*) y HAHB10 (*Helianthus annuus homeobox 10*) integrantes de las subfamilias I y II respectivamente. Para esta caracterización funcional analizamos los patrones de expresión en girasol, y obtuvimos plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan estos genes bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV).

Los ensayos de *northern blot* mostraron que *HAHB1* se expresa en tallos de plantas jóvenes y en láminas de hojas de plantas adultas. En plántulas, además, este gen se induce cuando son cultivadas en presencia de etileno o giberelinas, en condiciones etioladas, o por estrés salino. En condiciones normales, las plantas de *Arabidopsis thaliana* que llevan la construcción 35S:*HAHB1* presentan raíces más cortas, menor biomasa y un desarrollo más lento que sus pares salvajes. Las plantas que expresan ectópicamente el gen, entran tardíamente a la senescencia y son más altas que las salvajes al final del ciclo de vida. Las plantas transgénicas cultivadas en placas de Petri con NaCl, están más afectadas que las salvajes.

Por su parte, el gen *HAHB10* presenta niveles elevados de mensajero en hojas de plantas adultas. En plántulas, presenta niveles altos cuando éstas son cultivadas en condiciones etioladas. Las plantas que llevan la construcción 35S:*HAHB10* tienen las raíces más cortas, cotiledones más oscuros y menos expandidos, hojas planas, más pequeñas y de color verde más oscuro. Presentan un ciclo de vida más corto que las plantas no transformadas debido, al menos en parte, a una reducción del tiempo de

floración. Las plantas que expresan ectópicamente el gen *HAHB10* están mejor adaptadas a condiciones de superpoblación, ya que su desarrollo no se ve afectado como en las salvajes al aumentar el número de plantas cultivadas por maceta. Además, las plantas transgénicas presentan menor sensibilidad al tratamiento con giberelinas y la diferencia observada en el ciclo de vida con respecto a las salvajes desaparece. El gen *PSBS* presenta menores niveles de expresión en las plantas *35S:HAHB10* que en sus controles.

La expresión ectópica del gen *HAHB10* les confiere a las plantas tolerancia a determinados tratamientos con herbicida el metil viológeno.

Los resultados obtenidos nos permiten proponer al gen *HAHB1* como regulador negativo del desarrollo y de la respuesta al estrés salino y sugieren que el gen *HAHB10* participa en la/s cascada/s de señalización que controla/n las respuestas de las plantas a la cantidad y calidad de la luz, así como en las vías de señalización por giberelinas.



III.- Abstract

III. – ABSTRACT

Homeodomain-leucine zipper proteins constitute a family of transcription factors unique to plants. These proteins are regulated by external factors and they were proposed as good candidates to trigger developmental responses to adverse environmental conditions.

Here, we report expression and functional studies performed in order to characterize two members of the sunflower HD-ZIP family: HAHB1 (*Helianthus annuus homeobox 1*) and HAHB10 (*Helianthus annuus homeobox 10*) belonging to subfamilies I and II respectively.

HAHB1 is mainly expressed in stems of young plants and in leaves of adult plants and it is regulated by several external factors. The addition of Ethrel[®] (an ethylene releasing agent), gibberellic acid or NaCl, enhances this gene expression. The highest transcript levels were observed when seedlings were grown in etiolated conditions.

In order to establish a functional role for this gene, transgenic *Arabidopsis thaliana* plants ectopically expressing *HAHB1* under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter were obtained. These plants show a particular phenotype when grown in normal conditions. When grown in Petri dishes, root length is shorter than in wild-type plants. In soil, flowering occurs later in transgenic plants, completing the life cycle approximately 10 days after their controls and are taller than them. Senescence entry is delayed in the transgenic genotype compared with the non transformed. Transgenic leaves remain green and probably photosynthetically active either in mature plants until harvesting. Transgenic seeds and seedlings are more sensitive to salt stress: when they are grown in the presence of NaCl in Petri dishes their germination rate and the percentage of survivors is reduced compared with the wild-type.

Northern blot assays show that *HAHB10* is expressed primarily in mature leaves. Considerably higher expression levels were detected in etiolated seedlings compared with light-grown seedlings. Transgenic *Arabidopsis thaliana* plants ectopically expressing *HAHB10* under the 35S CaMV promoter show special phenotypic characteristics like darker cotyledons and planar leaves. A reduction in the life cycle of about 25% allowing earlier seed harvesting was also observed, and this phenomenon is clearly related to a shortened flowering time. When the number of plants per pot increased, the difference in developmental rate between transgenic and non-transformed individuals became larger. After gibberellin treatment, the relative difference in life cycle duration was considerably reduced. Several light-regulated genes have been tested as putative target genes of *HAHB10*. One of them, *PSBS*, shows a different response to illumination conditions in transgenic plants compared with the response in wild-type ones while the rest behave similarly in both genotypes. Additionally, the ectopic expression of *HAHB10* confers a significant tolerance to a treatment with the herbicide methyl viologen.

We propose that *HAHB1* is a negative regulator of plant development and in response to salt stress and *HAHB10* functions in the signalling cascade(s) that control(s) plant responses to light quality and quantity, and may also be involved in gibberellin transduction pathways.



IV.- Introduccion General

IV.1.- EL DESARROLLO VEGETAL.

El desarrollo de un organismo pluricelular es el resultado de la actividad integrada de dos procesos fundamentales: el crecimiento y la diferenciación. El crecimiento es el aumento irreversible de tamaño, que requiere en general la producción de células nuevas y el posterior aumento de tamaño de las mismas. El proceso de diferenciación celular conlleva la formación de una estructura corporal organizada, que implica que grupos de células en diferentes regiones del cuerpo se tornen estructural y funcionalmente distinguibles. Cada tipo celular queda definido por la expresión diferencial (en términos cualitativos y cuantitativos) de la información genética.

Si bien tanto los animales y las plantas (angiospermas) producen individuos diploides multicelulares, los patrones de desarrollo y las estrategias reproductivas de los miembros de estos dos reinos son bien distintas. Una de las diferencias fundamentales es la movilidad: tanto los animales como las células que los forman pueden moverse, en cambio las plantas y la mayoría de las células vegetales, no. La capacidad de movilizarse define cómo el organismo responde al ambiente, se defiende y se reproduce. Los animales responden a los cambios en el ambiente con su conducta y fisiológicamente, pero las plantas están limitadas a las respuestas fisiológicas, dado que no pueden moverse para evitar condiciones adversas.

Las plantas y los animales se desarrollan a partir de distintas estrategias. En los animales se combinan una serie de vías complejas que generan progresivamente líneas celulares cada vez más diferenciadas. De esta forma restringen el potencial de desarrollo de las células individuales: una vez que el organismo está constituido, las células y órganos están diferenciados. En cambio, en las plantas, las células permanecen totipotentes o pluripotentes en varios tejidos. Los órganos nuevos derivan de los meristemas, que son regiones de división celular activa que permiten que la

planta produzca raíces, brotes y hojas (Beweley, 2000). Los meristemas están formados por células indiferenciadas relativamente pequeñas (células meristemáticas). Es a partir de éstos que se originan todos los tejidos que van a formar los órganos adultos de la planta. Existen dos tipos de meristemas fundamentales: el meristema basal o radical, que originará el sistema radicular de la planta, y el meristema apical del vástago a partir del cual se van a generar los primordios y las hojas. A partir de estos meristemas, se generan también los meristemas secundarios como el cambium y el felógeno, que permiten el crecimiento en grosor de la planta. Las células del meristema apical se agrandan lentamente mientras que en las regiones subapicales lo hacen rápidamente. El resultado es un incremento del volumen celular que varía dependiendo de las especies y de las condiciones ambientales. El crecimiento de los tejidos no es uniforme ni azaroso. Los tejidos derivados de los meristemas se expanden a través de rutas predecibles y específicas (Taiz y Zeiger, 2002¹).

Las plantas están expuestas a numerosos factores que alteran su desarrollo: condiciones variables de iluminación, temperaturas extremas, escasez o exceso de agua, altas concentraciones de sales, desbalance de los nutrientes inorgánicos, infección causada por agentes patógenos y presencia de compuestos tóxicos naturales o generados por el hombre. La adaptación de las plantas a las condiciones ambientales a las cuales se ven enfrentadas ocurre a través de distintas vías de transducción de señales que culminarán en cambios fisiológicos y metabólicos.

IV.2.- FOTOMORFOGÉNESIS.

La **fotomorfogénesis** se define como el crecimiento y desarrollo dependientes directamente de la luz. Los procesos de fotomorfogénesis involucran la acción combinada de varios fotorreceptores, entre ellos, los fitocromos, los criptocromos, las fototropinas y los receptores de luz UV-B. Las plantas utilizan esta variedad de fotorreceptores para medir y generar respuestas diferentes.

De acuerdo a la intensidad y duración de la radiación requerida para generar una respuesta en un fotorreceptor (cuantificada como fluencia¹), se definen las respuestas de “muy baja fluencia” (VLFR, entre 0,0001 y 0,05 $\mu\text{mol.m}^{-2}$), de “baja fluencia” (LFR, entre 1 y 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}$) o de “alta irradiancia” (HIR, 10 $\mu\text{mol.m}^{-2}$) (Figura 1 - A). Las respuestas VLFR comprenden, por ejemplo, la inducción de la expresión de genes nucleares que codifican proteínas integrantes del complejo antena del fotosistema II (*CAB*).

Las respuestas de tipo LFR pueden observarse, por ejemplo, en la germinación de la semilla de lechuga, un proceso que ocurre únicamente cuando la intensidad lumínica alcanza 1 mmol.m^{-2} . Las respuestas de HIR son generadas por irradiación continua o prolongada y comprenden la inhibición del crecimiento del tallo y/o la inducción de la floración. Los fitocromos y los criptocromos perciben las diferentes fluencias y generan los tres grupos de respuestas descritas aquí (Chory, 1997; Casal y col., 1998).

Los fitocromos son proteínas solubles de aproximadamente 125 KDa. Su estructura es homodimérica en la que cada subunidad está unida covalentemente a un cromóforo constituido por un tetrapirrol lineal abierto (Figura 1-B). Una característica particular de los fitocromos es que tienen la capacidad de absorber luz roja y roja lejana y generar respuestas fisiológicas diferentes al interconvertirse entre

¹ Número de fotones que impactan por unidad de superficie.

dos isómeros estables: una forma que absorbe luz roja (**Pr** = λ_{\max} 660 nm) y otra que absorbe luz roja-lejana (**Pfr** = λ_{\max} 730 nm) (Figura 1 - C).

Tradicionalmente se le llamaba Pfr a la forma activa del fitocromo (Chory, 1997). Actualmente se le sigue llamando así, aunque de acuerdo a los avances fisiológicos, bioquímicos y genéticos en este tema se ha demostrado que la forma Pr también participa en la germinación indicando que la forma Pr es activa (Reed y col., 1994).

Todas las plantas vasculares examinadas, al igual que muchas algas y briófitas presentan varios genes que codifican fitocromos (Quail, 1994). Las angiospermas presentan tres genes principales que codifican los fitocromos A, B y C (*PHYA*, *PHYB* y *PHYC*) y en las dicotiledóneas se presentan dos formas más (*PHYD* y *PHYE*). Se cree que estos últimos son productos de eventos de duplicación génica. *Arabidopsis thaliana* presenta cinco genes que codifican respectivamente los fitocromos *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* y *PHYE*. Los procesos del desarrollo regulados por los fitocromos A y B se ilustran en la figura 2. El estudio de triples y cuádruples mutantes en los genes que codifican los fitocromos mostró que los fitocromos B, D y E son funcionalmente redundantes (Franklin y col., 2003).

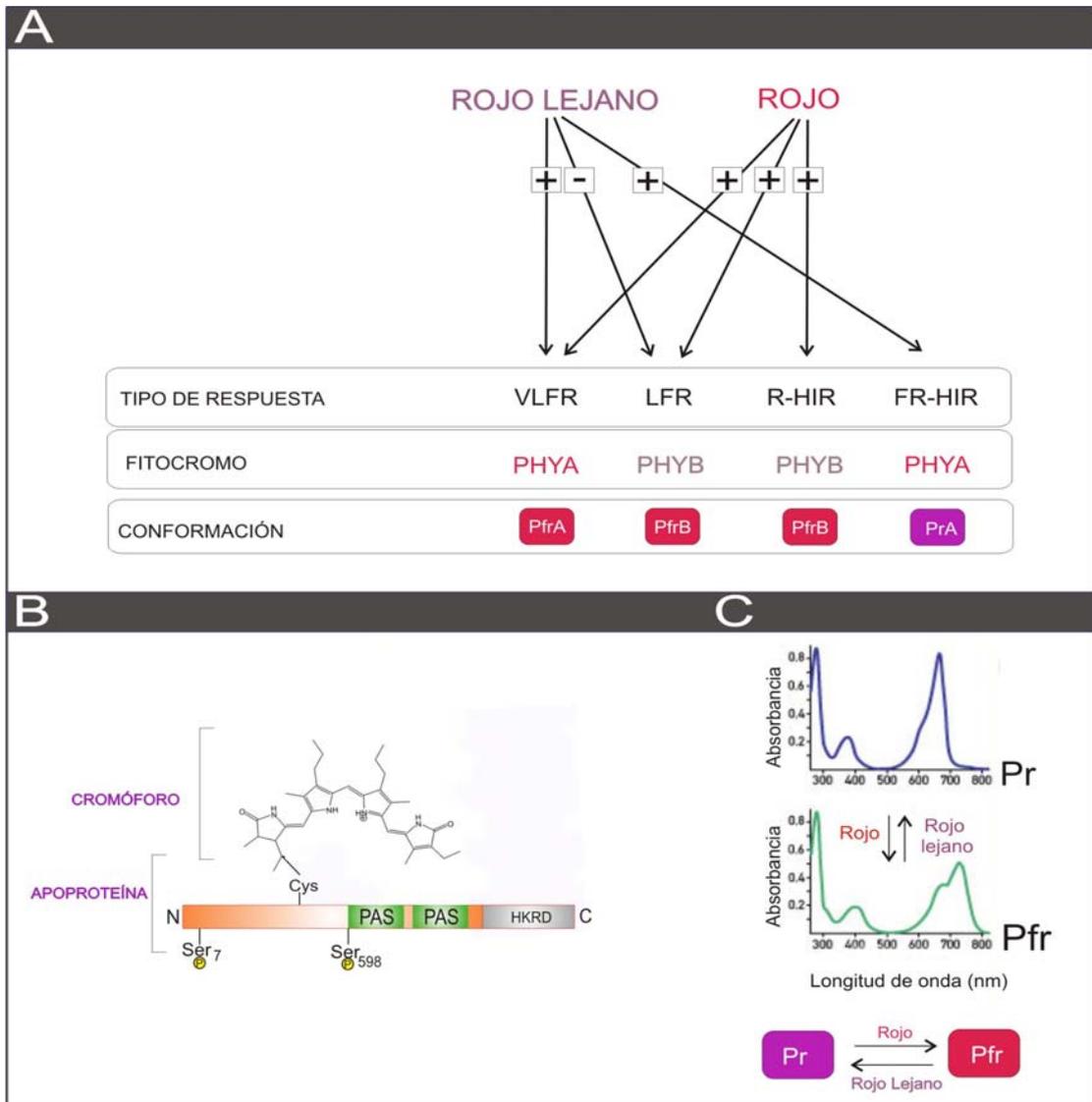


Figura 1: Características estructurales y funcionales de los fitocromos.

- A) Respuestas mediadas por fitocromos, según las intensidades de la iluminación. Se muestra la influencia de la luz roja y roja lejana, en la generación de las respuestas, los fitocromos involucrados y la conformación que tienen para las mismas (adaptado de Shäfer y Bowler, 2002).
- B) Esquema de la estructura del fitocromo. Los fitocromos absorben la luz con el del cromóforo (un tetrapirrol lineal abierto) que está unido covalentemente en la cisteína 320 (PHYA) o 322 (PHYB) del dominio amino-terminal de la apoproteína. En las posiciones 7 y 538 se muestran las serinas que intervienen en los cambios conformacionales y en la señalización por fosforilación. El dominio carboxilo-terminal de la apoproteína contiene dos repeticiones PAS, que inician la cascada de señalización a través de la interacción con el factor PIF3 y presenta un dominio histidina-kinasa (HKRD) involucrado en la fosforilación de la proteína sustrato-kinasa del fitocromo 1 (SK1). SK1 regula negativamente la señalización del fitocromo (adaptado de Yanovsky y Kay, 2002).
- C) Espectro de absorción de los fitocromos y cambio de conformación que sufren de acuerdo a la calidad de la luz que reciben (adaptado de Shäfer y Bowler, 2002).

El mecanismo mediante el cual los fitocromos convierten la señal percibida de la luz en respuestas que involucran procesos celulares es complejo. Los datos obtenidos hasta el momento indican que la formación de Pfr (inducida por la luz roja) promueve la translocación del fitocromo del citoplasma al núcleo, donde interactúa con los factores de transcripción PIFs (*Phy-Interacting Factors*) - pertenecientes a la superfamilia bHLH (*basic helix-loop-helix*) los cuales regulan la transcripción al unirse a secuencias de tipo *G-box* (CACGTGG) presentes en los promotores de algunos genes regulados por luz. (Shen y col., 2007). Se ha demostrado que la unión del fitocromo a los factores PIF1, PIF3 o PIF5 permite la fosforilación rápida de los mismos y su posterior degradación a través del sistema Ubiquitina-proteosoma. Estas observaciones sugirieron que la expresión génica se controlaría según la cantidad de los factores PIFs (Al-Sady y col., 2008).

Estudios recientes mostraron que el factor PIF7 se comporta de manera similar, aunque no presenta fosforilación ni degradación cuando se une al fitocromo B. Estos datos, sumados al estudio de plantas mutantes, indicaron que el factor PIF7 regularía la cantidad del fitocromo B (Leivar y col., 2008).

Lo expuesto anteriormente revela una complejidad de las respuestas generadas por los diferentes fitocromos mostrando que los mecanismos moleculares por los cuales los fitocromos alteran la expresión génica para generar cambios en el desarrollo, no están del todo claros aún.

En cuanto a la floración, las evidencias moleculares demuestran que los fotorreceptores pueden, individualmente, promover o inhibir el inicio del proceso. Los mismos podrían afectar a los genes integradores de la floración por la vía de la calidad de la luz, aunque también participan en la promoción de la floración por la vía del fotoperíodo y del ritmo circadiano.

En resumen, los fitocromos intervienen en el ciclo biológico de la planta, desde la germinación a la floración y tuberización, pasando por la de-etiolación de las

plántulas y el alargamiento de tallo y entrenudos. Estas respuestas se generan según la cantidad y duración de la irradiación que reciban las plantas y los mecanismos moleculares de acción difieren aunque involucren los mismos factores de transcripción.

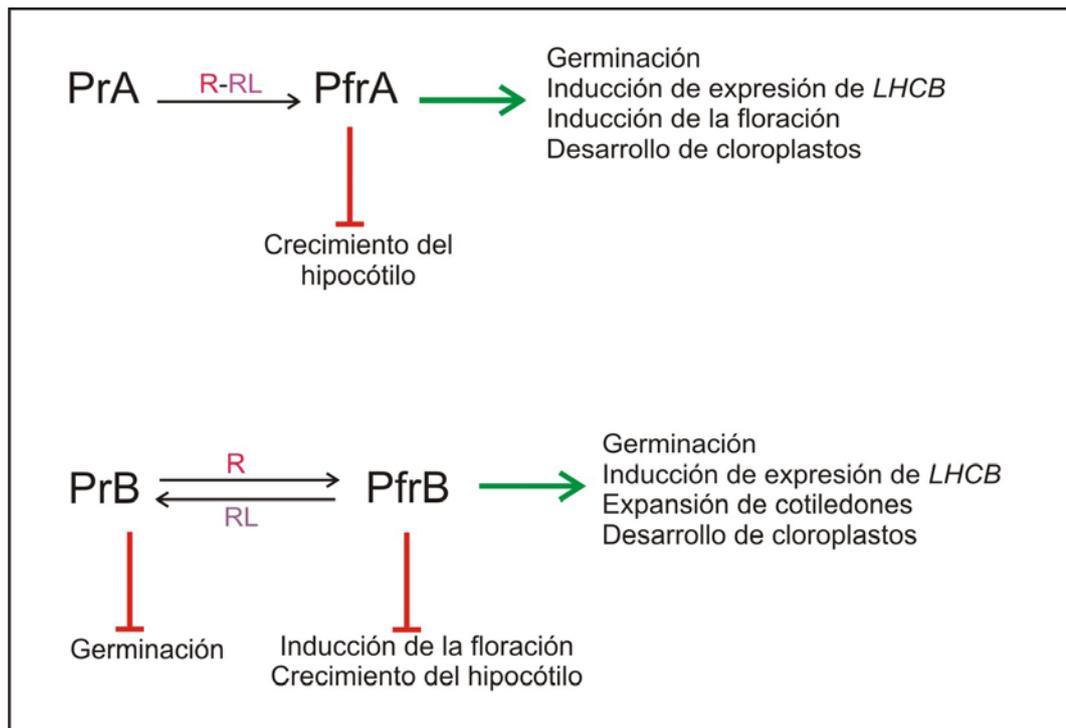


Figura 2: Procesos del desarrollo de *Arabidopsis thaliana* regulados por los fitocromos A y B (adaptado de Chory, 1997).

Se muestran las distintas conformaciones de los fitocromos (Pr o Pfr) y los procesos en los cuales están involucrados. En verde se indica inducción y en rojo inhibición. R=Rojo; RL=Rojo Lejano.

Las fitohormonas también participan en la regulación de algunos procesos de fotomorfogénesis. Se observó que cuando se transfieren plántulas cultivadas en luz a oscuridad o viceversa, se acumulan elevadas cantidades de RGA –*repressor of the ga1-3 mutant* - (una proteína DELLA) y de transcriptos que codifican enzimas que participan en el metabolismo de las giberelinas en el hipocótilo.

La acumulación de RGA depende además, de la energía que reciban las plantas. Estos hallazgos permitieron concluir que la inhibición del crecimiento del hipocótilo en *Arabidopsis thaliana* por la luz, estaría regulada por las giberelinas cuya respuesta está mediada por las proteínas de la familia DELLA (Achard y col., 2007).

Recientemente se demostró que, en ausencia de giberelinas, las proteínas DELLA se acumulan en el núcleo e interactúan con los factores de transcripción PIF3 y PIF4, evitando que regulen la expresión de los genes que son blanco de los mismos.

Cuando las giberelinas están presentes, se unen al receptor GID1, el cual interacciona con el represor de las proteínas DELLA. Esta interacción, induce la degradación de las DELLA a través de la vía ubiquitina-proteosoma, y permite la acumulación de PIF3 y PIF4 en el núcleo, lo cual produce al final un cambio en la expresión génica (Feng y col., 2008; De Lucas y col., 2008).

IV.3.- EL DESARROLLO FLORAL.

El ciclo de una planta del grupo de las angiospermas, puede dividirse en tres fases: embriogénesis, crecimiento vegetativo, y crecimiento reproductivo (Figura 3).

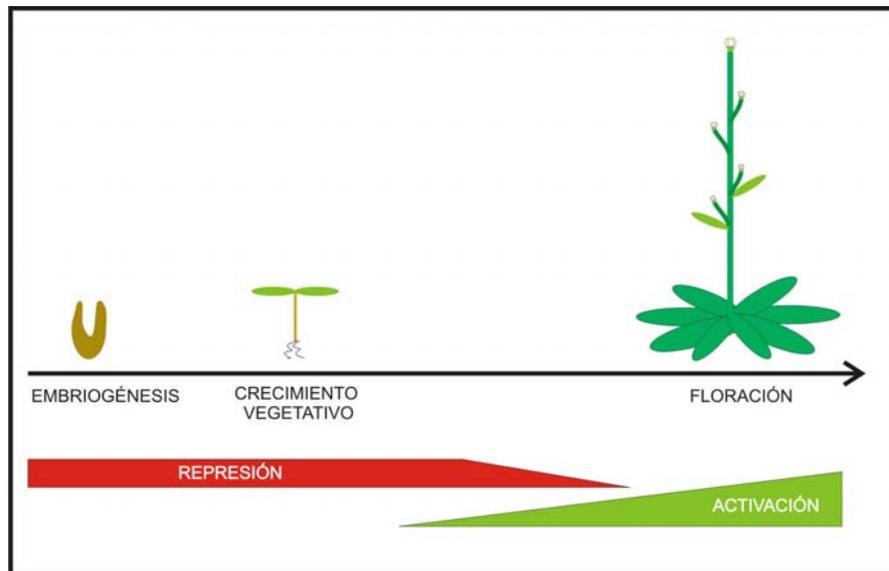


Figura 3: Fases del ciclo de vida de una angiosperma (adaptado de Boss y col., 2004).

El ciclo de vida se divide en tres fases: embriogénesis, crecimiento vegetativo y floración. En la parte inferior se indica, en rojo y en verde, la inhibición y activación de los genes integradores de las vías de floración respectivamente.

Las plantas se desarrollan formando nuevos órganos vegetativos a partir de los meristemas apicales y radiculares. Una vez maduras, siguen formando nuevos órganos vegetativos a partir de los meristemas apicales y radiculares. En un momento determinado y en respuesta a señales internas y ambientales, el meristema apical de la planta alterna de un patrón vegetativo de diferenciación a un patrón reproductivo. Este cambio resulta en la producción de flores y gametas (Beweley, 2000).

La inducción de la floración representa unos de los cambios del desarrollo más dramáticos en las angiospermas. Es un proceso irreversible, y el individuo debe asegurarse que el momento es el óptimo para la polinización y la producción de las semillas (clave en el éxito reproductivo de la especie).

Se han realizado estudios fisiológicos y genéticos que demostraron que el momento de la floración está determinado por múltiples señales endógenas y ambientales. El mecanismo a partir del cual la planta interpreta esas señales y las traduce en la activación y/o represión de genes se ha ido dilucidando en varias especies, y más detalladamente en *Arabidopsis thaliana*, utilizada como modelo de plantas dicotiledóneas (Boss y col., 2004).

El estudio de un gran número de mutantes en el momento de floración de *Arabidopsis thaliana* permitió generar un modelo que describe una red integrada de vías que controlan cuantitativamente el momento de la transición a la floración. Como puede verse en la figura 4, se han establecido grupos de estímulos que influyen -promoviendo o reprimiendo- sobre el desarrollo floral (Boss y col., 2004). Los estímulos que promueven la floración induciendo la expresión de determinados genes comprenden la luz (cantidad y calidad), la biosíntesis y señalización de hormonas, y la temperatura ambiental. Por otro lado, hay estímulos que afectan a la floración regulando la expresión de genes que la reprimen, como en los casos de la vernalización y de la vía autónoma. Todos los estímulos desencadenarán vías de señalización que activarán secuencialmente la expresión de distintos grupos de genes ocasionando finalmente la diferenciación del meristema apical en meristema floral y así la transición al estado reproductivo (Figura 4, Jack, 2004).

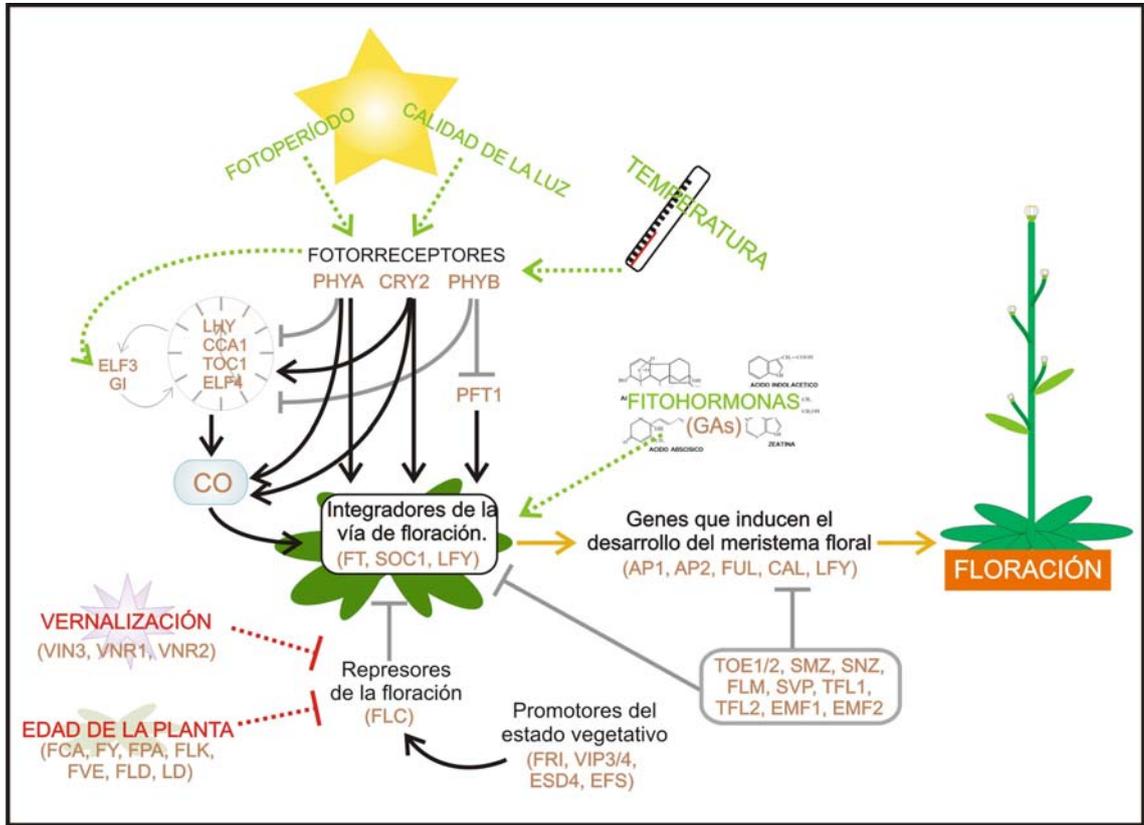


Figura 4: Regulación de la floración en *Arabidopsis thaliana*.

El fotoperíodo, la calidad de la luz, la temperatura (a través de los fotorreceptores *PHYA*, *PHYB*, *CRY2*) y las fitohormonas promueven la floración activando los genes integradores de la vía de floración (*FT*, *SOC1*, *LFY*). Los fotorreceptores junto con los entrenadores del ritmo circadiano (*ELF3* y *GI*) sincronizan el oscilador (*CCA1*, *LHY*, *TOC1* y *ELF4*). Los cambios en el fotoperíodo se detectan por este sistema circadiano entrenado y se traducen en información a través de la expresión cíclica de *CO*. Las giberelinas promueven la floración regulando la expresión de los integradores de la vía de floración. Los productos de los genes relacionados con la vía autónoma (*FCA*, *FY*, *FPA*, *FLK*, *FVE*, *FLD*, *LD*), reprimen la expresión de *FLC*, al igual que las proteínas involucradas en la vía de la vernalización (*VIN3*, *VNR1*, *VNR2*). Los promotores del estado vegetativo (*FRI*, *VIP3/4*, *ESD4* y *EFS*) reprimen la floración al regular positivamente la expresión de *FLC*. Los genes *TOE1/2*, *SMZ*, *SNZ*, *FLM*, *SVP*, *TFL1/2*, *EMF1/2* reprimen la floración. Una vez activados los integradores de las vías de floración, se induce la expresión de los genes que promueven el desarrollo del meristema floral (*AP1*, *AP2*, *FUL*, *CAL*, *LFY*) iniciando el desarrollo floral.

Aunque son varios los estímulos que afectan este proceso, todas las vías de señalización convergen en la activación de los genes integradores de la floración.

IV.3.1.- INFLUENCIA DE LA LUZ EN EL CONTROL DE LA FLORACIÓN.

Las condiciones de iluminación juegan un papel crucial en el control de la floración. Dependiendo de la calidad e intensidad lumínica, se desencadenan diferentes respuestas durante todo el desarrollo vegetal.

A principios del siglo XX se observó que el fotoperíodo (alternancia de horas de luz y de oscuridad del día) regulaba la floración. Se observó que algunas especies no florecían si la longitud del día no era más corta que un valor crítico de luz, mientras que otras lo hacían solamente si la longitud del día era mayor que un determinado valor crítico de luz. A raíz de estos hallazgos, las especies se agruparon de acuerdo a la respuesta al fotoperíodo como plantas “de día largo”, “de día corto”. Las especies de “día largo” florecen en verano, mientras que las de “días cortos” florecen en otoño o principios de primavera. Existe un tercer grupo de especies que florecen sin importar la longitud del día, es decir, que son independientes del fotoperíodo. *Arabidopsis thaliana* es una especie de día largo facultativa, lo que significa que su floración es más rápida en fotoperíodos largos que en cortos.

Se sabe que *Arabidopsis thaliana* y otras especies, perciben los cambios en el fotoperíodo y generan respuestas al mismo a través de un oscilador interno (ritmo circadiano). Los fitocromos y los criptocromos (Quail, 2002; Lin, 2000) son los fotorreceptores principales involucrados en detectar cambios en el fotoperíodo.

Éstos transmiten la señal percibida y conjuntamente con los factores entrenadores del reloj (**EFL3** – EARLY FLOWERING 3 - Y **GI** – GIGANTEA -) sincronizan el oscilador circadiano (**CCA1** –CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1-, **LHY** –LATE ELONGATED HYPOCOTYL-, **TOC1** –TIMING OF CAB 1- Y **ELF4** – EARLY FLOWERING 4) con el ambiente. Los cambios en la duración del día son detectados por este sistema circadiano y se traducen en información del tiempo de floración a través de la expresión cíclica de **CO** –CONSTANCE-. La activación de **CO**

aumenta la expresión de ***FT –FLOWERING LOCUS T***, desencadenando la floración (Yanovsky y Kay, 2002). Se ha demostrado recientemente, que la cantidad de la proteína CO en los tejidos vasculares de las plantas adultas está regulada por la proteína ubiquitina-ligasa ***COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1)***, Deng y col., 1991), la cual forma parte del mecanismo a partir del cual las plantas de *Arabidopsis thaliana* discriminan entre fotoperíodos largos y cortos, en el control de la floración (Jang y col., 2008). A partir de la descripción de la proteína CO, se identificó una familia de proteínas, denominada CONSTANS–LIKE (COL) cuyos miembros presentan al menos un motivo “B-box” y un dominio CCT. Las proteínas HD1 (*HEADING DATE 1*) y OsCO3 (*Oryza sativa CONSTANS 3*) pertenecen a la familia COL de *Oriza sativa*, regulan la floración en respuesta al fotoperíodo (Kim y col., 2008). Además, se han aislado genes homólogos de CO de otras especies como del musgo *Physcomitrella patens* (Zobell y col., 2005), de *Solanum tuberosum* (Guo y col., 2007) y de *Zea mays* (Miller y col., 2008).

Los genes que participan en la respuesta al fotoperíodo en *Arabidopsis thaliana*, fueron identificados a partir del análisis de líneas mutantes. Las plantas mutantes *co* manifiestan un retraso en la floración, particularmente cuando crecen en fotoperíodos de día largo (Koorneef y col., 1991), mientras que las plantas que sobreexpresan CO (*35S:CO*) aceleran dicho proceso y manifiestan una pérdida de la sensibilidad al fotoperíodo (Onouchi y col., 2000). Las plantas mutantes *lhy* y *gi* muestran niveles bajos de transcripto de CO y florecen más tarde cuando se cultivan en día largo (Lin, 2000). En el mismo sentido, las mutantes *efl3*, presentan los niveles de mensajero de CO elevados con respecto al control y florecen antes. Existe además una familia de factores de transcripción denominada HAP (*HEME ACTIVATOR PROTEIN*), cuyos miembros están involucrados en la regulación de la floración, aislados de diversas especies. En *Arabidopsis thaliana*, la sobreexpresión independiente de *AtHAP3a*, *AtHap3b* y *AtHAP5*, tres miembros de la familia HAP,

retrasa la floración (Wenkel y col., 2006; Cai y col., 2007). Se ha propuesto que estos factores de transcripción, al menos en *Arabidopsis thaliana*, interaccionan con la proteína CO, participando en la regulación de la floración por el fotoperíodo (Ben-Naim y col., 2006).

Hay otros genes de *Arabidopsis thaliana* que están controlados por el ritmo circadiano. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica la enzima CHALCONA SINTETASA (*CHS*), clave en la síntesis de flavonoides, y del gen que codifica la PROTEÍNA A/B DE UNIÓN A LA CLOROFILA (*CAB*) responden a este tipo de regulación, ya que en plantas mutantes en genes del oscilador circadiano, se observó que los niveles rítmicos de los genes *CAB* y *CHS* se alteran (Thain y col., 2002).

Además de detectar los cambios en el fotoperíodo, los fitocromos y criptocromos perciben y responden a los cambios en la calidad de la luz. La función de estos fotorreceptores en la floración se ha determinado a partir de estudios con mutantes y con plantas que sobreexpresan los genes que los codifican en distintas condiciones de iluminación (día largo, día corto, luz roja, luz roja-lejana, luz azul, luz continua, interrupción de la noche). La calidad de la luz afecta a la floración en una vía independiente del fotoperíodo. Cerdán y Chory (2003) identificaron una proteína nuclear, la PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME1 (PFT1) que participa en la traducción de la señal percibida por el fitocromo B y regula la expresión del gen *FT*. Este hallazgo es la evidencia de que hay una ruta que depende de la calidad de la luz que regula el tiempo de floración en *Arabidopsis thaliana*. Además de promover o inhibir la expresión de otros genes del desarrollo floral, los fitocromos interactúan entre sí para ejercer el control del inicio de la floración (Figura 5).

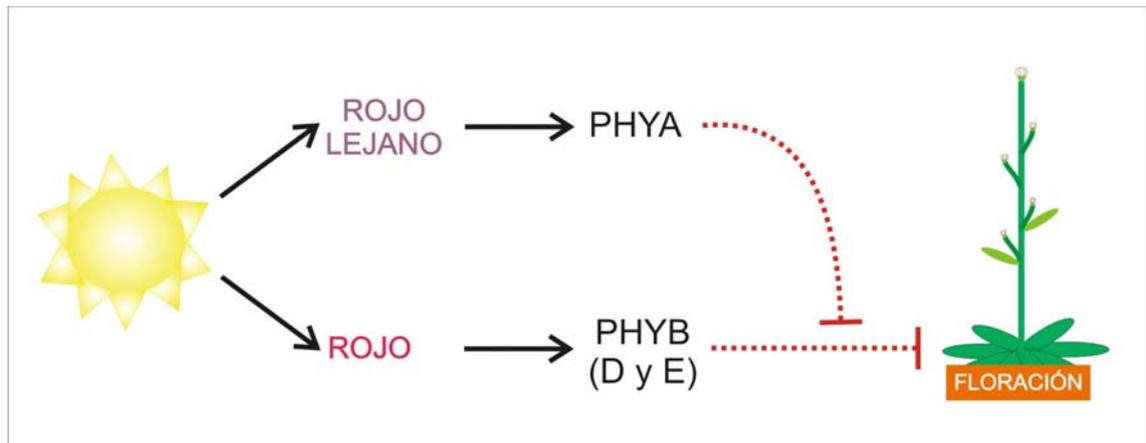


Figura 5: Interacción entre fitocromos para regular la floración en *Arabidopsis thaliana* (adaptado de Lin, 2000). Las líneas punteadas representan las vías de transducción de señales de los fotorreceptores.

IV.3.2.- LAS GIBERELINAS PROMUEVEN LA FLORACIÓN.

Todas las fitohormonas conocidas (giberelinas, auxinas, citoquininas y brasinoesteroides) se relacionan con el control de la floración. Sin embargo, los estudios genéticos más detallados en *Arabidopsis thaliana* se han focalizado en las giberelinas (Simpson y Dean, 2002). Las giberelinas (GAs) constituyen un grupo de hormonas que regula positivamente el crecimiento y la floración. Inicialmente se demostró que la aplicación de GA externa aceleraba la floración y recientemente esta función de las GAs se confirmó utilizando mutantes de genes que participan en la biosíntesis o en las vías de señalización de las mismas. Estas mutaciones afectan otros aspectos del desarrollo vegetal como la elongación del tallo y la germinación.

Se han caracterizado varias líneas de mutantes que afectan la biosíntesis de GAs en *Arabidopsis thaliana*. A partir de éstas se han logrado identificar genes involucrados en la regulación del tiempo de floración, entre ellos, *GA1*, *GA4* y *GA5* (Mouradov y col., 2002). El gen *GA1* codifica una enzima que cataliza el primer paso en la biosíntesis de GA (Sun y Kamiya, 1994). La mutante *ga5* es deficiente en la actividad de la enzima GA 20-oxidasa, cuyos niveles de expresión están regulados por cambios ambientales o fisiológicos (Xu y col., 1995). La mutación *spindly*, que causa una señal de GAs constitutiva, florece antes a diferencia de las mutantes que bloquean en algún punto la vía de señalización de las giberelinas como *gai*, o la biosíntesis de giberelinas (*ga1-3*), que presentan un retraso en la floración con respecto a las plantas salvajes.

Se ha realizado estudios genéticos y bioquímicos para identificar los genes que participan en la/s vía/s de señalización mediada/s por giberelinas. Los mismos indicaron que las mismas, actúan regulando la acumulación de la familia de proteínas DELLA, como *GIBERELLIC ACID INSENSITIVE* (GAI), *REPRESSOR of GA1-3* (RGA) y RGA-LIKE1/2 (Fleck y Harberd, 2002). Los resultados obtenidos de la caracterización de las líneas mutantes permitieron concluir que las GAs, además de interactuar con las proteínas DELLA, promueven la floración induciendo la expresión de los genes integradores *SOC1* y *LFY* (Blazquez y col., 1998; Moon y col., 2003).

IV.3.3.- LA VÍA AUTÓNOMA Y LA VERNALIZACIÓN.

La vía autónoma fue descrita a partir de estudios con un grupo de líneas mutantes que florecían tardíamente, independientemente del fotoperíodo y que respondían a la vernalización (Mouradov y col., 2002). Estas líneas, que incluyen *fca*, *fy*, *fpa*, *luminidependens* y *fve*, presentan los niveles de ARNm de *FLC* –*FLOWERING LOCUS C*– más elevados que las plantas salvajes. Los genes *FCA* –*FLOWERING LOCUS A*–, *FPA* y *FLK* –*FLOWERING LOCUS K*– codifican proteínas que tienen un motivo de unión a ARN y regularían la acumulación de ARNm del represor *FLC*. La proteína *FCA* interactúa físicamente con *FY* (otra proteína de la vía autónoma) a través de un motivo de interacción proteína-proteína de tipo WW. Las proteínas *FVE* y *FLD* presentan una estructura que se asemeja a la de proteínas asociadas con la remodelación de la cromatina. De hecho, ambas mutantes presentan cambios en la acetilación de las histonas, asociados con el locus *FLC* (Simpson y col., 2003). La vía autónoma parecería retrasar la floración incrementando la expresión de *FLC*.

La aceleración de la floración por exposición a períodos de bajas temperaturas se conoce como vernalización. Algunas especies, incluyendo muchas de interés económico, necesitan de la vernalización para florecer. La explicación más probable es que con la vernalización, la planta se asegura que el proceso de floración ocurra en primavera y con las condiciones de temperatura adecuadas. En *Arabidopsis thaliana* se ha identificado el gen *FRIGIDA* (*FRI*; Clarke y Dean, 1994), que confiere la necesidad de vernalización. La proteína *FRI* promueve la acumulación de ARNm de *FLC* y de esta forma reprime la floración en períodos de bajas temperaturas. La respuesta a la vernalización es cuantitativa. Al principio del ciclo de vida, los niveles de ARNm de *FLC* están elevados y bajan cuando la temperatura aumenta. En la meiosis los niveles de ARNm de *FLC* vuelven a estar elevados (Reeves y Coupland, 2001).

Al igual que el resto de las vías descritas anteriormente, el mecanismo de la vernalización se ha ido dilucidando a partir del estudio de líneas mutantes deficientes en el proceso. Una de las más caracterizadas es *vnr2* y los estudios realizados sugieren que VNR2 – VERNALIZATION 2- mantiene la represión transcripcional de *FLC* a través de reorganizaciones de la cromatina y no a partir de una interacción directa con FLC (Gendall y col., 2001).

Las vías de vernalización y autónoma habilitan la transición de la etapa vegetativa a la reproductiva a partir de un mismo integrador: FLC. La interacción de ambas vías y algunos elementos moleculares se resumen en la figura 4.

IV.4.- EL ESTRÉS EN EL DESARROLLO VEGETAL.

Las plantas han adquirido evolutivamente la capacidad de modificar eventos específicos del desarrollo en respuesta a los cambios en las condiciones ambientales. Esta plasticidad representa una ventaja significativa, ya que el patrón de expresión génica varía de acuerdo a las condiciones del medio. Las plantas perciben e identifican constantemente las señales del ambiente y consecuentemente traducen esas señales en procesos celulares que les permiten adaptarse o tolerar las nuevas condiciones.

La planta vivirá o morirá dependiendo de cuán severo sea el estrés, del genotipo de la planta y de su historia individual. La interacción genotipo-ambiente es esencial para dilucidar la naturaleza de la variación fenotípica que conduce a una respuesta exitosa de las plantas ante cambios ambientales (Pastori y Foyer, 2002). Si bien son varios los factores ambientales que generan estrés en las plantas (Tabla 1), muchas veces, los mecanismos moleculares que desencadenan los mismos son similares o comparten algunos elementos. Las plantas se adaptan a la condición de

estrés activando a nivel celular cascadas de eventos de señalización que confluyen en la expresión de determinados genes.

LUZ	Exceso o defecto.
AGUA	Sequía o inundación.
RADIACIÓN	Ultravioleta (UV), rayos X, ionizante.
TEMPERATURA	Elevadas o bajas.
BIOLÓGICOS	Floración, maduración de los frutos, patógenos, competencia, hervívoros.
QUÍMICOS	Sales en exceso o en defecto, metales pesados, pH, contaminación atmosférica (SO ₂), xenobióticos.
MECÁNICOS	Vientos, rayos, fuego, nieve.

Tabla 1: Factores que generan estrés en los vegetales, agrupados según su origen.

Los mecanismos de respuesta de las plantas a los diferentes tipos de estrés son complejos. En este sentido es preciso diferenciar entre mecanismos de escape, de resistencia estricta y de tolerancia. Los mecanismos de escape involucran la adaptación del ciclo biológico de la planta a condiciones más favorables. Los mecanismos de resistencia estricta evitan que el factor de estrés entre en contacto con la planta y los mecanismos de tolerancia, permiten que el factor que causa el estrés entre en contacto con ella sin que afecte al correcto funcionamiento fisiológico. A modo de ejemplo, existen especies que pueden tolerar naturalmente períodos de sequía, de bajas temperaturas o concentraciones elevadas de metales o herbicidas.

Los elementos involucrados en la respuesta al estrés son: los estímulos (estrés), las señales, los transductores, los reguladores de la transcripción, genes que actúan como blancos y las respuestas al estrés, que se manifiestan como cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos (Figura 6).

La identificación de los componentes vegetales que participan en la percepción de la señales ambientales, cómo interaccionan entre ellos y los procesos metabólicos que se activan para que la planta se adapte a las nuevas condiciones, ha despertado gran interés en científicos de todo el mundo. Esto se suma al hecho que el estrés ambiental representa el factor limitante más importante para la productividad vegetal y el rendimiento de las cosechas (Allen, 1995). La información adquirida en esta temática ha sido utilizada para mejorar la tolerancia de especies vegetales de interés agronómico.

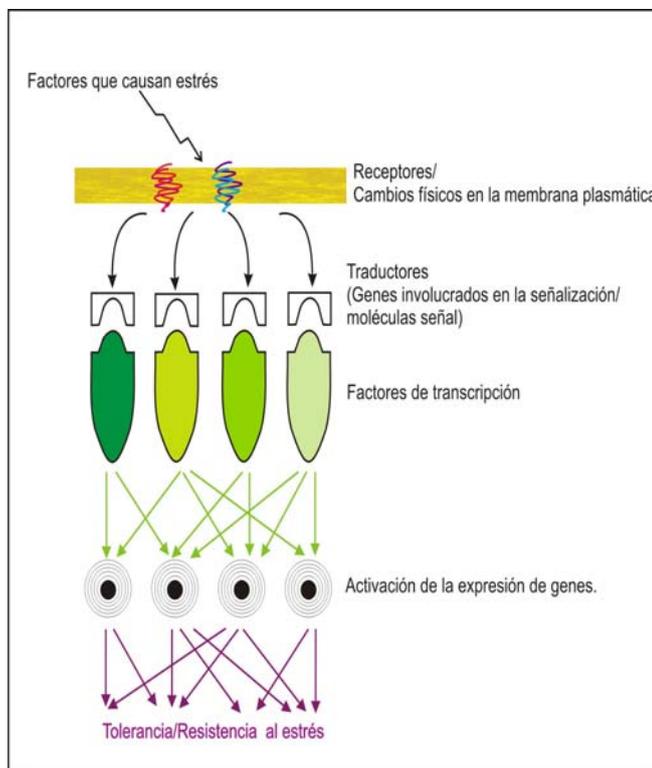


Figura 6: Relaciones entre los componentes involucrados en la respuesta al estrés (Adaptado de Pastori y Foyer, 2002).

Los receptores presentes en las membranas plasmáticas pueden responder a cambios ambientales (físicos, químicos o metabólicos) y disparar la cascada de transducción de señales. Los transductores son los componentes claves en este proceso ya que participan en la producción, percepción y transmisión de mensajeros primarios y secundarios. Los factores de transcripción activan o inhiben la expresión de los genes actuando indirecta o directamente sobre los promotores de los mismos. Los genes activados resultan el punto final de cada cascada de señalización.

IV.4.1- MECANISMO DE *SHADE-AVOIDANCE*.

La luz es una de las variables ambientales más importantes, dado que las plantas la utilizan como recurso energético (fotosíntesis) y como señal para la activación y la modificación de los programas de desarrollo. Las plantas pueden percibir los cambios en la cantidad, calidad y dirección de la luz, lo que las habilita para seleccionar el momento ideal para las distintas etapas del desarrollo.

Las comunidades naturales de plantas, así como las plantas cultivadas, crecen muchas veces en condiciones de iluminación reducida. Esto genera una competencia entre individuos que dispara respuestas específicas involucrando cambios en sus estructuras. Las plantas han desarrollado dos mecanismos evolutivos que le permiten crecer en condiciones de alta densidad: “evitar/escapar” o “tolerar” la sombra. Las angiospermas presentan principalmente mecanismos de “escape” de la sombra, a los cuales nos vamos a referir como “mecanismos de *shade-avoidance*” y es probable que éstos hayan contribuído a su éxito reproductivo (Smith y Whitelam, 1997).

Los pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides) absorben luz visible. Como estos pigmentos no absorben radiación roja ni roja-lejana, la misma es reflejada o transmitida. Un parámetro útil para describir la calidad de la luz del ambiente es la razón obtenida de la irradiancia de luz roja en relación a la luz roja-lejana (R:RL):

$$R:RL = \frac{\text{Irradiancia entre 655 y 665 nm}}{\text{Irradiancia entre 725 y 735 nm}}$$

La razón R:RL durante el día se aproxima a 1,15 y varía muy poco con las condiciones ambientales o con la época del año en la cual se realice la medición. Las mediciones debajo del canopeo (área foliar que intercepta la radiación) suelen estar en el rango de 0,05-0,7 (Smith, 1982). Estos cambios en la calidad de la luz, son percibidos por los fitocromos. Como ya vimos, los fitocromos presentan dos formas Pr

(absorbe luz roja hasta 660 nm) y Pfr (absorbe luz roja-lejana hasta 730 nm). Las cantidades relativas de luz roja o roja-lejana se van a reflejar en diferentes concentraciones de las formas del fitocromo (Pr o Pfr). Los mecanismos de *shade-avoidance* constituyen una de las estrategias competitivas más importantes de las plantas. Las respuestas son variadas y se acepta actualmente que se desencadenan por una sola señal ambiental: los cambios en la relación R:RL. La tabla 2 muestra las principales respuestas observadas en plantas cultivadas en cámaras y estimuladas con sombra.

Las respuestas se dan en todo el ciclo biológico, desde la germinación hasta la floración y producción de semillas (Smith y Whitelam, 1997). Uno de los cambios más dramáticos provocados por razones R:RL bajas, observados tanto en condiciones naturales de sombreado como en cámaras de cultivo, es la elongación del tallo que ocurre rápidamente. Cuando se cultivaron plantas de girasol durante tres semanas en condiciones de baja relación R:RL, las plantas alcanzaron 1 metro de altura, mientras que cuando se cultivaron en condiciones normales, medían 0,25 metro. Otro componente importante del síndrome de *shade-avoidance* es la aceleración de la floración observada en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Smith y Whitelam, 1997).

Todas las respuestas descritas en la tabla 2 se observan en ambientes naturales con elevada densidad de especies. Éstas también pueden obtenerse, bajando la relación R:RL o bien exponiendo las plantas a radiación con luz RL.

PROCESO FISIOLÓGICO	RESPUESTA A LA SOMBRA
Germinación	Retrasada
Crecimiento en extensión	Acelerado
Extensión de los internudos	Se acelera rápidamente
Extensión de los pecíolos	Se acelera rápidamente
Expansión foliar	Se acelera en cereales
Desarrollo de la hoja	Retrasado
Crecimiento del área foliar	Marginalmente reducido
Ancho de la hoja	Reducido
Desarrollo de los cloroplastos	Retrasado
Síntesis de clorofila	Reducida
Relación clorofila a/b	Se altera de forma balanceada
Dominancia apical	Más pronunciada
Ramificación	Inhibida
Floración	Acelerada
Velocidad de floración	Muy aumentada
Producción de semillas	Muy reducida
Desarrollo del fruto	Truncado
Distribución de nutrientes	Alterada
Reserva en órganos de almacenamiento	Reducida

Tabla 2: Características del síndrome de “Shade-avoidance” (adaptado de Smith y Whitelam, 1997).

A partir de la caracterización de líneas mutantes y líneas que sobreexpresan los genes que codifican los fitocromos de *Arabidopsis thaliana* se identificaron cuáles son los fitocromos involucrados en las respuestas de *shade-avoidance* (Reed y col., 1994; Bagnall y col., 1995; Yanovski y col., 1995; Smith y Whitelam, 1997).

El PHYB participa en la de-etiolación, en respuesta a la luz roja (función similar a la del PHYA en respuesta a la luz roja-lejana) ya que las mutantes *phyB* no germinan

en estas condiciones. Las mutantes *phyB* presentan características fenotípicas del síndrome de *shade-avoidance* en cualquier relación R:RL que se cultiven, como la elongación de los hipocótilos, tallos y pecíolos y la aceleración de la floración (Smith y Whitelam, 1997). Las mutantes dobles *phyAphyB*, presentan una aceleración de la floración y un crecimiento del internodo de las hojas en roseta más pronunciado cuando se exponen a la luz roja-lejana.

Franklin y col. (2003) confirmaron que el síndrome de *shade-avoidance* está regulado por los fitocromos B, D y E, actuando de manera redundante. Sin embargo, el fenotipo observado en la mutante *phyB* crecida en relaciones R:RL elevadas (que no presentan ninguna de las otras mutantes monogénicas *phyD* o *phyE*) permite inferir que el PHYB es el integrante principal de las respuestas de *shade-avoidance* en *Arabidopsis thaliana* (Franklin y Whitelam, 2005).

Existe poca información referida a los componentes que actúan corriente abajo de los fitocromos, que estén involucrados específicamente en el mecanismo de *shade-avoidance*. Los tres primeros genes identificados en *Arabidopsis thaliana* fueron *ATHB2*, *ATHB4* y *PIL1*, cuya expresión aumenta en plántulas tratadas con luz RL (Carabelli y col., 1993; 1996; Salter y col., 2003). La expresión del gen *HFR1* aumenta rápidamente cuando las plantas se cultivan con luz RL y éste es un regulador negativo de las respuestas de *shade-avoidance* (Sessa y col., 2005). Más recientemente Roig-Villanova y col. (2006) demostraron que los genes arriba mencionados junto con *PIL1* y *RIP* constituyen el grupo *PAR* (*PHY RAPIDLY REGULATED*). Estos genes estarían regulados directamente por el fitocromo, y serían los responsables primarios de desencadenar el fenotipo de *shade-avoidance*. Se demostró también que, en

Arabidopsis, los factores de transcripción PIF4 y PIF5 participan en la vía de señalización del fitocromo B que promoviendo las respuestas de *shade-avoidance*. Esta conclusión se basa en el hecho de que las plántulas cultivadas en condiciones de oscuridad presentan elevadas concentraciones de PIF4 y PIF5. Cuando las mismas se exponen a luz roja, los factores se degradan, pero si se exponen a luz roja-lejana, permanecen estables. Además el fenotipo de las mutantes *phyB* se revierte parcialmente en ausencia de PIF4 y PIF5 (Lorrain y col., 2008).

IV.4.2- EL ESTRÉS OXIDATIVO.

Una respuesta frecuente y común de las plantas expuestas a diferentes condiciones adversas como calor, frío, elevadas intensidades lumínicas, sequía, choque osmótico, daño, exposición a radiación UV-B, ozono y patógenos, es la producción acelerada de especies reactivas del oxígeno (EROs) como el radical superóxido (O_2^-), el ión peróxido (O_2^{2-}) y el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$). Las EROs son generadas en diferentes compartimentos celulares como consecuencia del funcionamiento defectuoso de vías metabólicas y procesos fisiológicos (Allen, 1995) (Figura 7).

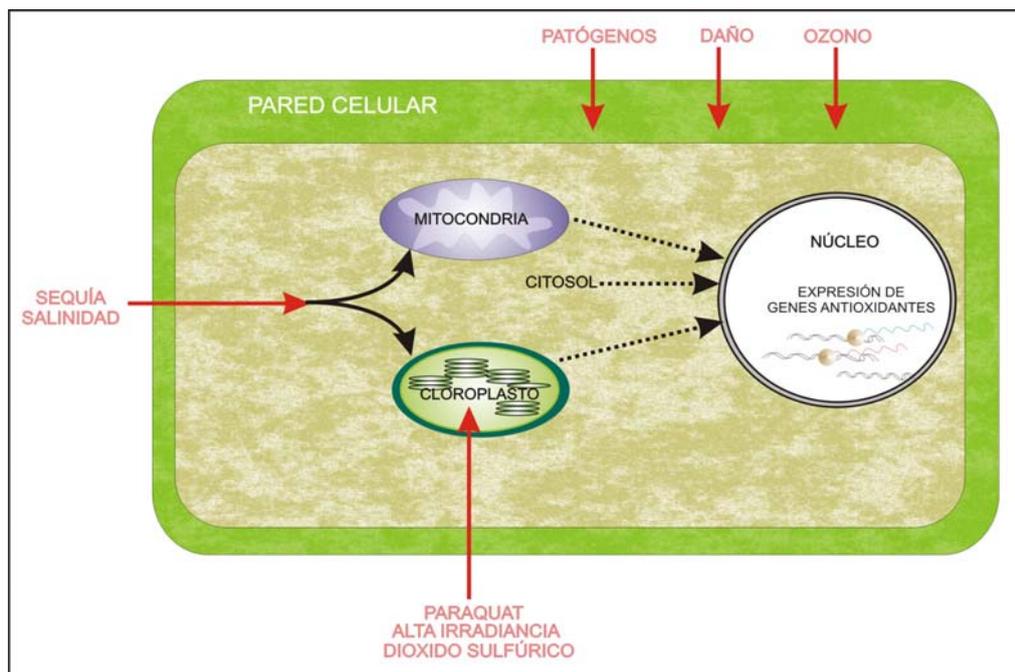


Figura 7: Generación de de EROs en los diferentes compartimentos celulares (adaptado de Grene, 2002).

Las células producen EROs en los diferentes compartimentos celulares como resultado de procesos endógenos y en respuesta a factores exógenos (patógenos, daño celular, ozono, paraquat, sequía, salinidad, etc). Las EROs actúan también como moléculas señal que activan la expresión de genes involucrados en los mecanismos de resistencia antioxidante.

Los cloroplastos de las plantas poseen mecanismos antioxidantes que les permiten escapar al estrés oxidativo. Estos mecanismos están mediados por las enzimas antioxidantes como las de la familia de la superóxido dismutasa (SOD) y de la ascorbato peroxidasa (APX) y también por metabolitos como el ácido ascórbico y el glutatión. La ruta de escape de las EROs en los cloroplastos propuesta por Allen (1995), se muestra en la figura 8.

Las especies redox funcionan también como moléculas de señalización y actúan regulando el metabolismo, la morfología y el desarrollo de las plantas. A modo de ejemplo, se considera que el H_2O_2 constituye una señal local y sistémica que permite la adaptación de las hojas a elevadas intensidades lumínicas (Karpinski y col, 1999).

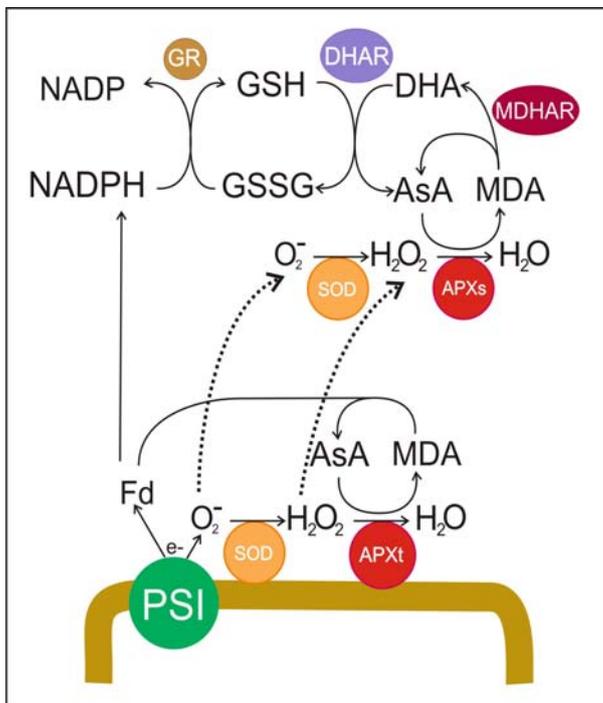


Figura 8: Ruta de escape de las EROs en cloroplastos. (adaptada de Allen, 1995).

Los radicales superóxido (O_2^-) son dismutados por la superóxido dismutasa (SOD) asociada al fotosistema I (PSI). El H_2O_2 resultante se convierte en agua por la acción de la ascorbato peroxidasa tilacoidal (APXt). Las EROs que escapan de la destrucción en la membrana tilacoidal, son procesadas en el estroma por la SOD y la APX del estroma (APXs). La APXs produce radicales monodihidroascorbato (MDA) que serán convertidos en AsA (ácido ascórbico) a través de reacciones con Fd (ferredoxina) o con la enzima monodihidroascorbato reductasa (MDHAR). La reducción de DHA (dihidroascorbato) a AsA es catalizada por la enzima dihidroascorbato reductasa (DHAR) en la vía ascorbato:glutation. (GR: glutatión reductasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado)

Las EROs también están relacionadas con los cambios fenotípicos en respuesta al estrés salino. Rodríguez A. y col. (2004) demostraron que, en gramíneas, la disminución de la producción de EROs contribuía a la reducción de las hojas, fenotipo que presentan las plantas en condiciones de estrés salino, mediante un mecanismo que no estaba asociado a los cambios de pH en el apoplasto. Además, la disminución de las EROs no estaba acompañada por el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes, por lo cual existiría una vía alternativa para disminuir la producción de EROs, además de las conocidas (Rodríguez A. y col., 2007).

Dada la temática de esta Tesis y teniendo en cuenta las distintas condiciones de estrés que generan EROs, se describen dos de los mecanismos de estrés: el causado por exceso de iluminación y el generado por la acción de herbicidas .

IV.4.2.1- Estrés oxidativo generado por altas intensidades lumínicas.

La fotosíntesis es el metabolismo por el cual los organismos fotoautótrofos convierten energía lumínica en energía química.

La energía lumínica utilizada en este proceso es absorbida por los pigmentos vegetales que se encuentran en las membranas tilacoides de los cloroplastos. Estos pigmentos, asociados entre sí en concentraciones particulares y con proteínas, se ordenan en conjuntos funcionales denominados fotosistemas (figura 9). Existen dos fotosistemas, cada uno con su tipo de centro de reacción fotoquímico y un conjunto de moléculas antena con funciones distintas y complementarias.

El fotosistema II (PSII) contiene cantidades aproximadamente iguales de clorofilas *a* y *b*. La excitación de su centro de reacción P_{680} impulsa electrones desde la molécula del agua a través del complejo del citocromo *b₆f* con el movimiento concomitante de protones a través de la membrana del tilacoide. El fotosistema I (PSI) tiene un centro de reacción P_{700} y una elevada proporción de clorofila *a* respecto a la de clorofila *b*. El P_{700} recibe los electrones desde el PSII vía el complejo del citocromo *b₆f* y la plastocianina y, una vez excitado pasa electrones a la proteína Fe-S ferredoxina (Fd), y a continuación a la ferredoxina-NADP⁺ reductasa (FNR), que cataliza la reducción de NADP⁺ a NADPH.

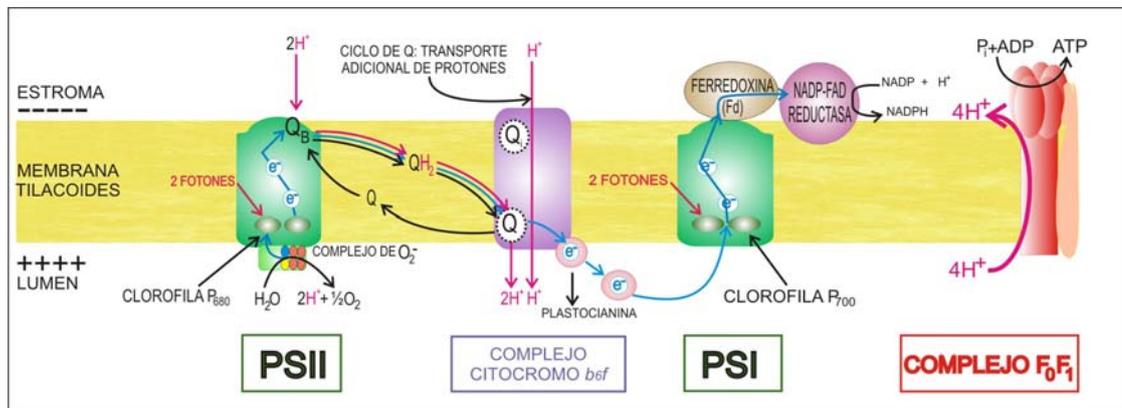


Figura 9: Cadena transportadora de electrones de las plantas (adaptada de Taiz y Zeiger, 2002²)

Las flechas celestes indican el flujo de electrones y las rosadas el de protones. Se indican esquemáticamente los complejos proteicos intervinientes.

Estas reacciones de óxido-reducción que suceden en las membranas de las tilacoides, convierten a los cloroplastos en elementos enriquecidos en EROs (Allen, 1995). La elevada intensidad lumínica hace que las clorofilas del PSII permanezcan excitadas por un largo tiempo sin poder continuar con la secuencia de reacciones, aumentando las posibilidades de que se genere O_2^- (Niyogi, 1998). El mismo exceso de energía puede además, saturar el PSI de forma tal que todos los intermediarios de la cadena queden reducidos y los electrones que sobran se transfieran al oxígeno generando superóxido (Figura 10).

En condiciones de elevada intensidad lumínica, el complejo antena sufre modificaciones pasando rápida y reversiblemente a un estado en el cual la energía absorbida en exceso (potencialmente peligrosa) se disipa como calor. Este mecanismo se denomina “disipación de la energía no-fotoquímica” (qE; Horton y Ruban, 1992).

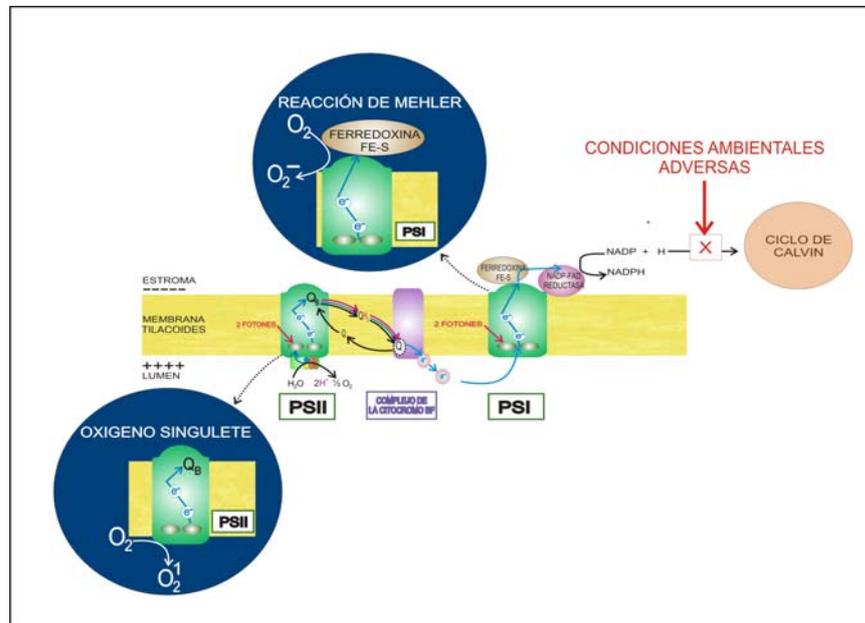


Figura 10: Generación de EROs en los cloroplastos (adaptada de Carrillo y Valle, 2003)

Las condiciones ambientales adversas causan la inactivación de varias enzimas del ciclo de Calvin. Esta inactivación conduce a la sobrerreducción de la cadena fotosintética de transporte electrónico. Como consecuencia, el exceso de energía y electrones es derivado al O_2 para generar oxígeno singlete y superóxido.

Los procesos moleculares involucrados en este mecanismo, no han sido caracterizados aún en su totalidad (Ruban y col., 2007). El mecanismo qE se desencadena cuando el pH del lumen tilacoide es bajo. El pH bajo activa a la enzima de-epoxidasa de violaxantina (VDE) (que cataliza la conversión de violaxantina en zeaxantina) y favorece la protonación de proteínas del PSII que están involucradas en el mecanismo qE (Horton y Ruban, 1992).

Una de las proteínas caracterizadas, que participa en la disipación de la energía no fotoquímica es la proteína PSBS de *Arabidopsis thaliana*. Esta proteína fue identificada a partir de una línea mutante (*npq4-1*) que carecía del mecanismo qE, de modo tal que era sensible a la fotoinhibición cuando se exponía a condiciones de elevada intensidad lumínica (Li y col., 2000). Esta proteína de 22 KDa, presenta cuatro

hélices que atraviesan la membrana tilacoidal y un sitio de unión de pigmentos diferente al de las proteínas del complejo antena (Li y col., 2000). Su ubicación específica no está definida aún, pero se propuso que estaría localizada en algún lugar entre el centro de reacción del PSII y el complejo antena. Es probable que exista una asociación funcional entre PSBS y el PSII (Niyogi y col., 2004). El modelo propuesto para el mecanismo qE se resume en la figura 11. En condiciones de irradiación limitada, el pH del lumen tilacoidal en estado estacionario es ≥ 6 . El pigmento violaxantina está unido al complejo antena (LHC). En presencia de exceso de iluminación, el pH del lumen tilacoidal baja ($\text{pH} \leq 6$), y se produce la protonación en el extremo carboxilo de las cadenas en la enzima VDE y en PSBS. La protonación activa a la enzima VDE y permite que se asocie a la membrana donde convierte las moléculas de violaxantina en zeaxantina. La protonación en los residuos de glutamato E122 y E226 de PSBS genera sitios de unión simétricos para xantófilas con moléculas de tipo zeaxantina. La zeaxantina unida a los sitios protonados de PSBS resulta en el estado de qE en el cual la de-exitación de la clorofila singulete es facilitada. Otras moléculas de zeaxantinas pueden unirse a otros sitios en proteínas de los complejos antena I o II.

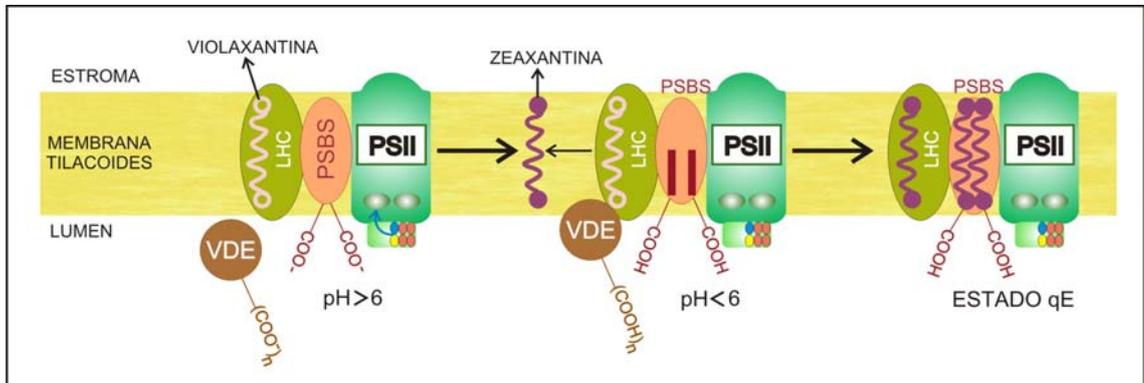


Figura 11: Modelo esquemático del mecanismo qE en plantas (adaptada de Nigoyi y col., 2004).

Para simplificar el esquema, los componentes no se representan a escala, no se muestran otros pigmentos como clorofilas y carotenoides, y se indican solamente una molécula de violaxantina y una proteína del complejo antena por fotosistema (PSII).

IV.4.2.2- Estrés oxidativo generado por la aplicación de herbicidas.

Las malezas compiten con los cultivos por los nutrientes del suelo, constituyen un nicho ideal para los insectos que atacan a los cultivos, e interfieren con la disposición y la infraestructura de la tierra. El resultado final es la disminución del rendimiento global de los mismos.

En 1955 se describieron las propiedades herbicidas del producto químico paraquat (figura 12 - A) y fue comercializado como Gamaxone®.

El paraquat es un herbicida que ejerce su acción interfiriendo con el proceso de fotosíntesis. Es un herbicida de acción rápida que destruye hojas y tallos con los que entra en contacto y no es selectivo, ya que ataca todo tipo de plantas.

El principio activo del paraquat es el metil viológeno que actúa capturando electrones que van de la ferredoxina al NADP^+ (figura 12 - B). Los electrones capturados reducen al oxígeno formando superóxido.

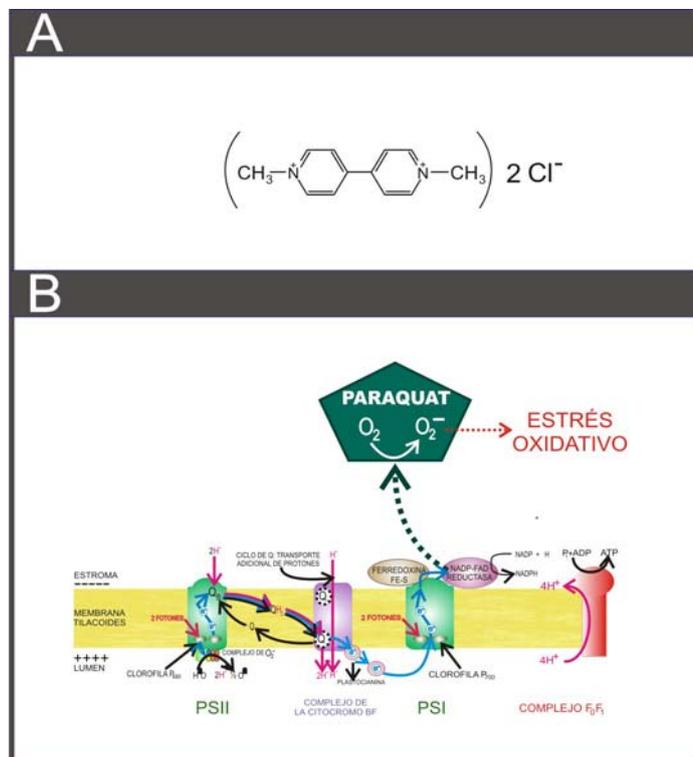


Figura 12: Estructura y mecanismo de acción del paraquat.

A) Estructura química del paraquat.

B) El paraquat captura electrones que van desde la Ferredoxina al NADP+, y reduce el oxígeno (O₂) formando superóxido (O₂⁻) generando así, estrés oxidativo en las células.

Se han identificado líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana* que son tolerantes a los tratamientos con metil viológeno. Éstas, presentan los niveles aumentados de algunas de las enzimas del sistema antioxidante del cloroplasto y son tolerantes a otros tipos de estrés. Por ejemplo, la línea mutante *pst1* –*photoautotrophic salt tolerant*- (Tsugane y col., 1999), fue identificada en una búsqueda de mutantes tolerantes a elevadas concentraciones de sal. Las plantas *pst1* son tolerantes a

tratamientos con metil viológeno, con altas intensidades lumínicas y con cationes tóxicos monovalentes (Li^+ , Cs^+). Estas mutantes presentan niveles elevados de las enzimas SOD y APX, y en condiciones de estrés, elevados niveles de ARNm de los genes *RBCS* y *CAB*, cuyos productos proteicos están involucrados en la fotosíntesis.

Otra mutante de *Arabidopsis thaliana*, *rcd1* –*radica induced cell death*- (Fujibe y col., 2004), presenta tolerancia a tratamientos con luz UV-B y metil viológeno. Esta mutante fue identificada primero por Overmeyer y col. (2000) por ser más sensible a tratamientos con el gas ozono. En *rcd1* los niveles de expresión de los genes que codifican las enzimas ascorbato peroxidasa del estroma y de la tilacoides (*APXs*, *APXt*) y la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc plástidica (*CSD2*) están aumentados en condiciones normales, lo que explicaría la tolerancia que presenta a las diferentes condiciones de estrés.

Murgia y col. (2004) generaron líneas de *Arabidopsis thaliana* que expresan el gen que codifica la enzima ascorbato peroxidasa tilacoidal (*APXt*) bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*35S:APXt*). Estas líneas presentaron mayor resistencia a los tratamientos con paraquat y con nitroprusiato de sodio (agente liberador de óxido nítrico). Sin embargo, cuando las plántulas se sometieron a otras condiciones de estrés que provocan la fotoinhibición de los fotosistemas, como frío, alta intensidad lumínica, o exposición a elevadas concentraciones de hierro o cobre, las plantas transgénicas no presentaron mayor tolerancia que las salvajes, indicando que la sobreexpresión del gen *APXt* no reforzaba las defensas antioxidantes en respuesta a las condiciones de estrés mencionadas. Esto probablemente se deba al hecho de que la sobreexpresión de *APXt*, no protege a las células de la fotoinhibición, ya que la misma se produce principalmente a nivel del fotosistema II, y como vimos anteriormente, las enzimas APX actúan en el fotosistema I. Este trabajo aportó evidencias de la importancia de las APX en los mecanismos de señalización del H_2O_2 .

Al margen de los resultados obtenidos por Murgia y col. (2004), se ha demostrado que las proteínas Fd o FNR también están involucradas en la tolerancia al estrés oxidativo. Rodríguez R. y col. (2007) obtuvieron plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* que expresaban la FNR de *Pisum sativum*. Las plantas transgénicas no presentaban diferencias con las salvajes en cuanto a la fijación de CO₂, pero presentaban una mayor tolerancia al daño fotooxidativo cuando eran tratadas con metil viológeno. Estos resultados sugirien que la actividad NADPH-Fd reductasa de la FNR eliminaría el exceso de equivalentes reductores de la cadena transportadora de electrones que fue generado en la situación de estrés mencionada.

Como puede deducirse, las vías de acción como las de interacción de los componentes del sistema antioxidante son complejas y muchas veces están cruzadas, por lo que quedan muchas preguntas abiertas para poder dilucidar completamente los mecanismos moleculares involucrados en cada respuesta.

IV.5.- FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO VEGETAL.

La regulación de la expresión génica a nivel de la transcripción controla muchos procesos biológicos como la progresión del ciclo celular, el balance metabólico y fisiológico y las respuestas al entorno. Para establecer la/s vía/s de transducción de señales que determina/n la respuesta adaptativa de las plantas a las

condiciones variables del medio ambiente suele utilizarse una estrategia que consiste en el aislamiento y caracterización de los factores específicos que participan en la/s misma/s.

Los factores de transcripción se definen como proteínas que poseen dominios que reconocen secuencias específicas en el ADN, se unen a ellas y activan o reprimen la transcripción de genes. Los dominios de unión al ADN están conservados en secuencia y estructura, en proteínas de organismos de los distintos reinos (*Plantae*, *Animalia* o *Fungi*). A lo largo de la evolución se constituyeron familias de factores de transcripción, donde las proteínas que las conforman, adquirieron nuevos elementos independientemente (Riechmann y col., 2000).

Existen familias de factores de transcripción que son exclusivas de plantas como AP2/EREBP (Riechmann y Meyerowitz, 1998), NAC (Aida y col., 1997) y WRKY (Euglem y col., 2000) entre otras. En esta Tesis, se presentan los resultados obtenidos de la caracterización funcional de dos factores de transcripción de la familia HD-Zip, exclusiva de plantas, que presentan en su estructura dos dominios conservados asociados: el **homeodominio**, y un dominio **cierre de leucinas**.

El homeodominio es un dominio proteico de 61 aminoácidos codificado por una secuencia de ADN de 183 pb denominada caja homeótica (McGinnis y col., 1984). En todos los organismos eucariotas, se han identificado genes que codifican proteínas con homeodominio, las que actuarían como factores de transcripción.

En las plantas, los factores de transcripción con homeodominio pueden dividirse en distintas familias y subfamilias de acuerdo a la conservación de la secuencia de aminoácidos dentro y fuera del homeodominio, a su tamaño, a la

presencia de otros motivos y a las estructuras de los genes que las codifican incluyendo la presencia y ubicación de intrones y exones (Chan y col., 1998). En la figura 13 se presenta un esquema de las estructuras de los miembros de las familias de factores de transcripción de plantas que presentan un homeodominio: HD-ZIP, PHD-FINGER, BELL, ZH-HD, WOX y KNOX.

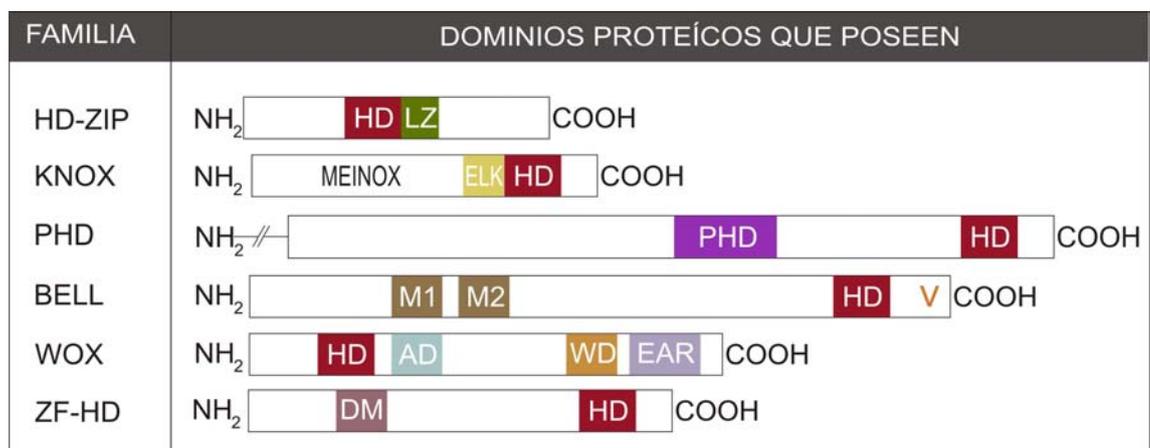


Figura 13: Familias de factores de transcripción que contienen homeodominio (adaptado de Ariel y col., 2007)

Representación esquemática de los diferentes motivos que presenta cada familia de proteínas que tienen homeodominio (HD). Los motivos conservados se indican como: dominio ácido (AD), dominio de dimerización (DM), motivo de represión amfifílico (EAR), motivo ELK, motivo cierre de leucinas (LZ), M1, M2, MEINOX, PHD, "V" (caja VSLTLGL) y el dominio WUS (WD).

IV.5.1.- FAMILIA HD-ZIP.

Utilizando oligonucleótidos degenerados correspondientes a una región altamente conservada del homeodominio (la hélice III de reconocimiento) para buscar ADNc de genes que los codifiquen en una biblioteca de *Arabidopsis thaliana*, fueron aislados dos ADNc que codifican proteínas que contienen un homeodominio asociado a un dominio cierre de leucinas (Ruberti y col, 1991). Este fue el primer trabajo en el que se informó la existencia de proteínas que asociaban estos dos dominios dentro de una misma proteína. Casi en simultáneo, otro grupo de investigación identificó y aisló

varios genes que codificaban proteínas de esta familia de *Arabidopsis thaliana* (Schena y Davis, 1992). Actualmente, se conocen proteínas HD-Zip de diversas especies vegetales como girasol (Chan y González, 1994), zanahoria (Kawahara y col., 1995), tomate (Meissner y Theres, 1995), soja (Moon y col., 1996), arroz (Meijer y col., 1997; Agalou y col., 2007), en el helecho *Ceratopteris richardii* (Aso y col., 1999) y del musgo *Physcomitrella patens* (Sakakibara y col., 2001).

La familia HD-Zip se ha dividido en cuatro subfamilias denominadas I, II, III y IV respectivamente según su homología de secuencia dentro y fuera del motivo HD-Zip, su tamaño y a la presencia de intrones (tabla 3; Sessa y col., 1994).

Las proteínas de las subfamilias I y II tienen un tamaño de alrededor de 300 aminoácidos y el dominio HD-Zip se encuentra, en la mayoría de ellas, en la región central de la molécula. En la región N-terminal presentan dominios ácidos, típicos de las proteínas que actúan como reguladores transcripcionales.

Las proteínas de la subfamilia I poseen un dominio HD-Zip poco conservado y no presentan homología fuera del mismo. Reconocen y se unen como dímeros a la secuencia CAAT(A/T)ATTG (Sessa y col., 1997; Palena y col., 1999).

Las proteínas de la subfamilia II muestran un alto grado de homología dentro del dominio HD-Zip y poseen secuencias conservadas fuera del mismo, como el motivo CPSCE adyacente al cierre de leucinas (Chan y col., 1998; Tron y col., 2002). Los miembros de la subfamilia II se unen específicamente a la secuencia CAAT(G/C)ATTG (Sessa y col., 1997).

Los miembros de la subfamilia III tienen un tamaño de 800 aminoácidos aproximadamente, presentan un dominio HD-Zip de características particulares ya que

posee dos inserciones de 4 aminoácidos, una ubicada entre las hélices 2 y 3 del homeodominio y la otra en la unión entre el cierre de leucinas y el homeodominio. Los estudios realizados con la proteína ATHB9 de *Arabidopsis thaliana* muestran que se une a la secuencia específica GTAAT(G/C)ATTAC (Sessa y col., 1998). Recientemente se ha demostrado que las cisteínas presentes en el homeodominio de ATHB9, están involucradas en la unión al ADN, la especificidad y la sensibilidad a las condiciones redox (Comelli y Gonzalez, 2007).

Las proteínas de tipo HD-Zip IV reconocen y se unen a diferentes secuencias de ADN. Analizando en conjunto los datos obtenidos de las secuencias que son blancos de los miembros HD-Zip IV, puede verse que en todas ellas está presente la secuencia TAAA (Ariel y col., 2007).

Las proteínas de las subfamilias III y IV, además del motivo HD-Zip, contienen un dominio llamado START (Pointing y Aravind, 1999) que participaría en la unión de esteroides (Shrick y col., 2004).

Los miembros de las cuatro subfamilias participan en distintos eventos de regulación del desarrollo. Además, presentan diferentes patrones de expresión génica, en condiciones normales y/o en condiciones de estrés en diferentes órganos/tejidos y/o estructuras de las plantas.

SUBFAMILIA	LONGITUD DEL ARNm	INTRONES EN EL HD (SEGÚN EL ESQUEMA)	PRESENCIA DE AMINOÁCIDOS EXTRAS EN EL MOTIVO HD-ZIP
I	≈ 1500 pb	En la hélice I o ninguno	Ninguno
II	≈ 1500 pb	En las hélices II y III	Ninguno
III	≈ 3000 pb	En la hélice III	4 entre las hélices 2 y 3 4 entre la hélice 3 y el LZ
IV	≈ 3300 pb	En la hélice I o en el LZ	7 entre la hélice 3 y el LZ

SUBFAMILIA	DOMINIOS PROTEICOS
I	NH ₂ — [HD LZ] —COOH
II	NH ₂ — [N-TERM] [HD LZ] [CPSCE] —COOH
III	NH ₂ — [HD LZ] [START] [SAD] [] [MEKHLA] —COOH
IV	NH ₂ — [HD LZ] [] [START] [SAD] —COOH

Tabla 3: Características generales de las subfamilias HD-Zip (adaptado de Sessa y col., 1994 y de Ariel y col., 2007).

En la parte superior se muestra la longitud aproximada de los transcritos de ARNm, la posición de los intrones y los aminoácidos extras que presentan en algunos casos en el motivo HD-Zip. En la parte inferior se indican (esquemáticamente) los motivos conservados que presentan los miembros de las diferentes subfamilias. La subfamilia I no presenta ninguna región conservada fuera del homeodominio (**HD**) y del cierre de leucinas (**LZ**). En la subfamilia II se indica el motivo consenso **N-TERM** y el motivo **CPSCE** adyacente al LZ. La subfamilia III presenta los motivos **START** (“*steroidogenic acute regulatory protein-related*”) y **SAD** (región conservada al motivo START), que comparte con la subfamilia IV, y un motivo carboxilo terminal **MEKHLA** (motivo similar al motivo PAS).

Algunos genes de la subfamilia III, como *REVI* (*REVOLUTA*), *PHB* (*PHABULOSA*)/*ATHB9* y *PHV* (*PHAVOLUTA*)/*ATHB14*, están involucrados en el desarrollo del meristema apical del embrión, las yemas, y los domios adaxiales de los órganos laterales (Zhong y Ye, 1999; Otsuga y col., 2001; Emery y col., 2003) mientras que los genes *ATHB8* y *ATHB15* están relacionados con el desarrollo vascular (Ohashi-Ito y Fukuda, 2003).

Los genes de la subfamilia IV estarían relacionados con la definición de las células epidérmicas y la regulación de la expresión génica específica de las distintas capas celulares (Schrack y col., 2004).

Se han estudiado varios genes de *Arabidopsis thaliana* pertenecientes a las subfamilias I y II. Un ejemplo caracterizado estructural y funcionalmente es el del gen *ATHB2*, de la subfamilia II. Los estudios de su patrón de expresión génica, de mutantes en el mismo y de plantas que lo sobreexpresan, permitieron concluir que *ATHB2* tendría un papel en la regulación del desarrollo de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a las condiciones de iluminación, promoviendo la elongación del hipocotilo e inhibiendo la expansión de las células de las hojas (Carabelli y col., 1993; Schena y col., 1993) siendo un mediador de la expansión celular en respuesta a los efectos de la sombra (Carabelli y col., 1993; 1996; Steindler y col., 1999).

Los genes de *Arabidopsis thaliana* que codifican factores de transcripción de tipo HD-Zip I caracterizados hasta la fecha, están involucrados en distintos procesos de desarrollo. El gen *ATHB1* participa en los procesos de de-etiolación de las plántulas (Aoyama y col., 1995) y *ATHB16* está involucrado en las respuestas a la luz azul, al fotoperíodo y en la regulación de la expansión celular (Wang y col., 2003). Los estudios funcionales realizados con los genes *ATHB3*, -13, -20 y -23 sugirieron que estos genes estarían involucrados en la regulación del desarrollo de los cotiledones y hojas. *ATHB13* mediaría además, respuestas vinculadas con la señalización de sacarosa (Hanson y col., 2000; 2001). Otros genes de *Arabidopsis thaliana*, también

de la subfamilia I, estarían involucrados en las vías de señalización de la hormona ácido abscísico (ABA). La expresión de los genes *ATHB5*, -6, -7 y -12 está inducida en plántulas cultivadas en condiciones de estrés hídrico y/o cuando se aplica ABA exógeno. Los estudios funcionales sugirieron que participan en la regulación del crecimiento en respuesta a ABA o a estrés hídrico (Söderman y col., 1999; Johannesson y col., 2003; Himmelbach y col., 2002; Hjellström y col., 2003; Olsson y col., 2004).

Existen además estudios de expresión de genes que codifican proteínas HD-Zip de otras especies. Se han identificado hasta el momento 7 genes de tipo HD-Zip en la especie *Craterostigma plantagineum* (*CPHB1* a -7) que responden al estrés hídrico, induciendo o reprimiendo su expresión (Frank y col., 1998). En *Oryza sativa* se observó que los genes *OSHOX19*, *OSHOX22* y -24 (HD-Zip I) aumentaron los niveles de ARNm en plantas sometidas a estrés hídrico (Agalou y col., 2007). En otras especies como *Daucus carota*, *Physcomistrella patens* o en *Ceratopteris richardii* no se ha informado sobre la expresión de los genes identificados.

IV.5.2.- PROTEÍNAS HD-ZIP DE *Helianthus annuus*.

En el laboratorio en el que se desarrolló esta Tesis se aislaron y caracterizaron estructural y funcionalmente genes de la familia HD-Zip de girasol, en particular en relación con el desarrollo y la respuesta adaptativa a las condiciones externas.

Entre los genes aislados y caracterizados se encuentra *HAHB4* (*Helianthus annuus homeobox 4*). Este gen pertenece a la subfamilia I y su expresión se induce de manera rápida en presencia de ABA o en condiciones de déficit hídrico, y más levemente en condiciones de elevada osmolaridad o salinidad (Gago y col., 2002). Los estudios funcionales realizados en plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la construcción *35S:HAHB4* permitieron inferir sus funciones. La sobreexpresión produce cambios fenotípicos que incluyen un retardo en la velocidad de desarrollo, inflorescencias compactas, tallos y pecíolos más cortos y hojas más redondeadas que las de plantas salvajes. Además, el gen de girasol confiere a las plantas transgénicas una fuerte tolerancia a condiciones de estrés hídrico mientras que la sobreexpresión de sus homólogos de *Arabidopsis thaliana* *ATHB7* y *ATHB12* no lo hace (Dezar y col., 2005). Se realizaron también, ensayos de microarreglos con ARN de plantas transgénicas que indicaron que la tolerancia conferida por el gen *HAHB4* estaría relacionada con una inhibición de la biosíntesis y/o percepción de la hormona etileno (Manavella y col., 2006).

En esta Tesis se presentan los primeros avances de la caracterización funcional de dos genes de girasol que codifican factores de transcripción de la familia HD-Zip: *HAHB1* (un miembro HD-Zip I) y *HAHB10* (un miembro HD-Zip II).

IV.6.- *Arabidopsis thaliana* y *Helianthus annuus*.

IV.6.1.- *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis thaliana (L.) es una planta herbácea de amplia distribución en el hemisferio norte. Se puede encontrar en ambientes pobres y expuestos como por ejemplo, los costados de las caminos (Figura 14; Price y col., 1994). Pertenece a la familia *Brassicaceae* y está relacionada filogenéticamente con varios cultivos de interés económico, como el brócoli. Su altura está comprendida entre los 10 y 30 cm. El tallo es erecto con ramificaciones un poco alejadas de la base. Las hojas son simples, de elípticas a ovales, con los bordes enteros. Presenta dos tipos de hojas, las basales de hasta 2 cm de largo por 0,5 cm de ancho, denominadas “hojas en roseta” (pegadas al suelo) y las caulinares (las que están a lo largo del tallo), más pequeñas, y carentes de pecíolo. Las inflorescencias se presentan en racimos, en el extremo de las ramas o del tallo, y se van separando unas de otras a medida que éste crece, por lo que los pedúnculos de los frutos maduros están separados aproximadamente un centímetro entre ellos. Las flores son hermafroditas, tienen unos 0,5 cm de diámetro, con cuatro pétalos blancos espatulados. Se distinguen sin dificultad todos los órganos florales. El fruto es una silicua linear que aparece desde el centro de la flor, alargado, de unos 3 cm de longitud y 1 mm de ancho, cilíndrico, un poco arqueado y sin pelos. Los frutos contienen dos cavidades en las que se alojan las semillas ovoideas en hilera, sin tocarse entre ellas, en número elevado; unas 30 por silicua. En la madurez, las semillas, son de color anaranjado, lisas y miden medio milímetro aproximadamente.

En cultivos naturales se comporta como una especie anual. La semilla germina y crece durante el otoño hasta formar sus hojas en roseta, atraviesa el invierno en este estado y finalmente florece y produce semillas en la primavera.

Arabidopsis thaliana es el organismo modelo para quienes realizan investigaciones en dicotiledóneas. Las ventajas que presenta son: un ciclo de vida corto (6 a 8 semanas), un tamaño pequeño que permite que sea cultivada a gran escala en habitaciones, produce una gran cantidad de semillas (hasta 5000 por individuo), puede autopolinizarse o bien cruzarse con otro individuo con facilidad y es fácil de mutagenizar química o radiactivamente. Otra característica y no menos importante es que *Arabidopsis thaliana* se transforma fácilmente con el método de infiltración y puede ser infectada con *Agrobacterium tumefaciens* (Bechtold y col., 1993). Tiene un genoma relativamente pequeño (120 mpb) y un nivel bajo de ADN repetitivo.

En el año 1996 más de doscientos científicos que trabajaban en 35 instituciones diferentes crearon el proyecto de investigación, AGI (Iniciativa para el Genoma de *Arabidopsis*) y en diciembre del año 2000 se presentó la secuencia del genoma de esta planta con 25.498 genes identificados. *Arabidopsis thaliana*, se convirtió así en la primera planta cuyo genoma fuera secuenciado. Actualmente, mucha de la información obtenida utilizando *Arabidopsis thaliana* se transfiere a organismos agronómicamente más importantes.

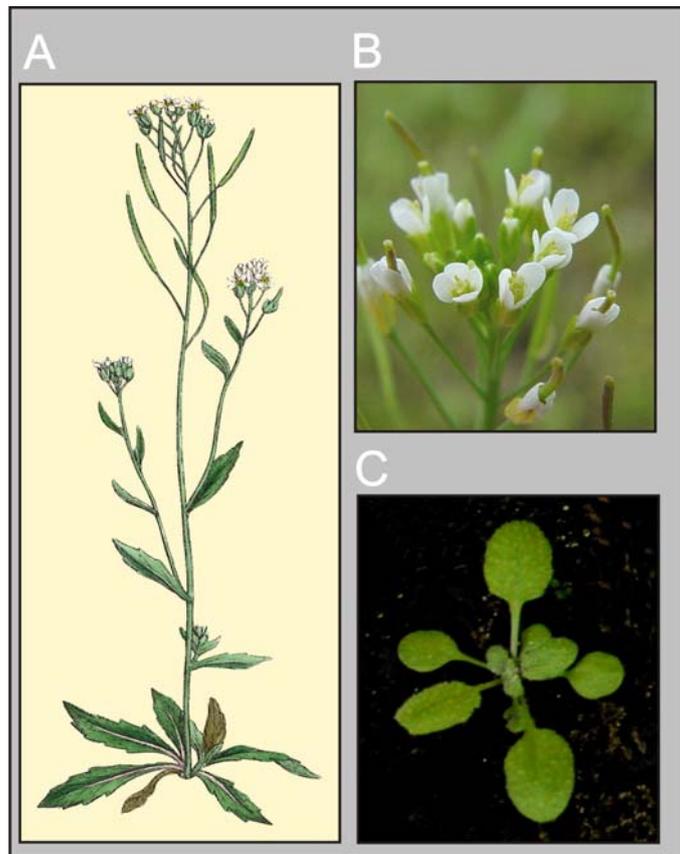


Figura 14: Estructuras de *Arabidopsis thaliana*.

- a) Vista de un ejemplar adulto.
- b) Flor desarrollada
- c) hojas en roseta de un ejemplar de 15 días.

IV.6.2.- *Helianthus annuus*.

Helianthus annuus (girasol) pertenece a la familia de las compuestas (*Asteraceae*), una de las familias más diversas dentro de las angiospermas (Figura 15). El girasol es una especie anual, diploide ($2n = 34$), cuyo cultivo se utiliza principalmente para la producción de aceite, aunque también suele producirse como planta ornamental o para alimentación de animales. En Argentina, el área potencialmente cultivable con girasol se extiende desde Chaco en el norte, hasta el sur de la región pampeana y fue aumentando en los últimos años (Tabla 4).

Provincia	Área sembrada (miles de ha)		
	2000/1	2001/2	2002/3
Buenos Aires	960,0	1074,9	1103,9
Chaco	140,0	160,0	300,0
Córdoba	322,0	248,9	244,9
Entre Ríos	50,5	35,5	49,5
Formosa	-----	-----	0,6
La Pampa	321,0	345,3	397,1
San Luis	36,0	36,0	41,4
Santa Fe	117,3	120,0	152,2
Santiago del Estero	28,0	29,5	88,5
Total del país	1976,1	2050,3	2378,0

Tabla 4: Cultivo de girasol en Argentina (adaptado de Díaz-Zorita y col., 2003).
 Áreas sembradas de girasol en las distintas provincias de Argentina entre el año 2000 y 2003.

El ciclo promedio del girasol comprende entre 100 y 150 días según genotipos, fechas de siembra, latitud y disponibilidad de agua y nutrientes. El desarrollo está controlado genéticamente en interacción con factores del ambiente: la temperatura afecta la duración de todas las fases de desarrollo y fotoperíodo sólo modifica algunas de ellas.

En el control de la germinación, la temperatura es el factor más importante siendo la óptima cercana a los 26 °C, con temperaturas máximas de 40 °C y mínimas entre 3 y 6 °C. El umbral de temperatura de suelo (0 a 5 cm) a partir del que se inician normalmente las siembras es de entre 8 y 10 °C. Temperaturas menores demoran la emergencia afectando el vigor de las plántulas, la eficiencia de implantación y el rendimiento. La disponibilidad de agua actúa sobre la imbibición de las semillas, sobre el crecimiento posterior de la plántula. Su exceso disminuye la cantidad de aire en el

suelo. La calidad de la semilla (viabilidad, poder germinativo, vigor de plántula) es otro factor importante para el logro de emergencias rápidas y parejas.

Luego de la siembra, la plántula emerge y, en la región pampeana, 20 a 30 días después de la siembra, se comienza a diferenciar la inflorescencia (cuando se visualizan alrededor de 6 hojas expandidas). La duración de esta etapa depende del cultivar, de la temperatura y del fotoperíodo, acortándose (menor cantidad de hojas quedan definidas) con temperaturas y radiación altas. La estructura del cultivo será el resultado de la distribución espacial de las hojas y de las raíces. La producción de biomasa del cultivo depende de la cantidad de energía lumínica que interceptan sus hojas determinada por su índice de área foliar (IAF)² y de la eficiencia de su uso. El cultivo en altas densidades y distancias entre hileras estrechas presentan ventajas en cuanto al logro de intercepción de luz pero en algunos casos aumentan el riesgo de vuelco y quebrado durante el llenado de granos.

El desarrollo reproductivo, comienza con la aparición de la inflorescencia (vista desde arriba tiene el aspecto de una estrella con muchas puntas, llamándose “estado de estrella visible”) y finaliza con la floración completa. Al verse el botón floral, el número de flores (número potencial de frutos/planta) ya está determinado. Las flores se vuelven funcionales y se alcanza la máxima área foliar. La duración de esta fase es regulada por el cultivar, la temperatura y el fotoperíodo.

La madurez fisiológica se define por los cambios de color del envés del capítulo (pasa de verdoso a amarillento) y de sus brácteas (se tornan marrones). Cuando los frutos tienen entre 13 y 15 % de humedad se alcanza la madurez comercial (el cultivo es apto para su cosecha mecánica). La duración de la fase floración–madurez fisiológica depende principalmente del cultivar y de la temperatura. La sequía y las enfermedades pueden acelerar la pérdida de hojas interrumpiendo el llenado de los granos, acortando su duración y disminuyendo su peso final.

² IAF: m² de hojas / m² de suelo

El fruto de girasol está formado por el pericarpio y la semilla donde se acumula el aceite. La exposición a elevadas temperaturas reducen el peso final del grano al reducir la duración del período de llenado. Los máximos pesos se logran en un rango de temperaturas medias diarias relativamente bajas (12 a 22 °C). Una mayor interceptación de radiación (área foliar verde) durante el llenado de grano tiene un efecto positivo sobre esta etapa. La concentración de aceite en el grano varía entre 48 y 54 % del peso. La variación entre cultivares se atribuye a diferencias en la proporción de pericarpio (cáscara) y en la concentración de aceite en la semilla.

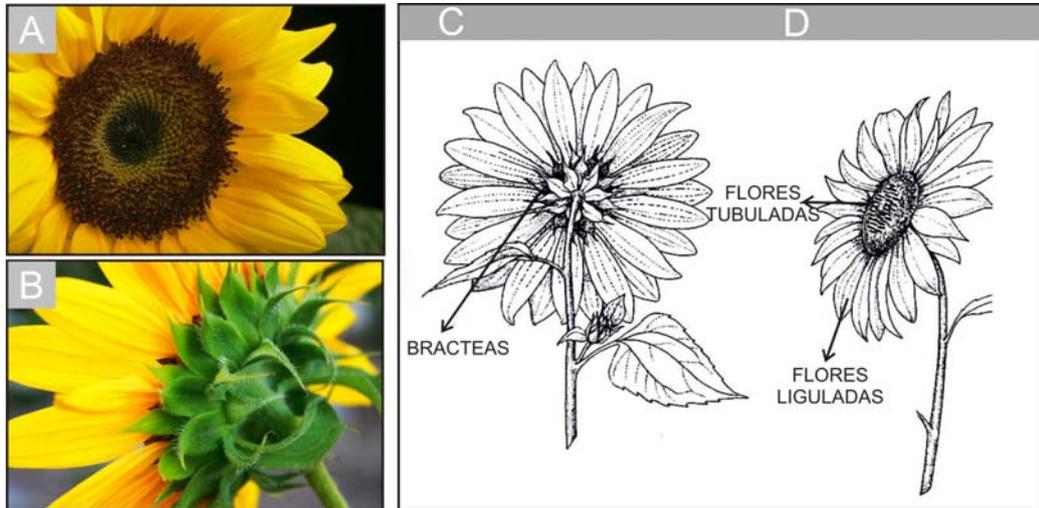


Figura 15: Algunas estructuras de *Helianthus annuus*.
 A y D: Vista de frente de la flor.
 B y C: Vista posterior de la flor
 E: Fruto
 F: Hoja



V.- Objetivos

V.- OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue Tesis es determinar la función que cumplen durante el desarrollo vegetal las proteínas HAHB1 y HAHB10. Se pretendió asimismo caracterizar la expresión de los genes que las codifican, identificar los factores que influyen en la misma y establecer su posible intervención en mecanismos de adaptación a las condiciones ambientales.

Los objetivos particulares planteados fueron:

- Analizar la regulación de la expresión de los genes *HAHB1* y *HAHB10*, definiendo qué factores hormonales y/o nutricionales afectan su expresión, como la primera aproximación para comprender el papel de estos genes en el desarrollo de la planta de girasol.
- Obtener varias líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresen los genes *HAHB1* y *HAHB10* bajo el control de un promotor constitutivo.
- Analizar el fenotipo de las plantas obtenidas en distintas condiciones de crecimiento para evaluar la funcionalidad de los genes en relación con el ambiente.



VI.- Materiales y Métodos

VI.1.- ESPECIES VEGETALES UTILIZADAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

VI.1.1.- Cultivo y tratamientos de plantas de girasol.

Para los estudios en plantas de girasol (*Helianthus annuus L.*), se emplearon semillas de *Helianthus annuus L.* del cultivar Contiflor 15, Zeneca.

Las semillas se colocaron en placas de Petri de 150 mm de diámetro sobre papel de filtro saturado en agua y se incubaron en oscuridad durante 4 días. Luego se pasaron a un régimen de 16 horas de luz (lámparas blancas y GroLux intercaladas) y 8 horas de oscuridad a 25 °C. Se utilizaron plántulas de 7 o 10 días, dependiendo del ensayo.

En el caso de realizar tratamientos en un estadio de desarrollo más avanzado, el cultivo se hizo en macetas con tierra. Para ello, se transfirieron las plántulas a macetas con tierra suplementada con humus y se cultivaron en cámaras con luz y temperatura controladas. Los tiempos de cultivo variaron según los ensayos realizados. Las plantas crecidas en tierra se cultivaron con un fotoperíodo de día largo de 16 horas de luz (lámparas blancas y GroLux intercaladas) y una intensidad de 90 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}$.

Los experimentos de estrés hídrico se realizaron colocando las plántulas sobre papel de filtro seco durante 4 horas.

Los tratamientos de choque térmico, se realizaron manteniendo las plántulas en papel de filtro humedecido durante 4 horas en incubadores a 4 o 45 °C.

En los experimentos practicados con hormonas, las plántulas de 7 días se transfirieron a placas de Petri con medio MS (Ver VI.4), con el agregado de vitaminas de Gamborg (Ver VI.4), suplementadas con giberelinas (GA_3) en una concentración de

200 μ M, ABA 10 μ M o Ethrel[®] 100 μ M (ácido 2-cloroetilfosfórico), un agente liberador de etileno.

Los tratamientos de estrés salino se realizaron también en medio MS suplementado con vitaminas, con el agregado de NaCl a una concentración de 200 mM. Con el objeto de observar el efecto de azúcares, el tratamiento se hizo de forma similar cambiando el NaCl por sacarosa 200 mM.

El tratamiento de hipoxia se realizó sumergiendo las plántulas en agua durante 2 horas. Para los tratamientos de luz continua, se sometieron plantas de 15 días durante 24, 48 y 72 horas a un régimen de luz continua con lámparas blancas.

VI.1.2.- Cultivo, transformación y tratamientos de *Arabidopsis thaliana*.

Se utilizaron macetas de 8 cm x 7 cm con tierra y en cada una de ellas se sembraron semillas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia-0 adquiridas en Lehle Seeds. El número de semillas sembradas varió entre 2 y 20 de acuerdo al ensayo a realizar. Las macetas se colocaron en una bandeja con agua y se cubrieron con film autoadherente transparente. Las plantas se cultivaron en un régimen de 16 horas de luz (lámparas blancas y GroLux intercaladas) y 8 horas de oscuridad a 22 – 24 °C, en cámaras de cultivo en condiciones controladas. A los 10 días (cuando las plántulas presentaban el primer par de hojas), se retiró el film autoadherente que cubría la bandeja. Todos los ensayos se repitieron entre 3 y 5 veces según se indica en las leyendas de las figuras o tablas correspondientes.

Para el cultivo en placas de Petri, las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron desinfectadas mediante lavados en etanol 70 % (v/v) (1 minuto), lavandina 5 % - SDS

1 % (15 minutos) y agua destilada estéril (3 lavados de 5 minutos cada uno). Luego fueron resuspendidas en agar 0,1 % (1 ml de agar cada 10 mg de semillas) y sembradas en placas de Petri de 150 mm conteniendo el medio MS suplementado con vitaminas de Gamborg. Las placas fueron mantenidas a 4 °C durante 2 días y luego fueron colocadas en la cámara de cultivo en las condiciones de iluminación y temperatura controladas ya citadas. La manipulación del material vegetal en condiciones estériles se realizó en una cabina de flujo de aire horizontal (Forma Scientific, Inc.), con pinzas y bisturíes esterilizados por calor. El medio de cultivo MS fue esterilizado en autoclave a 121 °C de temperatura y 1 atmósfera de presión. Una vez enfriado, se le agregaron las vitaminas previamente esterilizadas por filtración.

Las plantas crecidas en tierra en la condición indicada como “control” o “estándar” se cultivaron con un fotoperíodo de día largo de 16 horas de luz (lámparas blancas y GroLux intercaladas) con una intensidad de $90 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Para los estudios de desarrollo y producción se utilizaron 1 o 3 plantas por maceta crecidas en condiciones estándar. En el caso de los estudios de producción, se cosecharon las semillas de cada planta y se pesaron en una balanza. Los estudios de superpoblación se llevaron a cabo sembrando 2, 5, 10 o 20 semillas en cada maceta.

Para los ensayos de peso fresco, se cultivaron 5 plantas en tierra durante 18 días, se cortaron y pesaron de forma individual. Para analizar el peso seco, las mismas plantas se incubaron 48 horas a 37 °C, y se volvieron a pesar una vez deshidratadas por completo.

Los ensayos con distintas intensidades de iluminación se realizaron aplicando el mismo fotoperíodo pero variando las intensidades de iluminación de 57 y 35 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Estas intensidades fueron logradas ubicando las macetas a distancias variables de la fuente de luz.

Para realizar ensayos con distintas calidades de luz, se obtuvieron luces enriquecidas en rojo, rojo lejano o azul, utilizando distintos filtros. Para obtener luz enriquecida en rojo lejano se utilizó una lámpara incandescente y 4 filtros de 3 mm de espesor de acrílico azul intercalados con filtros de color rojo. Para obtener luz enriquecida en rojo, se usó también una lámpara incandescente y 2 filtros de acrílico de 3 mm de color rojo intercalados con papel de acetato amarillo. Finalmente para obtener luz enriquecida en azul, se utilizaron lámparas fluorescentes blancas y 2 filtros de acrílico de 3 mm de espesor de color azul. Para estos ensayos, las plantas se cultivaron durante 5 a 7 días en luz continua.

Los tratamientos con hormonas se realizaron rociando las plantas con una solución acuosa de GA_3 a una concentración de 200 μM a partir de los 10 días, cada 4 días.

El análisis del contenido de pigmentos de las plantas se realizó a partir de la extracción de los mismos en el solvente adecuado. Para la extracción de antocianinas se procedió de acuerdo lo descrito por Mancinelli y col. (1990), utilizando Metanol-HCl 1 % v/v. La extracción de clorofila se determinó de acuerdo al método de Whatley y Arnon (1963) utilizando etanol absoluto. En ambos casos, las extracciones se realizaron a 4 °C en oscuridad y la concentración de cada pigmento se midió utilizando

un espectrofotómetro Shimadzu UV-V, a las longitudes de onda indicadas por los autores.

Para el análisis de la respuesta a herbicidas, se rociaron plantas de 18 días con metil viológeno (principio activo del paraquat) en concentraciones de 1, 5, 10, 20 o 30 μM y se analizaron a las 24, 48 y 72 hs.

Los ensayos de estrés salino u osmótico se realizaron con plántulas germinadas en MS-agar suplementado con NaCl o manitol respectivamente. Las concentraciones ensayadas variaron de 25 mM hasta 300 mM.

Para detectar posibles genes que actuarían como blancos relacionados con el proceso de fotosíntesis, se cultivaron plántulas durante 4 días en condiciones normales y luego se cubrieron con papel de aluminio para someterlas a oscuridad durante 8 horas. Las muestras se congelaron inmediatamente para realizar la extracción de ARN.

Para la transformación de *Arabidopsis thaliana*, se utilizó el método de inmersión o *floral dip*, descrito por Clough y Bent (1998). Se cultivaron 8 macetas con 10 a 15 plantas en condiciones normales hasta el momento de floración (aproximadamente 4 semanas). Cuando los pedúnculos florales se separaron de su yema axilar próxima, se cortaron las inflorescencias, sin dañar las hojas caulinares o las yemas axilares cercanas. A los 2 o 3 días posteriores al corte, surgieron nuevas inflorescencias de las yemas axilares, que se cortaron nuevamente teniendo los cuidados mencionados. Se repitió el procedimiento anterior hasta el momento en que todas las inflorescencias presentaron al menos 4 flores no abiertas (pétalos blancos

ausentes). En este estadio las plantas fueron utilizadas para ensayos de transformación.

Para preparar la suspensión de transformación, se cultivaron células de *Agrobacterium tumefaciens* en 10 ml de medio LB, suplementado con 50 µg/ml de kanamicina, 50 µg/ml de rifampicina y 100 µg/ml de estreptomicina, durante 16 horas a 28 °C con agitación de 160 rpm. Estos cultivos se utilizaron para inocular 200 ml del mismo medio suplementado con los mismos antibióticos. Las células se cultivaron hasta alcanzar la fase estacionaria (16 horas a 28 °C con agitación de 160 rpm). Se cosecharon por centrifugación a 5500 g durante 20 minutos. Las células cosechadas, se resuspendieron en 1 litro de una solución de sacarosa 5 % que contenía 300 µl del detergente *Silwet L-77* (OSI Specialties, Inc.) y esta suspensión se colocó en un vaso de precipitado sobre un agitador magnético. Las plantas se sumergieron entre 30 y 60 segundos, tratando de evitar que el líquido entre en contacto con la tierra. A continuación, se ubicaron las macetas en posición horizontal en las bandejas de cultivo, se cubrieron con papel autoadherente y se dispusieron en la cámara de cultivo. Al día siguiente, se colocaron en posición normal y se cultivaron hasta el momento de la cosecha (aproximadamente a 6 semanas de la siembra). Cuando las vainas se secaron y se tornaron de un color marrón claro, se colectaron las semillas y fueron guardadas en la heladera para su posterior selección y análisis.

Las semillas recuperadas del experimento de transformación fueron esterilizadas y sembradas en placas de Petri conteniendo el medio MS suplementado con kanamicina 40 mg/l. Durante los primeros días en la cámara de cultivo la mayor parte de las semillas germinaron (95 - 99 %). A los 10 días, los cotiledones de las

plantas no transformadas, se tornaron amarillos, mientras que los de las transformantes permanecieron verdes. Siete días más tarde, sólo las plantas transformadas generaron hojas verdaderas verdes, mientras que las no transformadas se tornaron pálidas y finalmente se secaron. Las plantas resistentes al cultivo con kanamicina (transgénicas putativas) fueron pasadas a potes con tierra. Para evitar que pierdan humedad en forma brusca, los potes se ubicaron en una bandeja con agua y se taparon con papel autoadherente transparente durante 2 - 5 días. Luego de este período, se destapó la bandeja y las plantas se cultivaron hasta que las semillas estuvieran maduras. Finalmente, estas semillas (denominadas F₁) se colectaron y se conservaron a 4 °C.

VI.2.- CEPAS BACTERIANAS.

A continuación se describen las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo de tesis.

CEPA	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	REFERENCIAS
DH5α	endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 (Na1r) RelA1 (lacU169 ((80lacZ(M15)	Hanahan, 1983

Tabla 5. Cepas de *Escherichia coli*.

CEPA	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	REFERENCIA
LBA4404	Posee el plásmido Ti pAL4404 que confiere resistencia a estreptomicina. Se obtiene al reemplazar la región del ADN-T del plásmido pTiAch5 en la cepa salvaje Ach5, con el plásmido pBR322. Presenta resistencia cromosomal a rifampicina.	Ooms y col., 1982
GV2260	Posee el plásmido Ti pGV2260 que confiere resistencia a carbenicilina. Se obtiene al reemplazar la región del ADN-T del plásmido pTiB6S3 en la cepa salvaje C58 con el plásmido pBR322. Presenta resistencia cromosomal a rifampicina.	Deblaere y col., 1985

Tabla 6. Cepas de *Agrobacterium tumefaciens*.

VI.3.- PLÁSMIDOS.

De acuerdo a cada objetivo propuesto, se utilizaron plásmidos adecuados, según se describe a continuación:

- Los plásmidos **pUC119** (New England Biolabs) y **pBluescript II SK⁻** (Stratagene Cloning Systems) se usaron para el subclonado de los fragmentos de restricción de las sondas *HAHB10* y *HAHB1* (ver VII.4).

- El plásmido **pCR 2.1-TOPO** (Invitrogen), se utilizó para el clonado de un intrón del gen *HAHB1* producto de una reacción de amplificación con la enzima *Taq* ADN polimerasa

- El plásmido **pBI121.3** (Jefferson y col., 1987) se utilizó para la expresión del ADNc de los genes *HAHB1* y *HAHB10* de girasol en *Arabidopsis thaliana*. Este plásmido contiene el gen que codifica la enzima β -glucuronidasa de *E. coli* (*GUS*) con la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (*nos*), clonados detrás de un

fragmento de 800 pb que contiene un promotor fuerte y constitutivo, el 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV). Tiene además, secuencias específicas, entre las cuales se inserta el gen de interés, que le permiten integrarse al genoma de la planta. Estas secuencias contienen además al gen *nptII* (*neomicin phosphotransferase II*) que confiere tolerancia al antibiótico kanamicina.

VI.4.- SOLUCIONES Y REACTIVOS.

SOLUCIONES	COMPOSICIÓN
Hepes 1 X	Hepes 20 mM (pH 7,8), EDTA 10 Mm
Medio MS	KNO ₃ 1,9 g/l, NH ₄ NO ₃ 1,65 g/l, CaCl ₂ .2H ₂ O 0,44 g/l, MgSO ₄ .7H ₂ O 0,37 g/l, KH ₂ PO ₄ 0,17 g/l, Na ₂ EDTA 37,3 mg/l, FeSO ₄ .7H ₂ O 27,8 mg/l, MnSO ₄ .4H ₂ O 22,3 mg/l, H ₃ BO ₃ 6,2 mg/l, ZnSO ₄ .4H ₂ O 8,6 mg/l, KI 0,83 mg/l, Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 0,25 mg/l, CuSO ₄ .5H ₂ O 0,025 mg/l, CoCl ₂ .6H ₂ O 0,025 mg/l. Para medios sólidos se añade 8 g/l de agar.
Medio de cultivo LB	Peptona de carne 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l; pH 7,0. Para preparar el medio sólido se añade 15 g/l de agar.
Solución A de OLB	1 ml de solución O (Tris-HCl 1,25 M (pH 8,0), MgCl ₂ 0,125 M), 18 µl β-mercaptoetanol, 5 µl dCTP, 5 µl dGTP, 5 µl dTTP 0,1 M c/u
Solución B de OLB	Hepes 2 M (pH 6,6)
Solución C de OLB	Hexanucleótidos de secuencia al azar (dN ₆) de concentración 90 D.O./ml
Solución de Denhardt 100 X	Polivinilpirrolidona 2 % (p/v), albúmina sérica bovina 2 % (p/v), ficol 2 % (p/v)
(Continúa)	

SOLUCIONES	COMPOSICIÓN
Solución de desnaturalización de muestras para <i>northern blot</i>	HEPES 1,3 X, formaldehído 10 %, formamida 50 %
Solución de prehibridización para <i>northern blot</i>	SSC 5 X, SDS 0,5 % (p/v), solución de Denhardt 5 X
Solución de siembra para geles	Azul de bromofenol 0,25 % (p/v), Xilencianol FF 0,25 % (p/v), glicerol 30 % (v/v)
Solución I de minipreparación de ADN	Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), glucosa 50 mM, EDTA 10 mM
Solución II de minipreparación de ADN	NaOH 0,2 N, SDS 1 % (p/v)
Solución OLB	Mezcla de las soluciones A, B y C en una relación 100:250:150
Solución SSC 6 X	NaCl 0,9 M, citrato de sodio 0,09 M
TAE 1 X	Tris-base 20 mM (pH 8,5), EDTA 1 mM
Solución amortiguadora para extracción de ADN de <i>A. thaliana</i>	Tris-HCl 200 mM (pH 8,0), NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5 % (p/v)
Solución amortiguadora para extracción de ARN <i>A.thaliana</i>	Tris-HCl 0,2 M (pH 9), LiCl 0,4 M, EDTA 25 mM, SDS 1 %
Solución amortiguadora para extracción de ARN girasol	Tris-HCl 0,2 M (pH 9,0), NaCl 0,4 M, EDTA 25 mM, SDS 1 % (p/v)
TBE 1 X	Tris-borato 90 mM (pH 8,3), EDTA 2 Mm

Tabla 7. Soluciones y reactivos utilizados.

VI.5.- OLIGONUCLEÓTIDOS Y SONDAS.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA
Tal 3	5'- TTTTCTCTCCTGCAAGAAGCT -3'
Tal 5	5'- TGATGACTTGCACTGGAATGGC -3'
PromH10 R	5'- TCTGAATAAAAGATGTGTAGATTGAT -3'
PromH10 F	5'- TTGCCGAACATGCACTGGAACTA- 3'
H10R	5'- CCACCATCTTCATCTTCTTCACCA- 3'
PR2 F	5'- TACGGGATGCTAGGCGATACC -3'
PR2 R	5'- GACTGGAGGCGAGACGTTCAAGAT -3'
APXt F	5'- CCCCGCCGTCACCTCTTCGTC -3'
APXt R	5'- CATCCTCGTGCTCGTCCCATTGA -3'
PU	5'- CTGGCCGTCGTTTTAC -3'

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados.

NOMBRE	CARACTERÍSTICA
HAHB10	Fragmento de ADNc del gen <i>HAHB10</i> de girasol de 275 pb cortado con <i>EcoRI/Spel</i> (+1 a +275), correspondiente a la región 5' no codificante y que contiene 241 nucleótidos de la región codificante que no incluye el dominio HD-Zip.
HAHB1	Fragmento de ADNc del gen <i>HAHB1</i> de girasol de 397 pb cortado con <i>EcoRI/ClaI</i> correspondiente a la región 3' no codificante (+799 a +1195)
δH1	Fragmento δZip de ADNc del gen <i>HAHB1</i> de 486 pb. Incluye los fragmentos +1 a +393 y +1103 a +1195.
CAB2 (Clon At1g29920)	El gen codifica una proteína A/B de unión a clorofila, asociada al fotosistema II. Se utilizó como sonda el fragmento <i>EcoRI/ XhoI</i> de 261 pb, que incluye desde +916 a +1176.
(Continúa)	

NOMBRE	CARACTERÍSTICA
CHS ⊕ (Clon At5g13930)	El gen codifica la enzima chalcona sintetasa involucrada en el gravitropismo de la raíz y en la síntesis de flavonoides, entre otras funciones. La sonda que se utilizó comprende el fragmento <i>EcoRI/XhoI</i> de +1 a +238 del ADNc (238 pb).
PSBS ⊕ (Clon At1g44575)	El gen codifica una proteína asociada al fotosistema II. Para sonda, se utilizó el fragmento <i>EcoRI/XhoI</i> del ADNc desde +1 a +480 (480 pb).
PORA ⊕ (Clon At5g54190)	El gen codifica una enzima con actividad oxidoreductasa que es dependiente de NADPH y de luz. Como sonda se utilizó el fragmento <i>BamHI/BamHI</i> del ADNc de +691 a +1200 (510 pb).
Ribosomal	ADNr 25S de <i>Vicia faba</i> (fragmentos de 700 pb y 1100 pb).

Tabla 9. Sondas utilizadas.

⊕ Estos clones se obtuvieron del RIKEN BRC Experimental Plant Division, Tsukuba, Japón.

VI.6.- MÉTODOS PARA EL CLONADO DE FRAGMENTOS DE ADN Y ANÁLISIS DE RECOMBINANTES

En general, se han seguido los protocolos descritos por Sambrook y col. (1989) y por Ausubel y col. (1983). En el punto VII.4 de este capítulo están descritas las composiciones de las soluciones utilizadas para el desarrollo del trabajo de Tesis.

VI.6.1.- Minipreparación de ADN plasmídico.

La preparación de ADN plasmídico a partir de células de *E. coli* y *A. tumefaciens* transformadas se realizó según el método de lisis alcalina. Las células transformadas se cultivaron hasta saturación en medio LB suplementado con el

antibiótico correspondiente de acuerdo al plásmido a preparar (ampicilina 100 mg/l para los plásmidos pUC119, pBluescript II SK⁻ y pCR 2.1-TOPO, y ambos kanamicina 50 mg/l y rifampicina 50 mg/l para el plásmido pBI 121.3), a 37 °C (*E. coli*) o 28 °C (*A. tumefaciens*) con agitación. Para cada preparación se centrifugaron 1,5 ml del cultivo saturado a 5000 g durante 5 minutos y el sedimento celular fue resuspendido en 100 µl de Solución I. Luego de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 200 µl de Solución II, los tubos se agitaron por inversión y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 150 µl de acetato de potasio 5 M (pH 5,2) y la mezcla se incubó nuevamente en hielo durante 5 minutos antes de ser centrifugada a 13000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se le realizó una extracción con un volumen de fenol:cloroformo (1:1). El ADN plasmídico presente en la fase acuosa después de centrifugar a 5000 g durante 5 minutos, fue precipitado mediante el agregado de 2 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se incubó a -20 °C durante 15 minutos y posteriormente se centrifugó a 13000 g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado fue lavado con 500 µl de etanol 80 % (v/v), luego se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente fue resuspendido en 20 µl de agua destilada estéril.

Las preparaciones de ADN plasmídico utilizadas en las reacciones de determinación de secuencia, se realizaron empleando el equipo comercial *Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor.

VI.6.2.- Digestión del ADN con endonucleasas de restricción.

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones de reacción recomendadas por los fabricantes. En todos los casos fueron utilizadas 1 a 5 U de enzima por cada μg de ADN a digerir.

VI.6.3.- Ligación de moléculas de ADN.

La ligación de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1 U de T4 ADN ligasa (Promega) en un volumen de reacción de 10 μl y empleando la solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima. Se utilizaron cantidades de inserto y vector tales que la relación molar entre ambos fuera de 3 - 5 a 1. La incubación se realizó durante 16 horas a 4 °C. Cuando se utilizó como vector de clonado el plásmido pCR 2.1-TOPO (Invitrogen), se siguió el protocolo descrito por el fabricante.

VI.6.4.- Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

En todos los casos los volúmenes de reacción fueron de 50 μl , empleándose 1,5 U de la enzima Taq ADN polimerasa (Promega) por reacción. Se utilizó la solución amortiguadora de la reacción provista por el fabricante de la enzima, a la cual se le agregaron MgCl_2 2 mM, dNTP 0,2 mM c/u y 0,4 μM de cada oligonucleótido específico. A esta mezcla de reacción se le incorporó el ADN molde y luego se le agregó la enzima. Finalmente, se añadió una gota de vaselina y se procedió con la reacción de amplificación.

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc.) y en general se utilizó el siguiente programa, en el que la temperatura de hibridización se estableció de acuerdo a la composición de bases de los oligonucleótidos utilizados, aplicando la siguiente relación para su cálculo:

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C) - 5 \text{ } ^\circ\text{C}.$$

Programa:

- 1) 3 minutos a 94 °C
- 2) 1 minuto a 94 °C, 1 minuto y 30 segundos a T_m , 1 minuto y 30 segundos a 72 °C
- 3) 29 ciclos de 2).
- 4) 10 minutos a 72 °C.

En las amplificaciones realizadas utilizando ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* o *Helianthus annuus* como molde, antes de iniciar la reacción, las mezclas de reacción se incubaron sin la enzima a 80 °C durante 5 minutos.

VI.6.5.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Para el análisis de fragmentos ADN en geles de agarosa se empleó el sistema descrito por Ausubel y col (1983). La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,7 % y 2 % (p/v), según el tamaño de los fragmentos que se deseaban separar. Los geles fueron preparados en solución TAE 1 X con una concentración de 0,3 µg/ml de bromuro de etidio. El volumen de muestra en cada caso se mezcló con 1/10 vol. de solución de siembra. La separación electroforética se llevó a cabo en solución TAE 1 X, empleando un voltaje constante entre 1 y 5 V por cm de gel. Para la visualización

del ADN en el gel se empleó un transiluminador de luz UV (310 nm) Fotodyne, USA. El registro de los geles, se llevó a cabo empleando el sistema de captura de imágenes UVP Lab. Prod.

En todos los casos en los que fue necesario estimar la longitud de los fragmentos de ADN separados mediante electroforesis en geles se empleó como marcador una muestra de ADN del bacteriófago λ digerido previamente con la enzima *HindIII*. Esta digestión genera fragmentos de ADN correspondientes a 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb.

VI.6.6.- Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.

La separación electroforética de los fragmentos de ADN que se querían purificar se llevó a cabo en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Promega), empleándose solución TAE 1 X tanto para la preparación del gel como para la solución de corrida. Una vez identificadas las bandas correspondientes a los fragmentos esperados mediante visualización sobre transiluminador UV, éstas se cortaron e incubaron con 1 a 2 volúmenes de agua destilada estéril en baño de agua a 65 °C hasta observar la completa disolución de la agarosa. Posteriormente se llevaron a cabo 2 extracciones sucesivas con 1 volumen de fenol y a continuación una extracción con cloroformo. El ADN presente en la fase acuosa fue precipitado mediante el agregado de 1/10 v/v de NaAc 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol absoluto. Para facilitar la precipitación de fragmentos de muy bajo peso molecular o que se encontraban en baja cantidad, en algunos casos se adicionaron 2,5 μ g de ARNt (Sigma) a la solución etanólica.

En los casos en los que fue necesario obtener ADN de alta calidad a partir de geles de agarosa, se empleó el equipo comercial GFX (*PCR DNA and Gel Band Purification Kit* - Amersham Pharmacia Biotech Inc.).

VI.6.7.- Transformación de bacterias.

VI.6.7.1.- Electrotransformación de *Escherichia coli*.

La preparación de las células competentes y las condiciones de electroporación empleadas fueron las recomendadas en el manual del fabricante del equipo (Gene Pulser™, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,1 cm (Bio-Rad). Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio LB a la suspensión de células y la mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C. Después de centrifugar a 4000 g durante 5 minutos, el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de medio LB y una alícuota (50 µl) se sembró en placas de Petri conteniendo medio LB-agar suplementado con los antibióticos adecuados.

VII.6.7.2.- Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

Para la preparación de células competentes de *A. tumefaciens* y su posterior transformación se siguió el método descrito por Höfgen y Willmitzer (1988), con algunas modificaciones. Las células de *A. tumefaciens* se cultivaron toda la noche en medio LB en presencia de los antibióticos correspondientes a 28 °C con agitación a 160 rpm. Con este cultivo saturado se inocularon 200 ml de medio LB fresco suplementado con kanamicina y rifampicina, y las células se dejaron crecer durante 4 a 5 horas. Luego se cosecharon por centrifugación a 3000 g durante 20 minutos a 4 °C. El sedimento obtenido fue lavado con 10 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1

mM y finalmente resuspendido en 20 ml de medio LB con rifampicina y kanamicina. Se fraccionaron alícuotas de 500 μ l, que se congelaron en N₂ líquido y se conservaron a -80 °C hasta el momento de utilizarlas.

Para realizar la transformación, las células se descongelaron y se mantuvieron en hielo. Se agregaron entre 0,5 y 1 μ g de ADN plasmídico y se incubaron 5 minutos en hielo, luego 5 minutos en N₂ líquido y finalmente 5 minutos a 37 °C. A continuación se agregó 1 ml de medio LB a cada tubo y se mantuvieron durante 2 a 4 horas a 28 °C con agitación. Luego de la incubación a 28 °C, las células transformadas se cosecharon a 5000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 40 μ l de LB. Las células transformadas resuspendidas, se sembraron en placas conteniendo medio LB-agar suplementado con kanamicina y rifampicina y se cultivaron a 28 °C durante 48 horas.

VI.6.8.- Marcación de fragmentos de ADN doble hebra por el método de cebado al azar.

La marcación de ADN doble hebra se realizó según el método de cebado al azar. Para ello, el fragmento de ADN a marcar, se purificó a partir de geles de agarosa como se indicó en el punto VII.6.6.

Se incubaron 50 a 100 ng de ADN en un volumen de 35 μ l de agua bidestilada durante 3 minutos a 100 °C y el tubo se transfirió inmediatamente a un baño de hielo. Posteriormente se agregaron 10 μ l de solución OLB, 2 μ l de albúmina sérica bovina 10 mg/ml, 2 μ l de [α -³²P] dATP (3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l, NEM) y 2-3 U del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Promega). La reacción se dejó transcurrir entre 3 y 12 horas a temperatura ambiente. Luego se agregaron 100 μ l de agua

destilada estéril y el exceso de [α - 32 P] dATP no incorporado se eliminó en columnas de Sephadex G-50.

Antes de ser utilizada, la sonda fue desnaturalizada por incubación a 100 °C durante 3 minutos e inmediatamente pasada a un baño de hielo. Luego se diluyó en la cantidad adecuada de solución de prehibridización.

VI.6.9.- Determinación de la secuencia de moléculas de ADN.

Se utilizó el servicio prestado Macrogen Inc. Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas, se analizaron con el grupo de programas DNASTar. Para las búsquedas de homología se consultaron los bancos de datos del Gene bank utilizando el programa BLAST (Altschul y col., 1997) a través del servidor *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

VI.6.10.- Clonado de los genes de estudio en el vector pBI 121.3

En el laboratorio se cuenta con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* CV2260 (ver descripción de la cepa en VII.2). Con el objetivo de obtener altos niveles de expresión de los genes *HAHB1* y *HAHB10* en plantas de *Arabidopsis thaliana*, utilizamos el plásmido pBI 121 que posee el promotor del gen del ARNr 35S del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV35S*). Este promotor es ampliamente utilizado en la transformación de plantas debido a que es capaz de dirigir la expresión en forma constitutiva y en niveles elevados.

La estrategia de clonado del gen *HAHB1* en el vector pBI 121.3 se muestra en la figura 16. Se utilizó un clon previamente obtenido en el laboratorio que tiene la construcción de ADNc completo de *HAHB1* en el vector pMTL22. Se digirió esta

construcción con las enzimas *Bam*HI y *Sac*I, al igual que el vector pBI 121.3. Luego se ligaron el fragmento de 1195 pb del gen y el vector pBI 121.3, y se transformaron células de *E. coli* DH5 α . Para corroborar la presencia del plásmido en las células se realizaron digestiones con las enzimas *Bam*HI y *Sac*I, como también la reacción en cadena de la polimerasa con los oligonucleótidos Tal-3 y Tal-5, específicos del cDNA insertado. Una vez analizada la presencia del plásmido de interés en *E. coli*, se realizó una minipreparación de ADN plasmídico de alta calidad y éste fue empleado para transformar la cepa CV2260 de *Agrobacterium tumefaciens*. La presencia del plásmido se confirmó, realizando una reacción de PCR sobre ADN plasmídico extraído de una de las colonias obtenidas, utilizando nuevamente, los oligonucleótidos Tal-3 y Tal-5.

El gen *HAHB10* fue clonado previamente en el laboratorio siguiendo una estrategia similar (Ceaglio N, 2002).

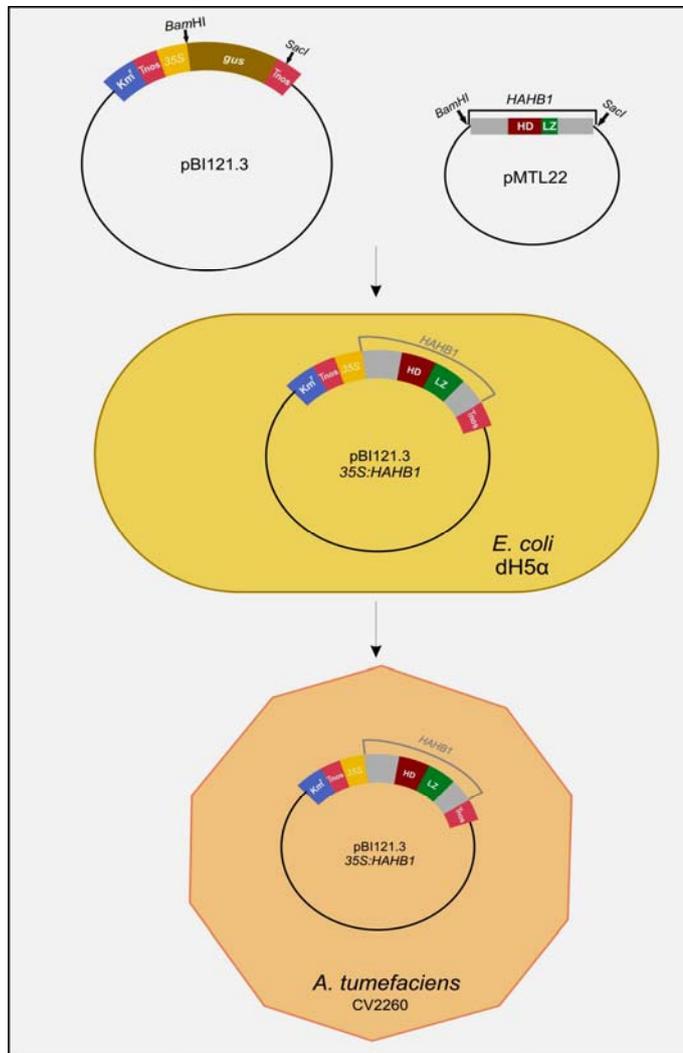


Figura 16: Estrategia de clonado del gen *HAHB1* en el vector *pBI121.3*

VI.7.- PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS DE VEGETALES.

VI.7.1.- Preparación de ARN total de girasol.

Las preparaciones de ARN total se realizaron según lo descrito por Hall y col (1978), con modificaciones.

Se pulverizó el material con N₂ líquido en un mortero estéril. Una vez convertido en un polvo fino se pasó a un tubo y se le agregó la solución amortiguadora de extracción (3 ml por g de material procesado) mantenida a 100 °C. A esta suspensión se le agregó proteinasa K hasta una concentración final de 0,1 mg/ml. La mezcla se incubó 1 hora a 37 °C con agitación suave. Se agregó KCl hasta una concentración final de 50 mM, se agitó suavemente y la mezcla se incubó 15 minutos en hielo. Luego de centrifugar durante 15 minutos a 13000 g a 4 °C, al sobrenadante se le agregó LiCl hasta una concentración final de 2 M y se incubó a 4 °C al menos 2 horas para precipitar el ARN en forma selectiva. Luego de centrifugar 20 minutos a 13000 g a 4 °C, el precipitado se lavó con LiCl 2 M y posteriormente se resuspendió en acetato de potasio 0,2 M. Se centrifugó 10 minutos a 10000 g para extraer los polisacáridos insolubles, y al sobrenadante se le realizó una extracción con un volumen de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se recuperó la fase acuosa y el ARN se precipitó agregando 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Luego de centrifugar durante 15 minutos a 13000 g a 4 °C, el ARN precipitado fue resuspendido en agua y conservado a -80 °C hasta el momento de ser utilizado.

VI.7.2.- Preparación de ARN total de *Arabidopsis thaliana*.

Las preparaciones de ARN total de *Arabidopsis thaliana* se realizaron según el método descrito por Carpenter y Simon (1998).

Se pulverizó el material con N₂ líquido en un mortero estéril. El material obtenido fue traspasado a un tubo y se agregaron 3 ml/gr de solución amortiguadora de extracción. Se agitó vigorosamente y se agregó 1 volumen de fenol saturado en agua. Luego de mezclar, se centrifugó a 750 g durante 5 minutos. La extracción con fenol ácido se repitió al menos 2 veces más y luego se realizó una extracción con cloroformo. Se recuperó la fase acuosa y se agregó 1/10 vol. de NaAc 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol absoluto. Luego de incubar 30 minutos a -80 °C, se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C y el precipitado obtenido se resuspendió en 10 ml de LiCl 2 M. Se incubó en hielo durante 30 minutos y se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado fue resuspendido en 500 µl de agua estéril y el ARN se precipitó mediante el agregado de 50 µl de NaAc 3 M (pH 5,2) y 1 ml de etanol absoluto. Se incubó nuevamente 5 minutos a -80 °C y luego se centrifugó durante 10 minutos a 12000 g a 4 °C. El precipitado se lavó con etanol 80 % (v/v) y finalmente se resuspendió en agua destilada estéril.

En algunos casos las extracciones se realizaron con el reactivo Trizol[®] (SIGMA) de acuerdo a las indicaciones recomendadas por el proveedor.

VI.7.3.- Minipreparación de ADN total de *Arabidopsis thaliana*.

Se realizaron preparaciones de ADN total empleando un método rápido descrito por Li y Chory (1998). Se colocó una hoja de 20 días de edad en un tubo y se maceró durante 15 segundos. Después de agregar 700 µl de solución

amortiguadora de extracción, se agitó vigorosamente durante 10 segundos y se centrifugó a 18000 g durante 1 minuto. Se tomaron 600 μ l del sobrenadante y se agregó 1 volumen de isopropanol. Luego de mezclar, se centrifugó a 18000 g durante 5 minutos. El precipitado obtenido se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 μ l de agua destilada estéril.

VI.7.4.- Cuantificación de ácidos nucleicos.

La concentración del ADN y el ARN en solución, se estimó a partir de la absorbancia a 260 nm, considerando que $D.O._{(260\text{ nm})} = 1$ equivale a 50 μ g/ml de ADN o a 40 μ g/ml de ARN. Para el caso de las preparaciones de ARN, también se midió la absorbancia a 280 nm, pico máximo de absorción de las proteínas, ya que está determinado que una relación entre absorbancias A_{260}/A_{280} cercana a 2 corresponde a una preparación de ARN libre de proteínas.

Para las preparaciones de vector e inserto para los clonados moleculares, la cantidad a utilizar se estimó en forma visual, comparando las bandas observadas en los geles con patrones de concentraciones conocidas.

VI.8.- MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

Se utilizaron dos metodologías para el análisis de la expresión génica tanto en girasol como en *Arabidopsis thaliana*: *northern blot* y la técnica de PCR en tiempo real. Para los estudios por *northern blot*, se siguió el procedimiento descrito por Ausubel y col (1983).

VI.8.1.- Electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes.

El análisis de ARN por electroforesis se realizó en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes. La concentración de agarosa utilizada fue de 1% (p/v) y los geles fueron preparados en solución HEPES o MOPS 1 X, formaldehído 6 %. Se sembraron entre 10 y 20 μg de ARN total por calle. Al volumen de muestra se le agregaron 3 volúmenes de solución de desnaturalización y la mezcla se incubó 5 minutos a 65 °C. Antes de sembrar se agregó 1/10 vol. de solución de siembra y 0,5 μl de bromuro de etidio 10 mg/ml. La separación electroforética se llevó a cabo en solución HEPES 1 X en el caso de los ensayos para medir la expresión del gen *HAHB1* o MOPS 1 X en los que se analizó la expresión del gen *HAHB10*, empleando un voltaje constante de 3 V/cm de gel. La visualización del ARN en el gel se realizó con un transiluminador de luz UV.

VI.8.2.- Transferencia del ARN a membranas de nylon.

Finalizada la corrida electroforética, el gel se sumergió en agua desionizada, y se realizaron 4 lavados de 15 minutos c/u para eliminar el formaldehído. El ARN fue transferido por capilaridad en una solución de SSC 6 X a membranas de nylon Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) durante 16 horas a temperatura ambiente. Finalmente las membranas fueron secadas y el ARN se fijó por exposición a luz UV (310 nm) entre 3 y 5 minutos.

VI.8.3.- Hibridización de membranas de nylon.

Las membranas a las cuales estaban fijados los ácidos nucleicos fueron prehibridizadas entre 2 y 4 horas a 65 °C en solución de prehibridización. La hibridización se realizó durante toda la noche en las mismas condiciones que la prehibridización, pero con el agregado de la sonda correspondiente, previamente desnaturalizada.

Posteriormente, las membranas fueron lavadas con SSC 2 X a 65 °C (4 lavados de 15 minutos c/u). Una vez secas, fueron expuestas durante tiempos variables a películas T-mat (Kodak) o Biomax MS (Kodak), según la intensidad de la señal esperada. Esta intensidad se estimó previamente con un contador Geiger, sin la tapa protectora.

En el caso de la sonda que se utilizó para medir los niveles de expresión del gen *HAHB10*, se realizó la prehibridización e hibridización con una solución amortiguadora de fosfato de sodio pH 7,2 y SDS 7 % p/v. Al cabo de 16 horas, se efectuaron 4 lavados con SDS 0,1 % p/v SSC 2 X y un lavado final con SDS 0,1 % p/v SSC 0,1 X cada uno de ellos con una duración de 15 minutos a una temperatura de 65 °C.

VI.8.4.- PCR en tiempo Real.

En principio se realizó una reacción de transcripción reversa (RT) que luego fue el molde de la reacción de PCR en tiempo real. La reacción de RT se realizó en un volumen final de 10 µl, con 2 µg de ARN de cada muestra a analizar y 0,5 µl de hexanucleótidos de secuencia al azar (dN₆). Esta mezcla se mantuvo a 72 °C durante 5 minutos, y luego se colocó a 4 °C. A continuación, se agregó la solución

amortiguadora de la enzima transcriptasa reversa M-MLV 1 (Promega, Madison, WI, USA) 1 X, 0,2 mM de cada dNTPs y 2 U de la enzima transcriptasa reversa en un volumen final de 30 μ l. El programa utilizado fue: 8 minutos 22 °C, 15 minutos 30 °C, 15 minutos a 37 °C, 90 minutos a 42 °C, 5 minutos a 80 °C y 30 minutos a 94 °C. Una vez finalizada la reacción de RT, se agregó un volumen de agua destilada (30 μ l) y se conservó a -20 °C.

Para la reacción de PCR en tiempo real, se utilizaron como molde 5 μ l del producto de la RT en un volumen final de 25 μ l. Se utilizó la solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima, a la cual se le agregó $MgCl_2$ 3 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 20 pmol de cada oligonucleótido específico y el colorante SYBRgreen 1 X. A esta mezcla se le agregó 1,5 U de la enzima *Taq platinum* (Invitrogen). Las muestras se colocaron en el equipo MJ-Cromos 4 (BIO-RAD, Hércules, CA, USA) con el protocolo de 40 ciclos: 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 60 °C, 1 minuto a 72 °C. Para todos los pares de oligonucleótidos utilizados se realizó una curva de fusión entre 60 °C y 94 °C de 45 segundos de duración, cada 1,5 °C.



VII.- Resultados y Discusión



Capítulo 1: *H_{AHB1}*, un gen de girasol
perteneciente a la subfamilia HD-Zip I

1.1- ESTRUCTURA DEL GEN.

1.1.1.- Características generales.

El ADNc del gen *HAHB1* (nombre dado por *Helianthus annuus homeobox*) fue identificado y aislado previamente a partir de una biblioteca de ARNm de tallo de girasol. Este gen codifica una proteína (factor de transcripción) que presenta un homeodominio asociado a un motivo de cierre de leucinas (Chan y González, 1994). El ARNm de 1195 pb corresponde al gen *HAHB1* contiene un marco abierto de lectura de 939 pb y codifica una proteína de 313 aminoácidos (Figura 17). El homeodominio está ubicado entre los aminoácidos 88 y 187. Hacia el extremo amino terminal hay un dominio ácido, también presente en otras proteínas HD-Zip (Chan y Gonzalez, 1994). Estas características, permitieron incluir a *HAHB1* dentro de la familia HD-Zip de factores de transcripción de plantas, definidas por Schena y Davis (1992).

La secuencia de aminoácidos del homeodominio de la proteína *HAHB1*, contiene los 7 residuos invariables presentes en casi todos los homeodominios aislados de diferentes organismos (Gehring y col., 1994): **R₇**, **L₁₆**, **F₂₀**, **W₄₈**, **F₄₉**, **N₅₁** y **R₅₃**. De los 10 residuos altamente conservados, 7 están presentes -**Q₁₂**, **K₃₁**, **L₃₈**, **L₄₀**, **Q₅₀**, **R₅₅** y **K₅₇**- y en las posiciones correspondientes a los otros 3, se encuentran sustituciones conservadas:



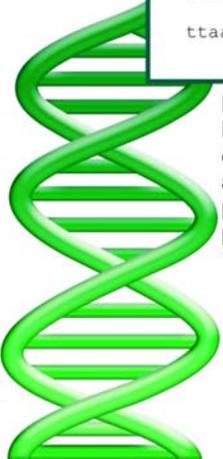
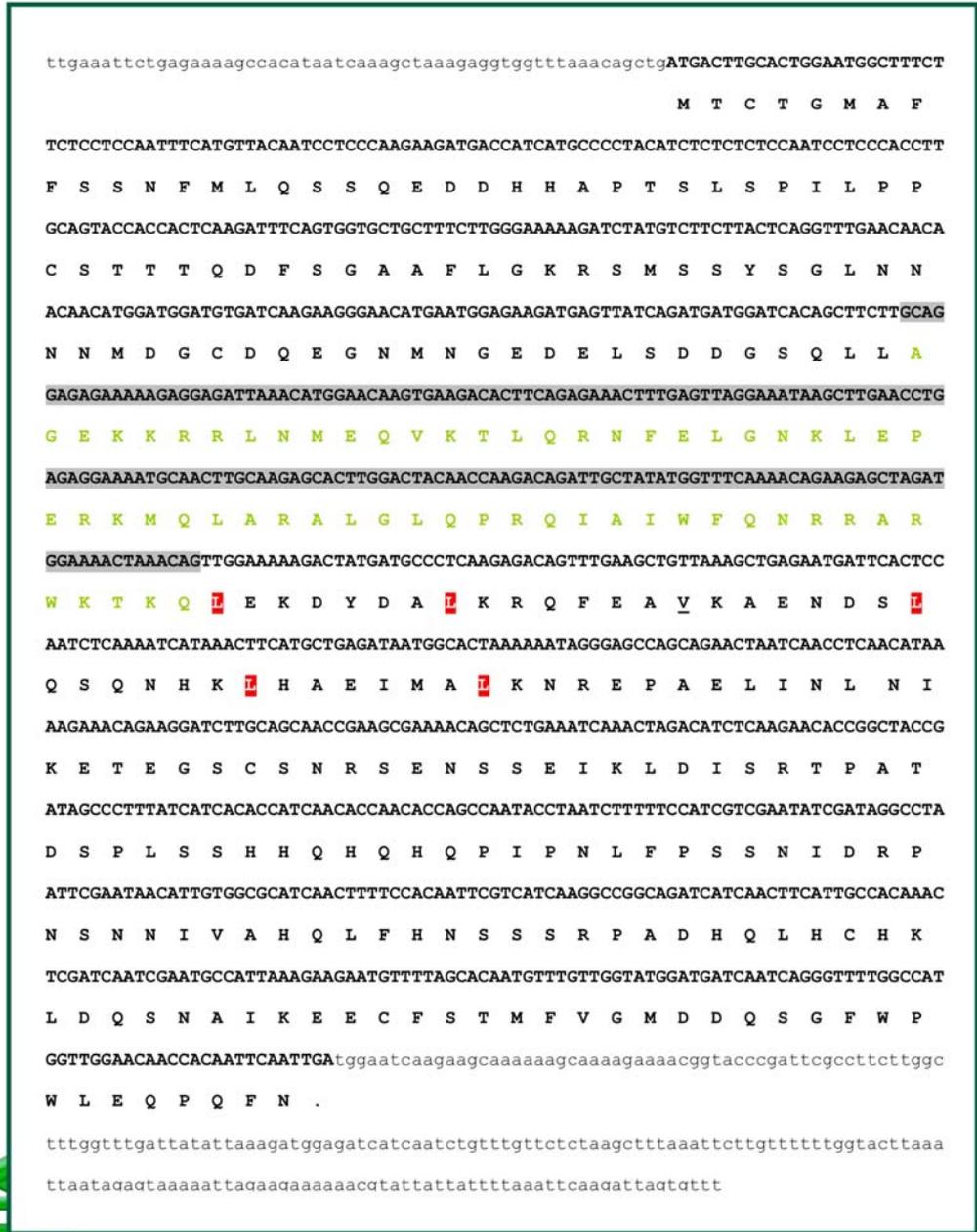


FIGURA 17: Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de HAHB1
 Las regiones 5' y 3' no codificantes están indicadas con letras minúsculas. La región codificante se describe con letras mayúsculas. Los aminoácidos correspondientes al homeodominio se destacan en color verde y los residuos de leucinas pertenecientes al dominio cierre de leucinas, en rojo. La sustitución de una leucina por una valina en la posición d3 está subrayada (adaptada de Chan y Gonzalez, 1994).

En cuanto al motivo cierre de leucinas, puede observarse en la figura 17, que la región codificante, presenta 6 repeticiones de 7 aminoácidos (**a a g**) que conformarían una hélice α anfipática. Las posiciones **d₁**, **d₂**, **d₄**, **d₅** y **d₆** se encuentran ocupadas por leucinas, mientras que en la posición **d₃** hay una sustitución por una valina.

1.1.2.- Comparación de secuencias dentro de la subfamilia.

Con el objetivo de determinar la relación evolutiva de la proteína HAHB1 con otras proteínas HD-Zip I aisladas de girasol y de otras especies vegetales, se alinearon las secuencias de aminoácidos de las regiones correspondientes al homeodominio (Figura 18) y al cierre de leucinas (Figura 19). En la figura 18 puede observarse que la proteína HAHB1 comparte con la secuencia consenso que se dedujo a partir de las secuencias de los homeodominios de las proteínas HD-Zip I, el 88,2 %, indicando que no es un miembro divergente.

En la figura 19, correspondiente al alineamiento de las secuencias del motivo cierre de leucinas, se muestra que las posiciones **d₁**, **d₂**, y **d₅** están altamente conservadas y presentan el aminoácido leucina en más del 90 % de los miembros analizados. En cambio, las posiciones **d₃** y **d₄** son las que presentan variaciones. En la posición **d₃**, el aminoácido leucina está sustituido por valina (67 % de los casos) y por alanina (33 % de los casos).

En la posición **d₄**, el aminoácido leucina está sustituido por valina (60 % de los casos), metionina (20 % de los casos) o isoleucina (20 % de los casos). Si bien, la subfamilia I se caracteriza por no presentar homología fuera de la región del



N° ACCESO	HELICE I	HELICE II	HELICE III
At3g01470	ATHB1 (<i>A. thaliana</i>)	... KKR L . EOVK . L E K . E . ENKLEPERKVOLA . ELGLQPROVAI PROVARARWTKQ	LPEKKRRITTEOVHLLKESFETENKLEPERKTOLAKKLGLOPRQVAVFQNRARFRTKQ
At3g61890	ATHB12 (<i>A. thaliana</i>)		KSNOKRFNEEQIKSLELIFESSETRLEPRKQVARELGLQPROMTIWFONKRARWTKQ
At1g69780	ATHB13 (<i>A. thaliana</i>)		MGEKKRRINMEOVKTLKFNLEGNKLEPERKMLARALGLQPRQIAIWFQNRARWTKQ
At4g40060	ATHB16 (<i>A. thaliana</i>)		LSEKKRRUKVDQVKALEKNFELNKNLEPERKTKLAQELGLQPROVAVFQNRARWTKQ
At3g01220	ATHB20 (<i>A. thaliana</i>)		LGEKKRILQLEOVKALEKSFELGNKLEPERKTIQAKALGMQPRQIAIWFQNRARWTKQ
At2g18550	ATHB21 (<i>A. thaliana</i>)		GWFRKRKISDEQVRMLIIFSEDDHKLSEERKDRLASDELGLDPROVAVFQNRARWTKQ
At2g36610	ATHB22 (<i>A. thaliana</i>)		TSEQLKFERSEFQEEIKLNPDRKMKINFDKRMKLSKELGLQPRQIAVWFQNRARWTKQ
At1g26960	ATHB23 (<i>A. thaliana</i>)		MGEKKRRINMEQLKALEKDFELGNKLESDRKLALARALGLQPRQIAIWFQNRARWTKQ
At5g15150	ATHB3 (<i>A. thaliana</i>)		LGEKKRRINLEQVRALESFELGNKLEPERKMLAKALGLQPRQIAIWFQNRARWTKQ
At4g36740	ATHB40 (<i>A. thaliana</i>)		GLFRKRKITDEQVNMLESFGDEHKLSEERKDRLAELGLDPROVAVFQNRARWTKQ
At5g65310	ATHB5 (<i>A. thaliana</i>)		AAEKRRILGVEQVKALEKNFEDNKLLEPERKVKLAQELGLQPROVAVFQNRARWTKQ
At5g03790	ATHB51 (<i>A. thaliana</i>)		EMTKKRITSGOVLASLERSFOEIKIDSDRQVKSLSRELGLQPRQIAVWFQNRARWTKQ
At5g53980	ATHB52 (<i>A. thaliana</i>)		GKNKKRITQDQVRQLEKFTMNKLEFDLKLQLSNQLGLQPRQVAVFQNRARWTKQ
At5g66700	ATHB53 (<i>A. thaliana</i>)		GMJRKRRITDEQVNMLESYFQNEHKLSEGRKEKIAGELGLDPROVAVFQNRARWTKQ
At1g27050	ATHB54 (<i>A. thaliana</i>)		EITKKRKITPIQLRLLESFEEKRFEPDRKVLWAEKLGLESQVAVFQNRARWTKQ
At2g22430	ATHB6 (<i>A. thaliana</i>)		LSEKKRRILSINQVKALEKNFELNKNLEPERKVKLAQELGLQPROVAVFQNRARWTKQ
At2g46680	ATHB7 (<i>A. thaliana</i>)		NKNNRRFSDEQIKSLEMMFSETRLEPRKQVLAQELGLQPROVAVFQNRARWTKQ
D26573	CHB1 (<i>D. carota</i>)		PPEKKRRITVDQVKYLEKSFVENKLEPDRKVLAKDLGLQPRQVAVFQNRARWTKQ
D26574	CHB2 (<i>D. carota</i>)		GGSKRRINIMQLKTLKESFELGNKLEPERKLELSRALGLQPRQIAIWFQNRARWTKQ
D26575	CHB3 (<i>D. carota</i>)		QPEKKRRIKADQIQFLKESFETDNLKLEPERKVKLAQELGLQPRQVAVFQNRARWTKQ
D26576	CHB4 (<i>D. carota</i>)		GGSKRRINMEQVRTLKESFEMGNKLEPDRKLELARAALGLQPRQIAIWFQNRARWTKQ
D26578	CHB6 (<i>D. carota</i>)		ISEKKRRILSINQVKALEKNFVENKLEPERKVKLAQELGLQPROVAVFQNRARWTKQ
AAL57497	CPHB7 (<i>C. plantigenium</i>)		SSOKRRILSSDQVRFIDKSFVDNKLLEPERKVKLAQELGLQPROVAVFQNRARWTKQ
AB013794	CRHB4 (<i>C. richardii</i>)		ASEKRRILSINQVKALEKNFVENKLEPERKVKLAQELGLQPROVAVFQNRARWTKQ
AB013798	CRHB8 (<i>C. richardii</i>)		PPEKRRITAEQVNFLENSFNIDLKLEPERKALAKKLGIRPROVAVFQNRARWTKQ
AB013801	CRHB11 (<i>C. richardii</i>)		GVEKRRITAEQVNFLETSFMDLKLLEPERKHAQELGLQPROVAVFQNRARWTKQ
AAF01764	GMHD156 (<i>G. max</i>)		HSEKRRILSVDQVKALEKNFVENKLEPDRKVLAKLAQELGLQPROVAVFQNRARWTKQ
AAF01765	GMHD157 (<i>G. max</i>)		QPGKRRITSEQVQFLERNFVENKLEPERKVKLAQELGLQPROVAVFQNRARWTKQ
L22847	HAHB1 (<i>H. annus</i>)		AGEKRRINMEQVTKLORNFELGNKLEPERKMLAKELGLQPRQIAIWFQNRARWTKQ
L22848	HAHB3 (<i>H. annus</i>)		QPEKRRITVDQVKLEKSFELNKNLEPERKMLAKELDLQPRQVAVFQNRARWTKQ
AF339748	HAHB4 (<i>H. annus</i>)		RNEGRKRFQDKQISFLYMFETQSRPELRMKHLAKHKLGLHPRQVAVFQNRARWTKQ
L22851	HAHB5 (<i>H. annus</i>)		QPEKRRITGDQVRFLEKSFESDNLKLEPERKTIQAKALGLQPROVAVFQNRARWTKQ
L22850	HAHB7 (<i>H. annus</i>)		LTEKRRILSPEQVHMLSEFEEENKLEPERKTELAQELGLQPROVAVFQNRARWTKQ



N° ACCESO	CONSENSO	HELICE I	HELICE II	HELICE III
AA038144	HBLZP (<i>P. armeniaca</i>)	..KKR.L.EOVK.LEK.EE.NKLEPERKVOA.ELGLQPROVAI.QR.ARWTKQ		
AAK84885	HDZ1 (<i>P. vulgaris</i>)	KSKNQRFSEQIRLLESIFFEADSKLFFPRKVKQVARELGLQPROVAIWFQNRARWTKQ		
AAK84886	HDZ2 (<i>P. vulgaris</i>)	HAEKKRRLISVDQVKALEKNFEVENKLEPDRKVKLAQELGLQPROVAIWFQNRARWTKQ		
AY101610	HFI22 (<i>N. tabacum</i>)	QFGKKRLTSEQVQFLERNFEVENKLEPERKVLAKELGLQPROVAIWFQNRARWTKQ		
AF005574	OSHOX4 (<i>O. sativa</i>)	ISEKKRRLISVEQVKALEKNFEVENKLEPERKVLAKELGLQPROVAIWFQNRARWTKQ		
AAD37698	OSHOX5 (<i>O. sativa</i>)	GGEKKRRLISVEQVRALEERSFEVENKLEPERKARLARDLGLQPROVAIWFQNRARWTKQ		
AAD37699	OSHOX6 (<i>O. sativa</i>)	APEKKRRLTAEQVOMLERSFEVENKLEPERKTELARRLGMAPROVAIWFQNRARWTKQ		
AC079935	OSHOX8 (<i>O. sativa</i>)	AADRKKFSEEQIKSLESMFATQTKLEPRQKIQLARELGLQPROVAIWFQNRARWTKQ		
AF004185	OSHOX14 (<i>O. sativa</i>)	LGEKKRRLAAEQVRALEERSFEADNKLDPERKARIARDLRHPRQVAIWFQNRARWTKQ		
AF005751	OSHOX16 (<i>O. sativa</i>)	GDPKKRRLISDEQVEMLELSFREERKLETKGRKVHLASELGLDQKQVAIWFQNRARWTKQ		
AF005391	OSHOX20 (<i>O. sativa</i>)	LPEKKRRLTPEQVHLLERSFBEENKLEPERKTELARKLGLQPROVAIWFQNRARWTKQ		
AC073556	OSHOX21 (<i>O. sativa</i>)	GGGKKRRLISVEQVRALEERSFETENKLEPERKARLARDLGLQPROVAIWFQNRARWTKQ		
AL606695	OSHOX22 (<i>O. sativa</i>)	AGEKKRRLNVEQVRTLEKNFELGKLEPERKQVLARALGLQPROVAIWFQNRARWTKQ		
AC090847	OSHOX23 (<i>O. sativa</i>)	AGEKRRRFTTEQIRSLSESMFAHKKLEPREKAEIARELGLQPROVAIWFQNRARWTKQ		
AF004868	OSHOX24 (<i>O. sativa</i>)	GGERKRRFTTEQVRSLETTFHARAKLEPREKAEIARELGLQPROVAIWFQNRARWTKQ		
AB028073	PPHB2 (<i>P. patens</i>)	NVEKKRRLTFDQVRSLELNFEVENKLEPERKQVLAKELGLQPROVAIWFQNRARWTKQ		
AB28076	PPHB5 (<i>P. patens</i>)	QLEKKRRLTIEQVRSLEKNFEAKNLEPERKQVLAKELGLRPRQVAIWFQNRARWTKQ		
AB028077	PPHB6 (<i>P. patens</i>)	QLEKKRRLTFDQVRSLELNFEVENKLEPERKQVLAKELGLRPRQVAIWFQNRARWTKQ		
AB028078	PPHB7 (<i>P. patens</i>)	HVEKKRRLISLEQVRSLELNFEVENKLEPERKQVLAKELGLQPROVAIWFQNRARWTKQ		
AB028079	PPHB8 (<i>P. patens</i>)	PNEKKRRLISFEQVRSLELNFEVENKLEPERKQVLAKELGLQPROVAIWFQNRARWTKQ		
AB028080	PPHB9 (<i>P. patens</i>)	RGEKKRRLISDQVRSLELNFEVENKLEPERKQVLAKELGLQPROVAIWFQNRARWTKQ		
X675545	TAHDZ1PI2 (<i>T. aestivum</i>)	GGEKKRRLNVEQVRTLEKNFEVENKLEPERKQVLARALGLQPROVAIWFQNRARWTKQ		
X94947	VAHOX1 (<i>L. esculentum</i>)	QAEKKRRLITDNQVQFLKSKSFGSEENKLEPERKQVLAKELGLQPROVAIWFQNRARWTKQ		

FIGURA 18: Comparación de las secuencias de los homeodominios de las proteínas pertenecientes a la subfamilia HD-Zip I.

La primera fila de cada página, contiene la secuencia consenso establecida para la subfamilia. Los residuos invariables se indican en rojo y los altamente conservados en naranja. En blanco están indicados los residuos conservados en la familia HD-Zip. Los puntos (.) indican posiciones no conservadas. Los aminoácidos de las proteínas que muestran identidad con la secuencia consenso están sombreados en gris. En la columna de la izquierda se indica el nombre de la proteína y la especie en la cual fue identificada.

CONSENSO	...LE...L...L...L...L...
ATHB1 (<i>A. thaliana</i>)	TKQLERDYDLLKSTYDQLLSNYDSIVMDNDKLRSE
ATHB12 (<i>A. thaliana</i>)	TKQLEKEYNTLRANYNNLASQFEIMKKEKQSLVSE
ATHB13 (<i>A. thaliana</i>)	TKQLEKDYDTLKRQFDTLKAENDLLQTHNQKLQAE
ATHB16 (<i>A. thaliana</i>)	TKQLEKDYGVLKGGYDSLRRHNFDSLRRDNDSSLQE
ATHB20 (<i>A. thaliana</i>)	TRQLERDYDSLKKQFESLKSNDASLLAYNKKLLAE
ATHB21 (<i>A. thaliana</i>)	KCRILDSEVIHLKEQLYEAEREIQRLAKRVEGTLN
ATHB23 (<i>A. thaliana</i>)	TKQLEKDYDMLKRQFESLRDENEVLQTONQKLQAA
ATHB3 (<i>A. thaliana</i>)	TKQLERDYDSLKKQFDVLRKSDNDSL LAHNKKLHAE
ATHB40 (<i>A. thaliana</i>)	NKRLEEEYNKLNKSHDNVVDKCRLESEVIQLKEQ
ATHB5 (<i>A. thaliana</i>)	TKQLERDYDSLKKQFDVLRKSDNDSL LAHNKKLHAE
ATHB51 (<i>A. thaliana</i>)	AKQLEQLYDSLRLQRYDVVSREKQMLHDEVKKLRAL
ATHB52 (<i>A. thaliana</i>)	TQSLEVQHCTLQSKHEAALSDKAKLEHQVQFLQDE
ATHB53 (<i>A. thaliana</i>)	NKKLEEEYAKLNKHHNDVLRGQCQLSILKLTQEQ
ATHB54 (<i>A. thaliana</i>)	TKQLEHDCDSLKASYAKLKTWDWILFVQNQTLKSK
ATHB6 (<i>A. thaliana</i>)	TKQLERDYGVLKSNFDFALRRNRDSLQRDNDSSLGQ
ATHB7 (<i>A. thaliana</i>)	SKQLETEYNLRQNYDNLASQFESLKKKEKQALVSE
CHB1 (<i>D. carota</i>)	TKQLEKDYDSLKECYDKLRDDHDLRSLKENEKRLLE
CHB2 (<i>D. carota</i>)	TKQLEKDYDLLKSGFDSLKAENDSLQSRNKALHAQ
CHB3 (<i>D. carota</i>)	TKTLEKDYDVLQNSYNSLRKADYDNL LAEKEKLLKAE
CHB4 (<i>D. carota</i>)	TKQLEKDYDLLKSGFDAVKAENDSLQSHNQKLHAQ
CHB6 (<i>D. carota</i>)	TKQLERDYGVLKANYDSLRLKNDTLQENQSLLKE
CPHB7 (<i>C. plantigenium</i>)	TKLLEKDYDALKSNYDRLKEDFDALYSENEKLLKTE
CRHB4 (<i>C. richardii</i>)	NKQLEQDYETLKSSEALQENEDMVKRNKALDEE
CRHB8 (<i>C. richardii</i>)	NKQIEQDYESLKTKEAVIKEREVILLOHEAAMQE
CRHB11 (<i>C. richardii</i>)	NQQIEQDIESLKASYEAVVEEKERLLKEHDLALEA
GMHD156 (<i>G. max</i>)	TKQLERDYGVLKANYDSLRLKNDYDNLQDHEALLKE
GMHD157 (<i>G. max</i>)	TKQLEKDYGVLKASYDRLKSDYESLQVENDKLLKAE
HAHB1 (<i>H. annuus</i>)	TKQLEKDYDALKRQFEAVKAENDSLQSQNHKLHAE
HAHB4 (<i>H. annuus</i>)	SRQIEQEYNALKHNYETLASKSESLKKNQALLNQ
HBLZP (<i>P. armeniacae</i>)	SKQIEQDFRTRLRADYDNLASRFESLKEEKQSLLMQ
HDZ1 (<i>P. vulgaris</i>)	TKQLERDYGVLKANYDSLRLKNDYDNLQDNEALLKE
HDZ2 (<i>P. vulgaris</i>)	TKQLEKDYGTLKASYDRLKGDYESLQVENDKLLKAE
HFI22 (<i>N. tabacum</i>)	TKQLERDYGVLKSNFDFALRHNYESLKHNDNEALLKE
OSHOX4 (<i>O. sativa</i>)	TKQLERDYAALRHSYDSLRLDHDALRRDKDALLAE
OSHOX5 (<i>O. sativa</i>)	TKQLEHDFDRLKAAYDALAADHALLSDNDRLRAQ
OSHOX6 (<i>O. sativa</i>)	SKQLEREYSALRDDYDALCSYESLKKKELALIKQ
OSHOX8 (<i>O. sativa</i>)	FAALRSRHDALRLECDALRRDKDALAAE IADLRDR
OSHOX14 (<i>O. sativa</i>)	SKLLEEFKSLKHAHDAAILKHCHLENEVLRLLKER
OSHOX16 (<i>O. sativa</i>)	TKQLERDFDRLKASFDALRADHDALLQDNHRLHSQ
OSHOX20 (<i>O. sativa</i>)	TKQLERDYAALRQSYDALRADHDALRRDKDALLAE
OSHOX21 (<i>O. sativa</i>)	TKQLEKDYDALKRQLDAVKAENDALLNHKKLQAE
OSHOX22 (<i>O. sativa</i>)	SKQLEHDYAALRSKYDALHSRVESLKKELALITVQ
OSHOX23 (<i>O. sativa</i>)	TKQLEKDFDALRRQLDARAENDALLSLNSKSLHAE
OSHOX24 (<i>O. sativa</i>)	SKQIEHDYAALRAQYDALHARVESLRQEKLALADQ
PPHB2 (<i>P. patens</i>)	TKQLERDYEVLTLDYNRLKSEFEAVLQEKQELQGE
PPHB5 (<i>P. patens</i>)	TKQLERDYETLESYKRLKADYEQVLSKKNHLKAE
PPHB6 (<i>P. patens</i>)	TKQLERDYEALADYKSLKHQYDVLVAEKNNLKAE
PPHB7 (<i>P. patens</i>)	TKQLERDYETLKKAYDRLKADFEAVTLDTSAKAE
PPHB8 (<i>P. patens</i>)	TKQLERDFELLNSGYSKLRDFEVLKEDVLLKAE
PPHB9 (<i>P. patens</i>)	IKQLERDYGALAKDYNRLKEEFEAVSPAHP I PSRE
TAHDZ1PI2 (<i>T. aestivum</i>)	TKQLEKDYDVLKRQFDVAVKAENDALLSHNKKLQSE
VAHOX1 (<i>L. esculentum</i>)	TKQLEKDYDELNRNYDTLKSNNYNNLKEKEDLRTE
ZEBH3 (<i>Z. elegans</i>)	TKQLERDYGVLKSNFDSLKHKHYESLKKQDNESMVKQ

FIGURA 19: Comparación de las secuencias del dominio cierre de leucinas de proteínas de la subfamilia I, pertenecientes a distintas especies. La primera fila muestra la secuencia consenso. Los aminoácidos que muestran identidad con la misma están sombreados en gris.



homeodominio (Chan y col., 1998), dentro de la primer héptada de repeticiones (**a₁-g₁**) del motivo cierre de leucinas se identifican otras posiciones altamente conservadas:

Posición a₁= T (69 %)

Posición b₁= K (88 %)

Posición c₁= Q (87 %)

Posición e₁= E (97 %)

Posición g₁= D (79 %)

Posición h₁= Y (79 %)

Utilizando el programa Clustal W, se compararon entre sí algunas secuencias de los homeodominios de los miembros de la subfamilia I de diferentes especies vegetales con HAHB1. En la tabla 10, se muestra el porcentaje de similitud (igual o mayor al 80 %) de las secuencias de los homeodominios de las proteínas de la subfamilia I indicadas con respecto a la proteína HAHB1. Como puede observarse, HAHB1 comparte similitud con homeodominios de diferentes especies como *Arabidopsis thaliana*, *Daucus carota*, *Oriza sativa* y *Triticum aestivum*.

A partir de las secuencias de los homeodominios alineadas con el programa *Clustal W*, se construyó un árbol filogenético (Figura 20), utilizando el método para la construcción de filogenias de *Neighbour Joining* (Holder y Lewis, 2003). Este análisis permite diferenciar 11 subgrupos monofiléticos dentro de la subfamilia HD-Zip I. Las proteínas presentes en la tabla 10 junto con HAHB1 conforman el subgrupo II dentro de la subfamilia I. Como se observa, HAHB1 no presenta homología con ningún otro miembro de girasol, teniendo en cuenta los miembros identificados hasta el momento.

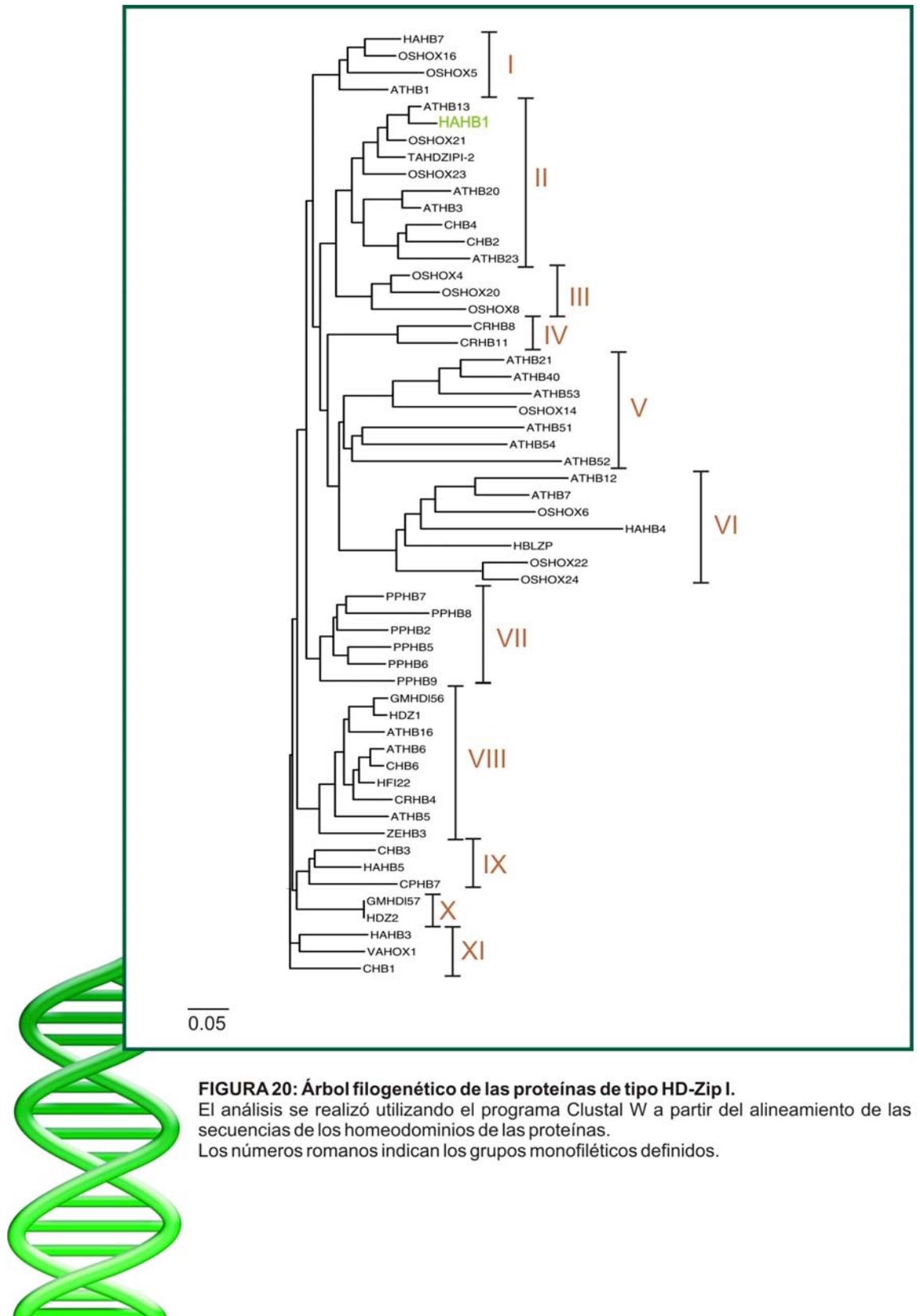


FIGURA 20: Árbol filogenético de las proteínas de tipo HD-Zip I.

El análisis se realizó utilizando el programa Clustal W a partir del alineamiento de las secuencias de los homeodominios de las proteínas.

Los números romanos indican los grupos monofiléticos definidos.