

la mayoría de los receptores de GAs ya estén saturados tanto en plantas salvajes como transformadas.

### **2.3.3.- Análisis del fenotipo de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas en respuesta a diferentes condiciones de iluminación.**

Luego de la germinación, las semillas de *Arabidopsis thaliana*, siguen un patrón de desarrollo determinado según estén cultivadas en luz o en oscuridad. Cuando crecen en oscuridad, el patrón se denomina “*skotomorfogénesis*” (o etiolado) y las plantas presentan un fenotipo que se caracteriza por el desarrollo de hipocótilos largos y cotiledones cerrados y protegidos por un gancho (“*hook*”) apical. Cuando crecen en presencia de luz, el patrón se denomina “*fotomorfogénesis*” (o de-etiolado) y las plantas presentan un fenotipo con hipocótilos cortos y cotiledones expandidos y verdes, aptos para la captación de la luz y la realización de la fotosíntesis (Sullivan y Deng, 2003). Cuando las plantas crecen en condiciones de menor intensidad lumínica que la necesaria para cada especie, presentan un fenotipo intermedio entre el fenotipo de etiolación y el de de-etiolación, en el que los hipocótilos son más largos y los cotiledones están apenas expandidos y presentan el color verde.

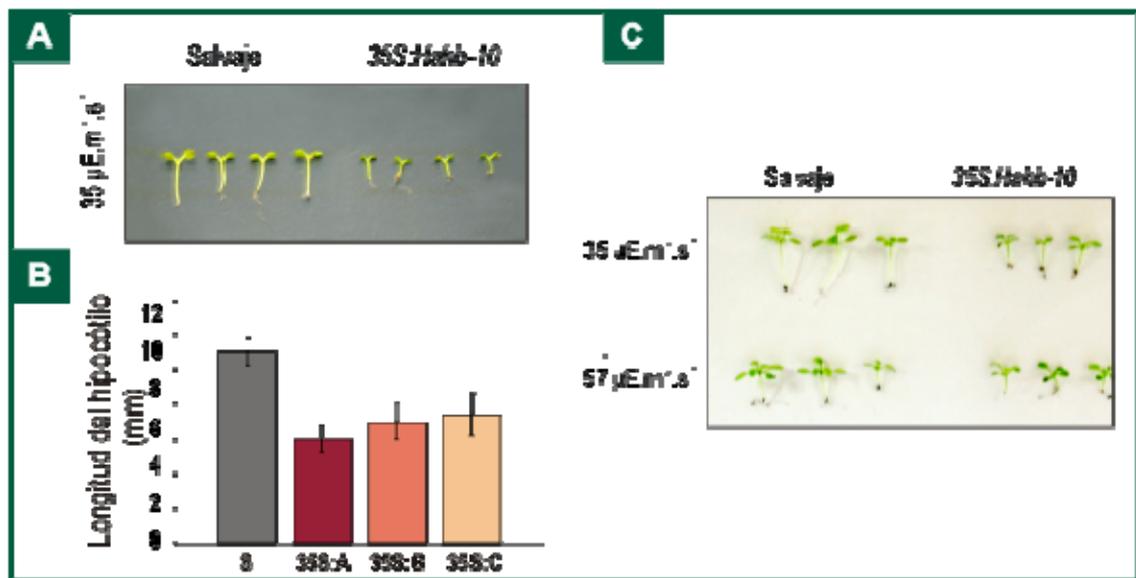
Las diferencias encontradas entre el fenotipo de las plantas que llevan la construcción *35S:HAHB10* y las plantas no transformadas crecidas en condiciones de cultivo normales, sugirieron que podrían estar alteradas las vías de respuestas a las condiciones de iluminación en el desarrollo vegetal. Para analizar este aspecto en profundidad, se realizaron diversos ensayos estudiando comparativamente el comportamiento en diferentes calidades e intensidades de luz.

La respuesta típica de las plantas cuando la iluminación es insuficiente o nula es la elongación del hipocótilo. Como puede observarse en la figura 52 - A, a bajas intensidades de iluminación ( $35 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) las plantas transgénicas muestran un

defecto en la elongación del hipocótilo. A los 15 días de edad, los hipocótilos de las plantas salvajes cultivadas con una intensidad de iluminación de  $35 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  miden en promedio  $11 \pm 0,6$  mm a diferencia de las plantas transgénicas que miden, en las mismas condiciones  $7 \pm 0,5$  mm (Figura 52 - B). Una intensidad de iluminación mayor a  $57 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  permite observar el mismo efecto aunque atenuado: la longitud del hipocótilo de las plantas salvajes es de  $4,2 \pm 0,3$  mm y  $3,1 \pm 0,3$  mm en promedio, la de las plantas que llevan el transgen *HAHB10* (Figura 52 – C).

Cuando las plantas se cultivan con distintas calidades de luz (ver Materiales y Métodos VI.1.2), también se encuentran diferencias fenotípicas. Si bien, la longitud de los hipocótilos de las plántulas transgénicas cultivadas en luz enriquecida en rojo o en azul es siempre menor que la de las salvajes, la mayor diferencia se observa cuando las plántulas son cultivadas con luz enriquecida en rojo-lejano. En este caso, las plantas transformadas presentan una longitud del hipocótilo 50 % menor comparada con las plantas salvajes crecidas en las mismas condiciones (Figura 53).

También se realizaron ensayos cultivando las plantas en condiciones etioladas y los resultados obtenidos muestran que las plantas transgénicas presentan una menor longitud del hipocótilo que las plantas salvajes en estas condiciones, lo que induce a pensar que los hipocótilos de las plantas transgénicas tienen menor número de células o bien células de menor tamaño (Figura 54). Por otra parte, las plantas transformadas con la construcción *35S:HAHB10* son más tolerantes cuando son

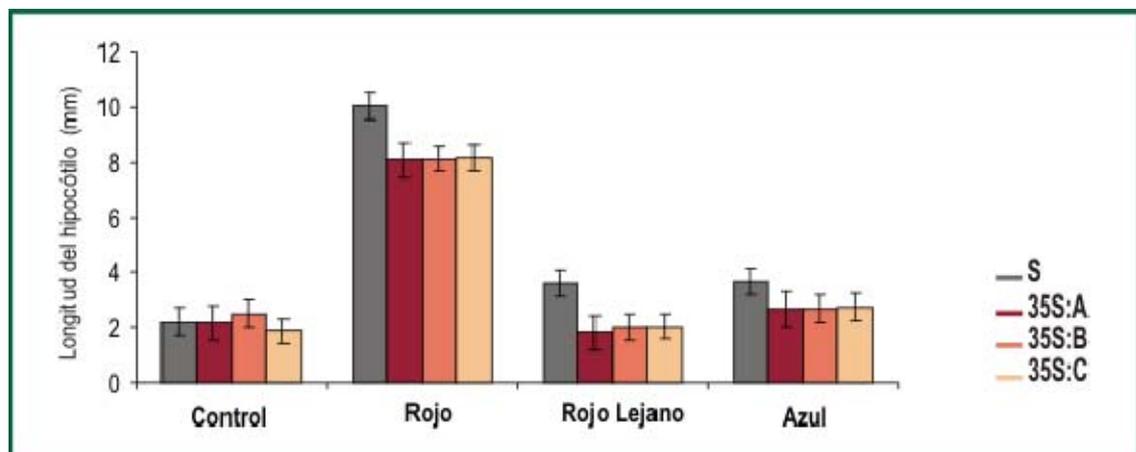


**FIGURA 52:** Las plantas transformadas con la construcción *35S:HAHB10* presentan una respuesta atenuada a la baja intensidad de la luz.

(A) Comparación entre fenotipos de plántulas de 7 días de edad salvajes y transformadas cultivadas con una intensidad lumínica de  $35 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ .

(B) Longitud del hipocótilo (expresada en mm) de plántulas de 7 días de edad, crecidas a  $35 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ . La longitud se midió con una regla y al experimento se realizó con 15 plántulas de cada genotipo.

(C) Comparación entre fenotipos de plántulas de 14 días de edad salvajes y transformadas



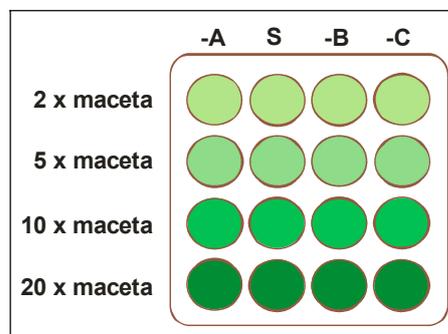
**FIGURA 53:** Las plantas transformadas con la construcción *35S:HAHB10* están menos afectadas por los cambios en la calidad de iluminación.

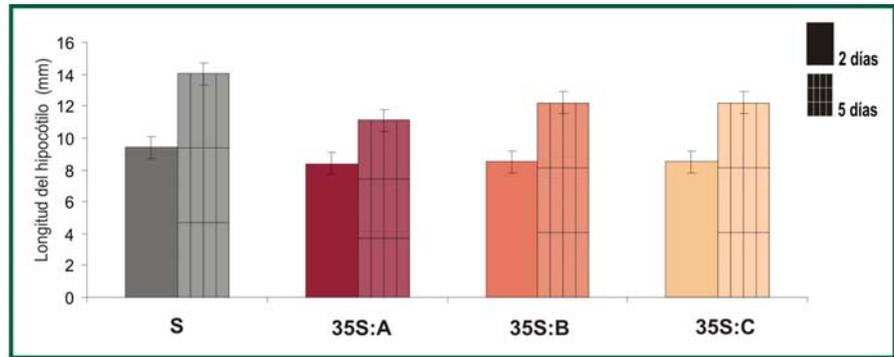
Longitud del hipocótilo de plántulas de 5 días crecidas en tierra bajo régimen de luz enriquecida en rojo, rojo lejano o azul. Experimento representativo realizado con plántulas de cada genotipo ( $n = 20$ ). Los controles son plántulas crecidas en condiciones normales descritas en Materiales y Métodos. Las condiciones de iluminación enriquecidas en las diferentes calidades de luz fueron obtenidas como se indica en Materiales y Métodos.

expuestas a períodos largos de etiolación. El porcentaje de plantas que sobrevive luego de 5 días de etiolación y 4 de recuperación en condiciones de cultivo estándar fue del 18 % para las plantas salvajes y del 75 % para las plantas transgénicas. Cuando el período de incubación en etiolación fue de 3 días, el porcentaje de plantas salvajes que sobreviven aumentó a un 37 %, mientras que el de las transgénicas se mantuvo en un 75 %.

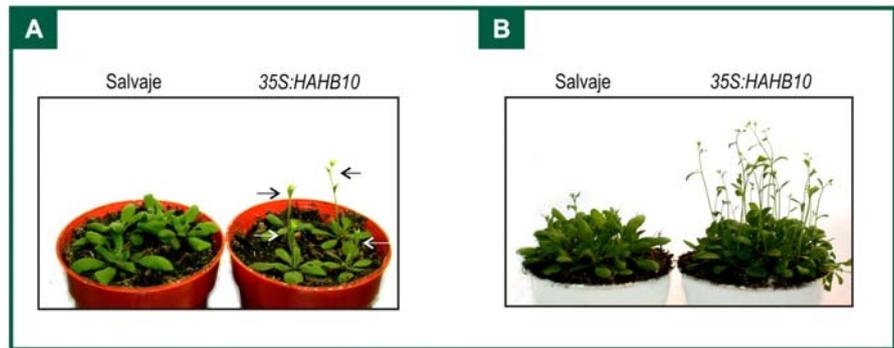
Cuando las plantas crecen en su ambiente natural, están en constante competencia por la luz con las plantas que crecen en su proximidad. Para soportar los cambios en la luz y continuar con su desarrollo, las plantas tratan de evitar la sombra a través de diversas estrategias como el alargamiento de los entrenudos, la reducción del número de ramas o del área foliar, entre otros, que se agrupan como mecanismos de “*shade avoidance*”. Las angiospermas presentan mecanismos sofisticados de *shade avoidance* que probablemente hayan contribuido a su éxito evolutivo (Smith y Whitelam, 1997). En este trabajo de Tesis se realizaron ensayos de crecimiento en condiciones de superpoblación con el objeto de evaluar la posible participación del gen *HAHB10* en las respuestas de *shade avoidance*.

Se cultivaron plantas en tierra en condiciones normales de crecimiento, sembradas de la siguiente manera:





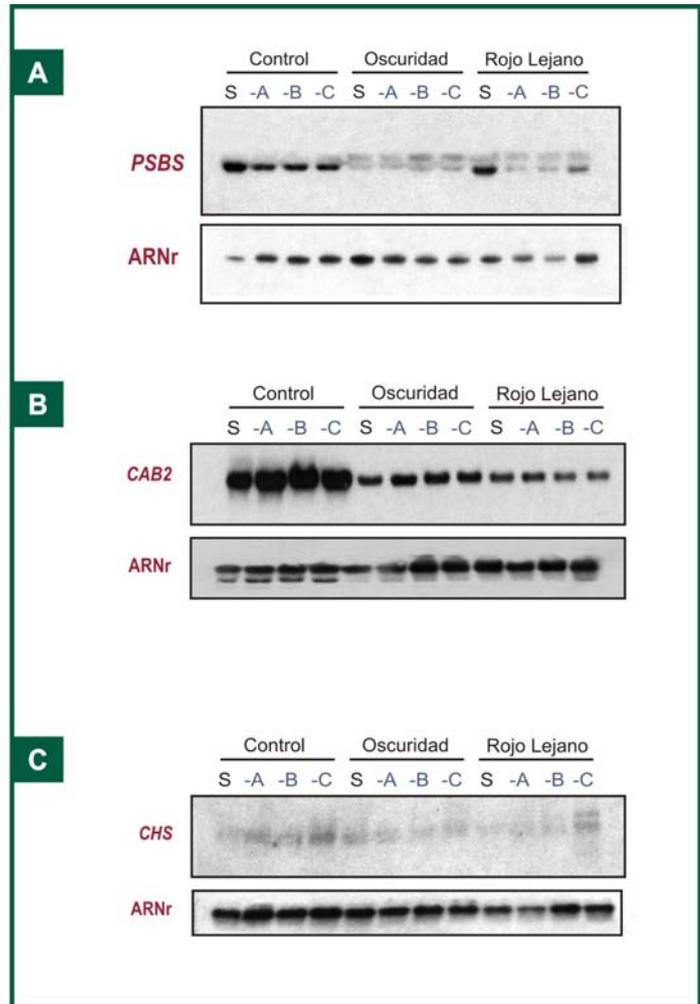
**FIGURA 54:** Las plantas transgénicas *35S:HAHB10* presentan una respuesta atenuada cuando son crecidas en condiciones etioladas.  
Longitud del hipocótilo de plántulas cultivadas en condiciones etioladas en cajas de Petri durante 2 o 5 días. La longitud se expresa en mm y para la medición, se utilizó una regla (n=15)



**FIGURA 55:** Las plantas transformadas con la construcción *35S:HAHB10* presentan una aceleración del desarrollo con respecto a las salvajes, incrementada cuando son cultivadas en condiciones de superpoblación.  
Comparación del desarrollo entre plantas salvajes y transformadas de 21 días de edad cultivadas en condiciones normales.  
(A) 4 plantas por cada maceta de 8 cm de diámetro.  
(B) 20 plantas por cada maceta de 8 cm de diámetro.

En estos ensayos se encontraron diferencias significativas entre los grupos que tenían 2, 5, 10 o 20 plantas por maceta. A medida que aumenta el número de plantas por maceta, se incrementa la diferencia en la velocidad del desarrollo entre las plantas transformadas y salvajes. (Figura 55). Esto significa que en condiciones limitantes de espacio, iluminación y/o nutrientes (superpoblación), las plantas que sobreexpresan el gen *HAHB10* muestran una respuesta diferente en los mecanismos de *shade avoidance* manteniendo su crecimiento, mientras que las plantas salvajes retrasan su desarrollo debido a la presencia de condiciones ambientales desfavorables.

Finalmente, para investigar los posibles mecanismos de acción del gen *HAHB10*, se analizó la expresión de algunos genes de *Arabidopsis thaliana* que están regulados por las condiciones de iluminación (Dae-Shilk y col., 2003) y que codifican proteínas asociadas al fotosistema II, como *CAB2* y *PSBS*. También se analizó la expresión del gen *CHS* que codifica una enzima que participa en la síntesis de flavonoides, pigmentos que participan en los mecanismos de resistencia de las plantas a la fotooxidación por luz UV. Se realizaron ensayos con plántulas salvajes y transformadas con la construcción *35S:HAHB10* crecidas en condiciones normales durante 4 días y colocadas luego en oscuridad o en luz enriquecida con rojo-lejano durante 4 horas. De estas plántulas se extrajo ARN total y se realizaron ensayos de *northern blot* donde se midieron los niveles de expresión de los genes mencionados con las sondas descritas en Materiales y Métodos (VI.5). Como se puede apreciar en la figura 56, los niveles de transcripto del gen *PSBS* ya sea en plántulas crecidas en condiciones normales o cultivadas con luz enriquecida en rojo-lejano, son mucho menores en las plantas que sobreexpresan el gen *HAHB10* de girasol. Cuando las



**FIGURA 56: El gen *PSBS* de *A. thaliana*, se expresa menos en las plantas transformadas con la construcción *35S:HAHB10*.**

Ensayo de *northern blot*. Se extrajo ARN total (10 µg) de plántulas salvajes o transformadas (líneas -A, -B y -C) que sobreexpresan la construcción *35S:HAHB10*. Las plántulas se cultivaron en condiciones normales durante 4 días (control) y luego fueron colocadas en oscuridad o rojo lejano durante 8 horas. Se utilizaron las sondas específicas para detectar la expresión de los genes *PSBS* (A), *CAB2* (B) y *CHS* (C) descritas en materiales y métodos (III.5). Los mismos filtros hibridados con las sondas específicas, luego se hibridaron con la sonda para ARN ribosomal (ARNr).

plántulas fueron colocadas en oscuridad los niveles de expresión de este gen fueron prácticamente indetectables mediante la técnica utilizada. Los otros dos genes estudiados (*CAB2* y *CHS*), no presentaron diferencias significativas en los niveles de expresión cuando se comparan las plantas salvajes y transformadas. Dado que la secuencia de unión *in vitro* del factor de transcripción HAHB10 al ADN [CAAT(C/G)ATTG (Tron y col., 2002)] no está presente en la región promotora del gen *PSBS* (3000 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción), *PSBS* sería un gen blanco indirecto de HAHB10. HAHB10 afectaría la/s cascada/s de transducción de señales involucrada/s en la regulación de la respuesta del gen *PSBS* a las diferentes condiciones de iluminación.

#### **2.3.4.- Análisis del fenotipo de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas en respuesta a tratamientos con metil viológeno.**

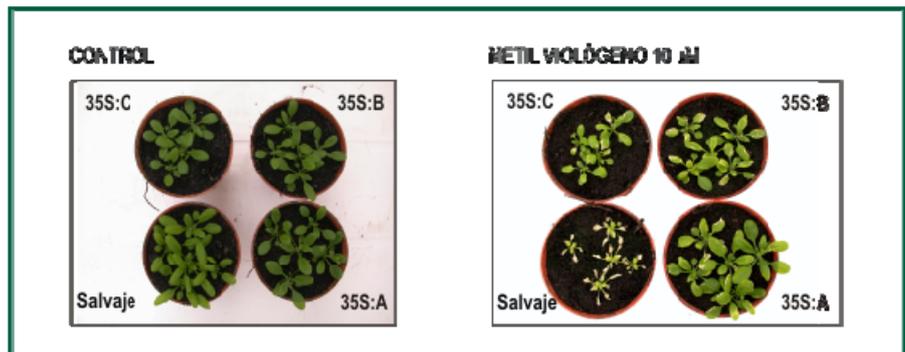
La alta irradiación de luz, la presencia de metales pesados o de herbicidas redox-cíclicos (paraquat) entre otros factores, provocan estrés oxidativo en las células, al producir la acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Sullivan y Deng, 2003).

Los herbicidas son sustancias químicas que ocasionan la muerte de las plantas o que inhiben su normal crecimiento. El *Paraquat* es un herbicida no selectivo de contacto cuya acción se ejerce en las áreas donde es aplicado. El principio activo del paraquat es el metil viológeno. Cuando se rocían plantas con el herbicida, éste entra en contacto con las porciones aéreas del vegetal generando radicales libres al aceptar electrones del fotosistema I y pasarlos al O<sub>2</sub>, con la concomitante formación del anión superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup> que es el causante del estrés oxidativo.

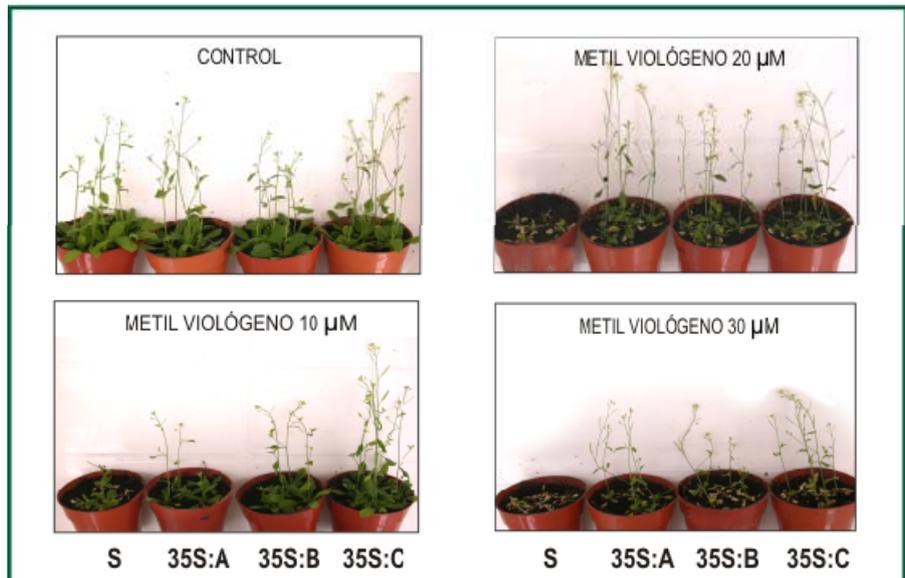
Los resultados experimentales obtenidos previamente en el laboratorio, sugirieron que las condiciones redox afectan la regulación de la actividad del gen *HAHB10* y de otros miembros de la subfamilia HD-Zip II (Tron y col., 2002).

Con el objeto de estudiar la respuesta de las plantas transgénicas al tratamiento con metil viológeno, se realizaron ensayos con plantas de 18 días de edad cultivadas en tierra en condiciones normales. Estas plantas se rociaron con soluciones de metil viológeno cuyas concentraciones fueron de 10, 20 y 30  $\mu\text{M}$ . Como se muestra en la figura 57, a las 48 horas del tratamiento con metil viológeno (10  $\mu\text{M}$ ) las plantas salvajes presentaron las hojas necrosadas, efecto típico del estrés oxidativo severo provocado por este compuesto. En la figura 58, se puede observar cómo las plantas que llevan la construcción *35S:HAHB10*, se recuperaron a los 10 días del tratamiento y presentan un desarrollo más avanzado que las salvajes. Además, las plantas salvajes mostraron signos de recuperación únicamente cuando fueron tratadas con metil viológeno 10  $\mu\text{M}$ . A mayores concentraciones no se observó recuperación.

Las membranas plasmáticas de las células vegetales son sensibles a los cambios ambientales que provocan estrés (frío, calor, estrés oxidativo, etc.) Estos cambios, alteran tanto la permeabilidad como la integridad de la membrana y provocan la liberación de los electrolitos contenidos en las células. Por este motivo, una de las formas de evaluar el daño celular, es comparando la conductividad eléctrica de las hojas en agua, ya que las células sanas mantienen los electrolitos en su interior,



**FIGURA 57:** Las plantas transformadas con la construcción *35S:HAHB10* son más tolerantes al tratamiento con metil viológeno. Se trataron plantas de 10 días de edad, salvajes y transformadas con la construcción *35S:HAHB10* con metil viológeno a una concentración  $10 \mu\text{M}$ . A la izquierda, se muestran los controles regados con agua, y a la derecha las plantas regadas con metil viológeno. Las fotos se tomaron a las 48 horas después de realizado el tratamiento.

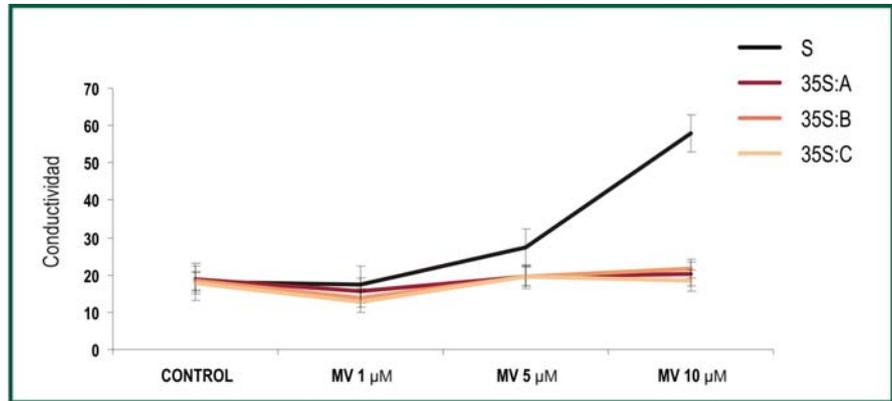


**FIGURA 58:** Las plantas transformadas con la construcción *35S:HAHB10* pueden recuperarse luego del tratamiento con metil viológeno. Se trataron plantas de 18 días de edad, salvajes y transformadas con la construcción *35S:HAHB10* con metil viológeno  $0$ ,  $20$  y  $30 \mu\text{M}$ . Los controles fueron regados con agua. Luego se dejaron crecer durante 10 días en condiciones estándar para evaluar la recuperación de las plantas.

mientras que las dañadas liberan los electrolitos en los tejidos circundantes y estos son liberados al agua (Campos y col., 2003; McNabb y Takahashi, 2000)

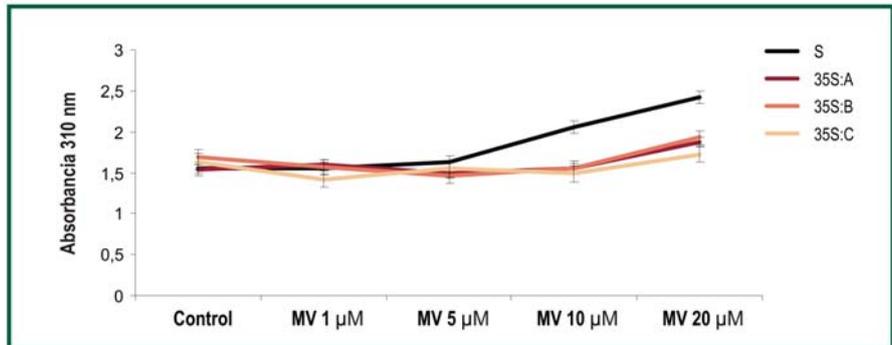
Con este objetivo, se realizaron ensayos según la metodología descrita por Sen Gupta y col. (1993), con modificaciones. Se trataron plantas de 18 días de edad con metil viológeno (1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) y luego las plantas se dejaron expuestas a la luz durante 24 horas. Se cortaron 10 discos de 0,5 cm de las hojas en roseta de cada una de las líneas estudiadas y se colocaron en 10 ml de agua bidestilada con agitación en luz, durante 24 horas. En la figura 59 se puede observar que las plantas transformadas con la construcción *35S:HAHB10* presentan menor conductividad, lo que indica menor daño celular luego de los tratamientos con metil viológeno.

Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos que tienen propiedades antioxidantes. La actividad antioxidante de los flavonoides *in vivo*, resulta de sus propiedades secuestradoras de radicales libres o de la inhibición de oxidasas, evitando la generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) como de hidroperóxidos orgánicos. También inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes. De esta forma los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de radicales libres y en la formación de los mismos (Groot y Rauen, 1998). La medición de la concentración de flavonoides en las plantas tratadas con Metil Viológeno indicó que las plantas salvajes presentaron una mayor concentración de los mismos (Figura 60). Esto sugiere que las plantas salvajes presentarían mayor cantidad de EROs, y consecuentemente, producirían más flavonoides para contrarrestar el efecto del herbicida.



**FIGURA 59: Las plantas transformadas con la construcción 35S:Hahb-10 sufren menor daño celular cuando son tratadas con metil viológeno.**

Se trataron plantas de 18 días de edad con metil viológeno a concentraciones de 1 µM, 5 µM y 10 µM. Se incubaron las plantas durante 24 horas en condiciones estándar y luego se cortaron 10 discos de 0,5 cm de diámetro de varias hojas de cada una de las líneas. Se colocaron en 10 ml de agua bidestilada y se incubaron en luz ( $60 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) con agitación (90 rpm) durante 24 horas más. Posteriormente se midió la conductividad del agua.



**FIGURA 60: Las plantas 35S:Hahb-10 tienen menor concentración de flavonoides que las salvajes cuando son tratadas con metil viológeno.**

Se trataron plantas de 18 días de edad con metil viológeno a concentraciones de 1, 5, 10 y 20 µM. Cuantificación de la concentración de flavonoides en plantas transformadas (35S:A, 35S:B y 35S:C) y no transformadas (descrito en Materiales y Métodos, VII.1.2). Los valores expresan µg de pigmento por 100 mg de tejido procesado. Se utilizaron 20 plantas de cada genotipo.

Para establecer un posible mecanismo de acción en la respuesta al estrés oxidativo en la que el gen *HAHB10* participaría, se midieron los niveles de expresión de algunos genes de *A. thaliana* (tabla 14), que pudieran ser blancos -directos o indirectos- del factor de transcripción HAHB10, con la técnica de PCR en Tiempo Real (ver Materiales y Métodos VI.8.4).

| Gen                                               | Clon N°   | Salvaje | 35S:HAHB10    |
|---------------------------------------------------|-----------|---------|---------------|
| <i>PR2</i><br>(Pathogenesis-related protein 2)    | At3g57260 | 1       | 2,35 (± 0,33) |
| <i>tAPX</i><br>(Thylacoidal ascorbate peroxidase) | At1g77490 | 1       | 3,75 (± 1,68) |

**Tabla 14: Genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo.**

Genes de *Arabidopsis thaliana* que pueden ser blanco de la proteína HAHB10.

El gen *PR2* (pathogenesis-related protein) y el gen *tAPX* mostraron niveles de transcripto aumentados en las plantas transgénicas cultivadas en condiciones normales, lo que explicaría una respuesta mas rápida al estrés oxidativo en estas plantas.

Se realizaron también tratamientos con el fin de caracterizar la respuesta al estrés oxidativo (exposición a cobre, hierro, NaCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SNP) pero no se encontraron diferencias de comportamiento entre plantas transformadas y plantas salvajes. Asimismo se realizaron ensayos para visualizar la acumulación del ion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en hojas según lo descrito por Jabs y col. (1996) y tampoco se encontraron diferencias entre plantas transgénicas y salvajes en las condiciones estudiadas.

## 2.4.- DISCUSIÓN.

El gen *HAHB10* codifica la proteína HAHB10 de 327 aminoácidos que contiene un homeodominio, un dominio de tipo cierre de leucinas y un motivo CPSCE adyacente al mismo (Gonzalez y col., 1997). Cuando se alinearon las secuencias del homeodominio de las proteínas HD-Zip II descritas hasta el momento (Schena y Davis, 1992; Söderman y col., 1994; Sessa y col., 1998; Gonzalez y Chan, 1993; Nishitani y col., 2001; Meijer y col., 2000; Sakakibara y col., 2001; Aso y col., 1999), pudo corroborarse que los miembros comparten un alto porcentaje de similitud entre ellos, característica de la subfamilia II (Chan y col., 1998). La proteína HAHB10 comparte la mayor similitud de secuencia con las proteínas HAHB9 (98,4 %), HAHB6 (86,7 %) y CPHB2 (88,3 %) que no han sido analizadas, desde el punto de vista funcional.

La construcción de la filogenia con el método de *Neighbour joining* (Holder y Lewis, 2003) permitió definir 9 subgrupos. HAHB10, pertenece al subgrupo II junto con HAHB6 y HAHB9 también de *H. annuus*, HAT22 y HAT9 de *Arabidopsis thaliana*, y CPHB2 de *C. plantigenium*.

La constitución de este subgrupo coincide plenamente con los estudios de filogenia realizados por Chan y col. (1998), Aso y col. (1999) y por Sakakibara y col. (2001). Sin embargo, a excepción del árbol construido por Chan y col. (1998), se presentan diferencias en la definición del resto de subgrupos inclusive entre los autores mencionados previamente. Es probable que los agrupamientos resulten distintos debido al método utilizado para el análisis, al número de secuencias utilizadas para el mismo, o también al hecho que los homeodominios son mucho más conservados en la subfamilia II y como resultado, se obtengan varias combinaciones

posibles. Las diferencias entre los otros subgrupos no serán discutidas en detalle en este trabajo de Tesis ya que escapa al objetivo de la misma.

Los estudios de expresión revelaron que los mayores niveles de expresión del gen *HAHB10* se observaron en hojas. Este hallazgo sugiere que *HAHB10* participaría en algún proceso relacionado con la fotosíntesis. Como además se demostró que el gen induce su expresión en plántulas etioladas, es probable que *HAHB10* esté involucrado en las vías de señalización vinculadas con las condiciones de iluminación en plántulas de girasol.

Comparando los estudios de expresión del gen *HAHB10* con los realizados de los miembros del subgrupo II vemos que no es posible establecer alguna relación funcional dado que hasta el momento, no se ha definido el patrón de expresión de los otros genes de *H. annuus*, *HAHB9* y *HAHB6*. Por este motivo, los estudios de expresión realizados en esta Tesis resultan novedosos dado que analizan el patrón de expresión de un gen de HD-Zip II de girasol. En cuanto a los genes de *Arabidopsis thaliana* del subgrupo II no hay información acerca del patrón de expresión de *HAT9* hasta el momento. Tampoco se ha definido el patrón de expresión en órganos del gen *HAT22*, pero se sabe a partir de aproximaciones experimentales realizadas con microarreglos, que su nivel de expresión aumenta rápidamente cuando se tratan plántulas de 5 días de edad con hormonas del grupo de las citoquininas y está incluido dentro del grupo de genes de respuesta rápida a las mismas (Brenner y col., 2005). El otro gen del subgrupo *CPHB2* de *C. plantigenium*, presenta un nivel de expresión bajo en hojas y raíces, que aumenta en dichos órganos cuando las plantas se someten a estrés hídrico o se tratan con la hormona ABA (Frank y col., 1998).

Si bien, la inducción de la expresión de *HAHB10* es muy fuerte en plántulas etioladas, no podemos obviar que el gen también se induce (en menor medida) cuando las plántulas fueron sometidas a otros tratamientos, como desecación. De esta

forma, *HAHB10* y *CPHB2* podrían responder al estrés hídrico aunque en diferentes órganos y/o estructuras.

De acuerdo con el relevamiento bibliográfico realizado, los genes HD-ZIP II de otras especies presentan patrones de expresión muy diversos, y de la mayoría de ellos no se sabe aún a qué factor ambiental responden. Sin embargo, el patrón de expresión del gen *ATHB2* de *Arabidopsis thaliana* se ha estudiado en detalle (Carabelli y col., 1993; Schena y col., 1993; Steindler y col., 1999) y podemos ver que se asemeja en algunos aspectos al del gen *HAHB10*. Ambos se expresan en niveles altos en las hojas de las plantas. *ATHB2* induce su expresión fuertemente en plántulas etioladas (Steindler y col., 1997) y en plantas incubadas en oscuridad (Carabelli y col., 1993), mientras que los niveles de mensajero del gen *HAHB10* aumentan en plántulas etioladas. Sin embargo no se debe descartar la posibilidad de que *HAHB10* pueda inducirse en plantas adultas colocadas en oscuridad, para lo cual se deben realizar nuevos ensayos que identifiquen si lo que regula la expresión del gen es la falta de luz o la condición de etiolación.

La caracterización funcional del gen *ATHB2* se realizó a partir del estudio de plantas que sobreexpresan o silencian el gen (Schena y col., 1993; Steindler y col., 1997; Steindler y col., 1999), y nuevamente, vemos algunas coincidencias con las plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas que sobreexpresan el gen *HAHB10*. Comparando con sus pares salvajes, ambos genotipos tienen cotiledones menos expandidos, raíces más pequeñas, hojas más oscuras y un ciclo de vida más corto. A diferencia de las plantas *35S:ATHB2* que tienen hipocótilos más largos, no presentan raíces secundarias y producen más semillas, las plantas *35S:HAHB10* tienen hipocótilos más cortos, raíces más cortas (con raíces secundarias) y no presentan diferencias en la producción de semillas, comparadas con las plantas salvajes. Los resultados obtenidos de los estudios funcionales de *ATHB2* muestran que el factor de transcripción que este gen codifica está involucrado en la regulación de la elongación y

en la proliferación celular, procesos claves del desarrollo. Los cambios morfológicos observados en las plantas que sobreexpresan el gen *HAHB10* permiten concluir que la proteína codificada también estaría involucrada en el control de la proliferación y de la elongación celular, más allá de las diferencias que presentan ambos genotipos transgénicos.

Se sabe también, que *ATHB2* es un regulador negativo de genes parálogos y que reconoce su región promotora reprimiendo su expresión (Steindler y col., 1999; Ohgishi y col., 2001). Lo mismo podría ocurrir con el gen *HAHB10*, que podría estar regulando negativamente al gen *ATHB2*. Sin embargo, los cambios observados en las plantas transgénicas se deben a los efectos de la sobreexpresión del gen *HAHB10* y no a la represión de la expresión del gen *ATHB2* dado que se realizaron ensayos de *northern blot* para medir los niveles de mensajero del mismo en plantas transformadas y salvajes, y ambos genotipos presentan el mismo nivel de expresión en condiciones normales. El hecho de que haya algunas coincidencias y algunas discrepancias en cuanto a los efectos de la sobreexpresión de *HAHB10* y *ATHB2* en las plantas de *Arabidopsis thaliana*, y sabiendo que ambos genes tienen en común el 43.5 % de la secuencia de aminoácidos, podemos concluir que si bien comparten algunas funciones, no serían ortólogos..

Las plantas que llevan la construcción *35S:HAHB10* florecen antes que las plantas salvajes cuando son cultivadas en condiciones normales. Este resultado induce a pensar que de alguna manera el factor de transcripción *HAHB10* podría afectar alguna/s vía/s de señalización involucrada/s en la floración.

La transición del estadio vegetativo al reproductivo es un proceso complejo que resulta de la integración de una intrincada red de señales reguladas por las condiciones ambientales y por el desarrollo vegetal. Ocurre en un punto determinado del ciclo de vida de las plantas, es raramente reversible y debe asegurar que la transición sea óptima para la polinización y la formación de las semillas que aseguren

el éxito reproductivo (Beweley y col., 2000). Se han realizado muchos estudios en *Arabidopsis thaliana* para discernir los componentes moleculares que participan en cada vía de señalización y se ha visto que muchas de las vías convergen y activan el mismo grupo de genes que luego van a promover la diferenciación del meristema floral (Mouradov y col., 2002).

El grupo de hormonas giberelinas (GAs) acelera la floración en *Arabidopsis thaliana*. Las GAs son además esenciales para el desarrollo de estambres y pétalos. Sabiendo que la expresión del gen *HAHB10* en plántulas de girasol aumenta cuando las mismas son tratadas con GA<sub>3</sub>, se estudió el efecto del agregado de esta hormona en las plantas transformadas. Los resultados mostraron que las plantas *35S:HAHB10* se comportan como si ya hubiesen sido tratadas con GA<sub>3</sub>, o bien, como si fueran insensibles a la misma dado que muchos receptores de GAs podrían estar saturados por una concentración endógena mayor de la hormona. Es posible especular entonces, que el gen *HAHB10* sería un regulador positivo de la biosíntesis de las giberelinas y explicaría el hecho de que las plantas transgénicas florecen antes que las salvajes. El comportamiento de las plantas *35S:HAHB10* tratadas con giberelinas se asemeja al de las plantas *35S:ATHB2* tratadas con auxinas (Morelli y Ruberti, 2002). La expresión de ambos genes es inducida por la hormona correspondiente, y las plantas que los sobreexpresan son insensibles al tratamiento con las mismas. Las plantas que sobreexpresan el gen *GA20OX*, que participa en la biosíntesis de GA (Huang y col., 1998) o *FLOWERING PROMOTIVE FACTOR1*, un gen involucrado en la traducción de la señal de GA (Kania y col., 1997), florecen antes que las salvajes. Otras aproximaciones experimentales han permitido identificar plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana*, que tienen la vía de biosíntesis de giberelinas alterada en algún punto y producen fenotipos diferentes. La mutante “*spindly*” exhibe una respuesta constitutiva a GA y también florece antes que las plantas salvajes, mientras que las

líneas mutantes deficientes en la biosíntesis de GAs, florecen tarde en relación con las plantas salvajes.

Otro factor que influye en el desarrollo de las plantas es la luz. Las plantas pueden medir y responder a los cambios en la irradiancia, calidad, orientación y periodicidad (duración del día) de la luz en el ambiente. La luz estimula la diferenciación de las hojas y de los cloroplastos, inhibe el crecimiento del hipocótilo, induce la expresión de genes nucleares y del cloroplasto y permite la transición del estado vegetativo al reproductivo (Chory, 1997). Los resultados obtenidos muestran que la expresión del gen *HAHB10* en girasol se regula por la luz y que las plantas de *Arabidopsis thaliana 35S:HAHB10* son hipersensibles a los cambios de luz tanto en calidad (rojo, rojo-lejano, azul) como en cantidad (distintas intensidades), dado que presentan una inhibición del crecimiento del hipocótilo. Esta respuesta sumada a las características fenotípicas de las plantas transgénicas (ángulo de expansión de cotiledones menor y mayor concentración de pigmentos en hojas) sugieren que el gen *HAHB10* podría estar implicado en alguna vía de transducción de señales regulada por los fitocromos que son las proteínas que regulan dichos cambios morfológicos. Según la respuesta a la luz R o RL, el fenotipo de las plantas que llevan la construcción *35S:HAHB10* se asemeja al de las plantas dobles mutantes *phyAphyB* dado que ambas, presentan una inhibición del crecimiento del hipocótilo en luz R y RL.

La aceleración de la floración que presentan las plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan el gen *HAHB10* es más pronunciada cuando se cultivan más plantas por maceta (mayor densidad) por lo que estarían mejor preparadas para competir por la luz y adaptadas para crecer en altas densidades dado que el desarrollo no se ve afectado como ocurre con las plantas salvajes. Como los fitocromos B, D y/o E de *Arabidopsis thaliana* son los que regulan las respuestas de *shade-avoidance* (Frankling y col., 2003), es probable que el gen *HAHB10* participe en alguna de las vías de señalización de los mismos.

Las plantas de girasol manifiestan una sensibilidad especial a la intensidad de la luz durante la época comprendida entre el comienzo de los primordios del capítulo hasta la formación de las tétradas del polen que, junto con el sombreado temporal de las plantas durante la formación del capítulo, determinan la reducción sustancial de la producción de aceite y aquenio. Los ensayos realizados con plantas de girasol mostraron que si éstas son sombreadas en los primeros estadios presentan alargamiento del tallo, reducción del área foliar y de la producción de grano y aceite (Andrade,1995). También fue demostrado que cuando las plantas de girasol se siembran dejando mayor distancia entre surcos, se obtiene un mayor rendimiento dado que el canopeo<sup>3</sup> lograba una mejor intercepción total de radiación generando plantas más voluminosas (López-Pereira y col., 2005). En este contexto, la caracterización funcional del factor de transcripción HAHB10 aporta nuevas evidencias al conocimiento de la respuesta de tolerancia a la mayor densidad de siembra, ya que este gen estaría involucrado en las respuestas a la sombra.

Según se ha visto en *Arabidopsis thaliana*, los fitocromos regulan varios genes que participan en el proceso de fotosíntesis (Kuno y col., 2000). El fitocromo A media las respuestas a luz de muy baja fluencia (“*very-low-fluence-responses*”, VLFR) e induce la producción de la proteína PSBS. Las condiciones de iluminación de baja fluencia pueden ser percibidas, por ejemplo, por las semillas que están en la tierra durante la germinación. La plántula que emerge necesita producir los componentes de los fotosistemas que le permitan capturar la energía que proviene de la luz y además las proteínas necesarias para proteger a la plántula del estrés que provoca el exceso de dicha energía. En las plantas *35S:HAHB10* se midieron los niveles de ARN mensajero de tres genes regulados por la luz y/o por los fitocromos -*CAB2*, *PSBS* y *CHS* (Ver descripción en Materiales y Métodos, III.5)-, en plántulas salvajes y transgénicas cultivadas en luz y luego colocadas en oscuridad o en luz enriquecida en

---

<sup>3</sup> Área foliar que capta la radiación

rojo-lejano. Los resultados mostraron que las plantas que llevan la construcción *35S:HAHB10* presentan una disminución en los niveles de mensajero del gen *PSBS* (los otros dos genes no presentaron diferencias en los niveles de transcritos). Esto indica que *HAHB10* regularía directa o indirectamente la expresión del gen *PSBS*. Como este último no presenta en su promotor la secuencia a la cual se une *in vitro* *HAHB10* es razonable pensar que se trata de un gen blanco indirecto.

La proteína *PSBS* integra el fotosistema II (*PSII*) y participa en el mecanismo de disipación de la energía no fotoquímica ("*non-photochemical quenching*", *NPQ*) que protege a las plantas del daño que provocaría el exceso de absorción de fotones (Li y col., 2000). El hecho de que las plantas *35S:HAHB10* presentan niveles de expresión del gen *PSBS* más bajos que las salvajes, es acorde también con el fenotipo de hipersensibilidad a la luz dado que, por tener menor cantidad de la proteína *PSBS*, serían más sensibles a la luz y por lo tanto es probable que la respuesta fotomorfogénica de inhibición del crecimiento del hipocótilo inducida por la luz ocurriría antes que en las salvajes.

Según lo expuesto, podemos especular que el gen *HAHB10* participa en las vías de señalización que promueven la floración, relacionadas con la calidad y/o cantidad de la luz y con las giberelinas (Figura 61). Sin embargo, no podemos descartar que *HAHB10* podría tal vez participar en otra/s vía/s que promueven la floración, como el fotoperíodo, la vernalización o la vía autónoma, ya que no se han hecho experimentos relacionados con estas vías en este trabajo de Tesis.

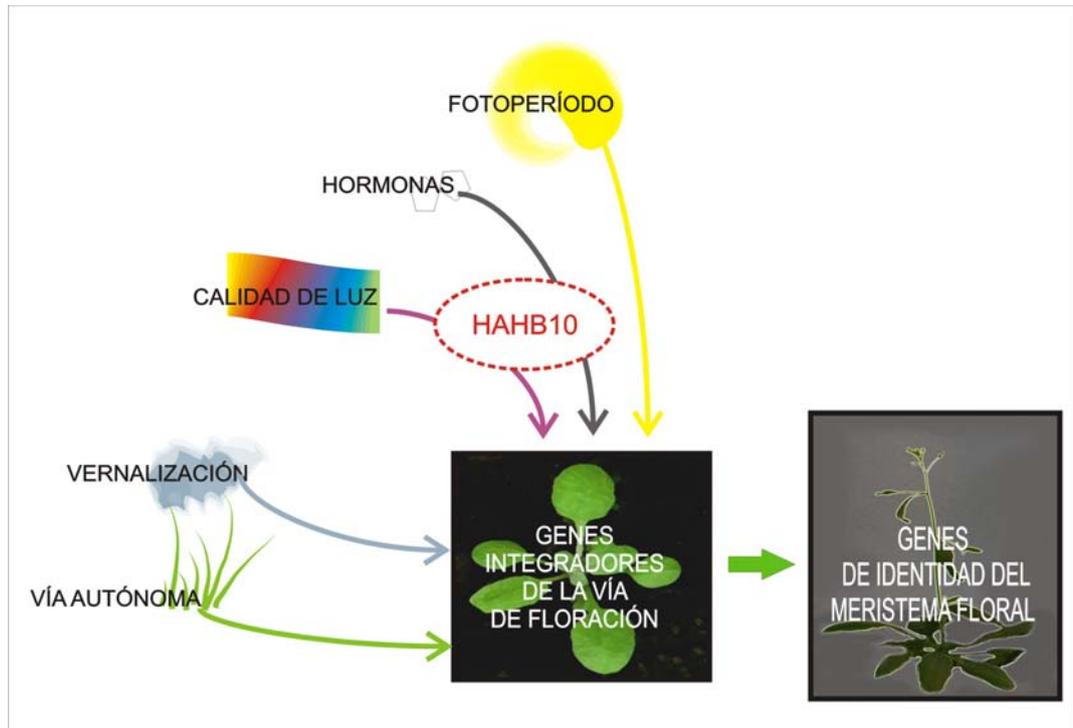
Las plantas transformadas con la construcción *35S:HAHB10* son más tolerantes a los tratamientos con metil viológeno en todas las condiciones ensayadas. Una explicación del mecanismo de tolerancia podría encontrarse en el fenotipo mismo de las plantas transgénicas: las plantas *35S:HAHB10* tienen mayor concentración de pigmentos, específicamente clorofilas y antocianinas.

Una correlación que surge inmediatamente es que por tener mayor concentración de clorofilas las plantas transgénicas presentarían mayor tasa de fotosíntesis. Aunque esto no ha sido demostrado, el hecho de que resistan el metil viológeno aporta un indicio de que podría ser así.

En cuanto a las antocianinas, se ha demostrado que los compuestos fenólicos participan en los mecanismos de protección frente al estrés oxidativo.

En maíz por ejemplo, la respuesta a la infección de patógenos es la acumulación de antocianinas alrededor del sitio de infección. Hipskind y col. (1996), sugieren que la acumulación del pigmento protege a las células vecinas a la infección de los cambios oxidativos que ocurren durante el mecanismo de defensa. Baker y col. (2002) mostraron que la producción de ciertos compuestos fenólicos es importante atenuando el daño oxidativo asociado con la expresión de la respuesta hipersensitiva de las plantas.

Los sistemas antioxidantes de los cloroplastos incluyen distintas enzimas que actúan sobre las especies reactivas del oxígeno (EROs) transformándolas en especies menos tóxicas o menos peligrosas, y tolerar de esta forma el estrés.



**Figura 61: Vías que regulan la transición del estado vegetativo al reproductivo en *Arabidopsis thaliana*.**

Se indican las vías que promueven la activación de los genes integradores de la vía de floración: el fotoperíodo, las hormonas, la vía autónoma y la vernalización. Se muestra en un círculo rojo, el factor de transcripción HAHB10 que participaría en las vías indicadas. Una vez que se inducida la expresión de los genes integradores de la vía de floración, éstos inducen la expresión de los genes de identidad del meristema floral y se produce la transición del estado vegetativo al reproductivo.

Las enzimas antioxidantes son componentes críticos para prevenir el estrés oxidativo y esta hipótesis está comprobada por los resultados obtenidos a partir de los estudios de la respuesta al estrés oxidativo (Allen, 1995). De hecho, varias líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana* resistentes al metil viológeno presentan alterados los niveles de una o varias de estas enzimas (Tsugane y col., 1999; Sunkar y col., 2003; Fujibe y col., 2004; Murgia y col., 2004; Overmeyer y col., 2005). En la búsqueda de un mecanismo molecular que explique la resistencia de las plantas *35S:HAHB10* al metil

viológeno se vio que en las plantas cultivadas en condiciones normales, las transgénicas mostraron niveles de mensajero más elevados de los genes *PR2* y *TAPX* que codifican una enzima relacionada con la defensa de patógenos y la ascorbato peroxidasa de la membrana tilacoidal respectivamente. Desafortunadamente, no pudieron medirse los niveles de ARN en las plantas tratadas debido a que no se pudo obtener ARN de buena calidad, requisito indispensable para la técnica utilizada. El análisis de los resultados, a pesar de esta dificultad técnica, nos permite sugerir que en la respuesta rápida de las plantas al estrés oxidativo generado por el metil viológeno, las plantas transgénicas están mejor preparadas para tolerar el estrés generado por el herbicida, lo que le daría una ventaja frente a las salvajes. Tanto *PR2* como *TAPX* no poseen en sus promotores el sitio de reconocimiento para la unión de la proteína HAHB10, por lo que serían genes regulados indirectamente. Hasta el momento se han descrito varias plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* que presentan resistencia al metil viológeno. La mutante *pst1* (Tsugane y col., 1999) posee además la capacidad de crecer en presencia de elevadas concentraciones de sal y es resistente a tratamientos con luz de elevada intensidad. En esta mutante, las actividades de las enzimas SOD y APX son 1.3 y 3 veces mayores respectivamente que en la planta salvaje. La mutante *rcd1-2* (Fujibe y col., 2004), que es tolerante a los tratamientos con luz UV-B exhibe niveles elevados de las enzimas SAPX y TAPX con respecto a las plantas salvajes. Por otro lado, la especie *Hordeum glaucum* (Lasat y col., 1997), presenta un biotipo resistente al metil viológeno, acumula mayor concentración del herbicida en las vacuolas de las células de las raíces, lo cual explicaría esta resistencia.

Las plantas *35S:HAHB10* presentan menores niveles del gen *PSBS*. Existen evidencias que demuestran que la mutante *npq4* de *Arabidopsis thaliana* que no expresa la proteína PSBS ni presenta modificados los parámetros que miden la captación de la luz o la fotosíntesis (Li y col., 2000). Cuando se incuban hojas de

plantas de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de estrés lumínico o de baja temperatura, *npq4* presenta una fotoinhibición de los centros de reacción del PSII que es transitoria y que no se continúa con la fotooxidación (Havaux y col., 2005). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el mecanismo de resistencia al metil viológeno no estaría relacionado, con la expresión de la proteína PSBS.

La obtención de cultivos resistentes a herbicidas ha sido lograda a través de procesos de selección o de generación de cultivos transgénicos y ha contribuido al avance del control químico de las malezas generando una nueva estrategia de manejo de las mismas. Los cultivos resistentes a herbicidas tienen la ventaja de permitir utilizar herbicidas no selectivos (paraquat, glifosato), reducir los daños al cultivo, presentar un menor costo. Las malezas controladas tienen bajo riesgo de adquirir resistencia y los herbicidas que se utilizan para estos cultivos tienen baja residualidad en suelos y aguas. Teniendo en cuenta esto, *HAHB10* sería un gen de interés biotecnológico.

Los resultados obtenidos, no permiten definir completamente los mecanismos de acción del gen *HAHB10* en las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* en cuanto a la aceleración del ciclo de vida y a la resistencia al metil viológeno. Se deberían realizar en el futuro, otros estudios con otras herramientas, como microarreglos de ADN que aporten más datos para poder dilucidarlos.



## **VIII.-Consideraciones Generales**

## **VIII.- CONSIDERACIONES GENERALES.**

En esta Tesis, se presentaron los primeros resultados obtenidos de la caracterización funcional de los factores de transcripción HAHB1 y HAHB10 de girasol. Los estudios de expresión conjuntamente con la caracterización funcional en plantas transgénicas, aportaron nuevos indicios en cuanto a las vías de señalización en las que participarían estas proteínas.

El girasol es una especie de interés económico y nuestro país es el primer exportador mundial de aceite con una participación del 60% en el mercado internacional (Díaz-Zorita y col., 2003). El grado de avance de los conocimientos públicos sobre el genoma de girasol es muy limitado comparado con el de otros cultivos. Se estima que el tamaño del genoma del girasol es de 3,5 Gpb (Gentzbittel y col., 2002). Son varios los grupos de investigación que trabajan para identificar rasgos relacionados con las características productivas de la especie como la concentración de aceite en las semillas, la morfología de la raíz, la resistencia al estrés salino e hídrico, la heterosis, el tiempo de floración, la composición de ácidos grasos y tocoferoles y la resistencia a enfermedades, entre otros. Así, la identificación de secuencias de girasol involucradas en la determinación de caracteres de importancia económica contribuiría con la elaboración de estrategias para la selección de germoplasma mejorado (Heinz y col., 2002). Desde este punto de vista nuestro trabajo enriquece el conocimiento de la genómica de esta especie. Pudimos comprobar que los genes caracterizados codifican proteínas asociadas con las vías que regulan el desarrollo del girasol y participan en vías relacionadas con la tolerancia/sensibilidad a distintos factores ambientales que causan estrés en las plantas.

El mejoramiento genético de las plantas contribuye a aumentar la eficiencia de la agricultura. Los rasgos mejorados incluyen la tolerancia a herbicidas y la resistencia a insectos. Si bien no existen aún en el mercado internacional plantas transgénicas de

girasol, dado que por un lado, no hay protocolos de transformación y por otro, no está permitido la siembra debido al posible cruzamiento con especies silvestres del género *Helianthus*, la caracterización de estos dos factores de transcripción podría aplicarse para otras especies de interés agronómico.

Los estudios de genómica funcional<sup>4</sup> de la última década, marcaron un importante progreso en los avances científicos en el área agronómica. El trabajo realizado en esta Tesis combinó la información obtenida de los estudios estructurales, funcionales en girasol y funcionales en un sistema heterólogo (*Arabidopsis thaliana*) para caracterizar los factores de transcripción HAHB1 y HAHB10 y los genes que los codifican. Los resultados obtenidos nos permiten postular a ambas proteínas como candidatas para ser utilizadas como marcadores moleculares, contribuyendo al conocimiento del genoma de la especie en si, y proveen nuevas herramientas para el uso biotecnológico en girasol o en otras especies.

---

<sup>4</sup> recolección sistemática de información sobre la función de los genes combinando diversas metodologías experimentales (Southan y col., 2007)



## **IX.-Conclusiones**

## IX.- CONCLUSIONES

- La proteína HAHB1 pertenece a la subfamilia I dentro de la familia HD-Zip, no es un miembro divergente de la misma, y comparte más del 80 % de la secuencia de los homeodominios con proteínas de la subfamilia de otras especies vegetales.
- El gen *HAHB1* se expresa principalmente en tallos de plantas jóvenes y en hojas de plantas adultas.
- La expresión del gen *HAHB1* en plántulas aumenta notoriamente cuando las mismas son tratadas con giberelinas, etileno o bien crecidas en condiciones de etiolación.
- La expresión del gen *HAHB1* aumenta cuando las plantas son tratadas con sal o frío.
- Las plantas transgénicas que expresan ectópicamente el gen *HAHB1* tienen un fenotipo que se caracteriza por un tamaño menor y un retraso en el tiempo de floración y desarrollo general. Estas características son fácilmente visualizables en condiciones de crecimiento normales.
- Las plantas transgénicas que expresan ectópicamente el gen *HAHB1* entran más tarde en el proceso de senescencia y presentan tallos de mayor longitud que las salvajes al finalizar el ciclo de vida.
- Las plantas transgénicas que expresan ectópicamente el gen *HAHB1* son más sensibles al estrés salino en estadios tempranos, hecho puesto en evidencia por un menor porcentaje de germinación y por una inhibición del crecimiento de las raíces en dichas condiciones.
- El factor de transcripción HAHB1 sería un regulador negativo del desarrollo en respuesta al estrés salino.

- La proteína HAHB10 pertenece a la subfamilia II, dentro de la familia HD-Zip, no es un miembro divergente de la misma, y comparte más del 80 % de la secuencia del homeodominio con dos proteínas de girasol y con otras proteínas de la subfamilia de otras especies.
- El gen *HAHB10* se expresa mayoritariamente en hojas de plantas adultas.
- La expresión del gen *HAHB10* en plántulas aumenta notoriamente cuando éstas son tratadas con giberelinas, etileno o crecidas en condiciones de etiolación.
- Las plantas transgénicas que expresan ectópicamente el gen *HAHB10* presentan un fenotipo particular cuando son cultivadas en condiciones normales: cotiledones y hojas de menor tamaño y de color verde más oscuro, raíces más cortas y una aceleración del ciclo de vida.
- Las plantas transgénicas que expresan ectópicamente el gen *HAHB10* son insensibles a los tratamientos con giberelinas.
- Las plantas transgénicas que expresan ectópicamente el gen *HAHB10* presentan fenotipos particulares cuando son cultivadas en distintas calidades o intensidades de iluminación.
- Las plantas transgénicas que expresan ectópicamente el gen *HAHB10* son más tolerantes al estrés provocado por el crecimiento prolongado en condiciones de etiolación.
- Las plantas transgénicas que expresan ectópicamente el gen *HAHB10* son más tolerantes al estrés provocado por el crecimiento en condiciones de superpoblación.
- Las plantas transgénicas que expresan ectópicamente el gen *HAHB10* son más tolerantes a los tratamientos con el herbicida paraquat.

- Las plantas transgénicas que expresan ectópicamente el gen *HAHB10* presentan modificados los niveles de expresión los genes *PSBS*, *APXt* y *PR2* en condiciones normales.
- El factor de transcripción *HAHB10* sería un regulador positivo del desarrollo cuya función estaría regulada por la luz y las giberelinas. A su vez estaría involucrado en los mecanismos de tolerancia al estrés oxidativo y en los mecanismos de *shade-avoidance*.
- El gen *HAHB10* o la proteína que el mismo codifica, podrían utilizarse como herramientas biotecnológicas.



## **X.- Referencias Bibliográficas**

## X.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Abe, M.; Takahashi, T.; Komeda, Y. (2001). Identification of a cis-regulatory element for L1-layer-specific gene expression which is targeted by an L1-specific homeodomain protein. *Plant J.* 26: 487 - 494.

Achard, P.; Laiao, L.; Jiang, C.; Desnos, T.; Dartlett, J.; Fu, X.; Harberd, N.P. (2007) DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiol.* 143: 1163 – 1172.

Agalou, A.; Purwantomo, S.; Overnäs, E.; Johannesson, H.; Zhu, X.; Estiati, A.; de Kam, R.J.; Engström, P.; Slamet-Loedin, I.H.; Zhu, Z.; Wang, M.; Xiong, L.; Meijer A.H.; Ouwerkerk, P.B. (2007). A genome-wide survey of HD-Zip genes in rice and analysis of drought-responsive family members. *Plant Mol. Biol.* 66: 87 - 103.

Aida, M.; Ishida, T.; Fukaki, H.; Fujisawa, H.; Tasaka, M. (1997). Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*, an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* 9: 841 - 857.

Altschul, S.F.; Madden, T.M.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389.

Allen, R.D. (1995). Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* 107: 1049 - 1054.

Al-Sady, B.; Kikis, E.A.; Monte, E.; Quail, P.H. (2008). Mechanistic duality of

transcription factor function in phytochrome signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 2232 – 2237.

Andrade, F.H. (1995). Analysis of growth and yield of maize, sunflower and soybean grown at Balcarce, Argentina. Field Crops Res. 41: 1-12.

Aoyama, T.; Dong, C.; Wu, Y.; Carabelli, M.; Sessa, G.; Ruberti, I.; Morelli, G.; Chua, N. (1995). Ectopic expression of the *Arabidopsis* transcriptional activator *Athb-1* alters leaf cell fate in tobacco. Plant Cell 7: 1773 – 1785.

Ariel, F.D.; Manavella, P.A.; Dezar, C.A.; Chan R.L. (2007). The true story of the HD-Zip family. Trends Plant Sci. 12: 419 – 426.

Aso, K.; Kato, M.; Banks, J.S.; Hasebe, M. (1999). Characterization of homeodomain-leucine zipper genes in the fern *Ceratopteris richardii* and the evolution of the homeodomain-leucine zipper gene family in vascular plants. Mol. Biol. Evol. 16: 544 – 551.

Aukerman, M.J.; Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2*-like target genes. Plant Cell 15: 2730 - 2741.

Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. (1983). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, N.Y.

Bagnall, D.J.; King, R.W.; Whitelam, G.C.; Boylan, M.T.; Wagner, D.; Quail. P.H.

(1995). Flowering responses to altered expression of phytochrome in mutants and transgenic lines of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 108: 1495 – 1503.

Baker, C.J.; O'Neil, N.R.; Deahl, K.; Lydon, J. (2002). Continuous production of extracellular antioxidants in suspension cells attenuates the oxidative burst detected in plant microbe interactions. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 641 – 644.

Ben-Naim, O.; Eshed, R.; Parnis, A., Teper-Bamnolker, P.; Shalit, A.; Coupland, G.; Samach, A.; Lifschitz, E. (2006). The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *Plant J.* 46: 462 – 476.

Bechtold, N.; Ellis, J.; Pelletier, G. (1993). *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences* 316:1194 –1199.

Beweley, J.D.; Hempel, F.D.; McCormick, S.; Zambryski, P. (2000). Chapter 19: Reproductive development. *Biochemistry and molecular biology of plants.* (Buchanam, B.; Grissem, W.; Jones, R. Eds.). American Society of Plant Physiologists. 989 - 1042.

Blázquez, M. A.; Weigel, D. (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* 404: 889 - 892.

Blazquez, M.A.; Green, R.; Nilsson, O.; Sussman, M.R.; Weigel, D. (1998). Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. *Plant Cell* 10: 791 – 800.

Boss, P.K.; Bastow, R.M.; Mylne, J.S.; Dean, C. (2004). Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell* 16: S18 - S31.

Boyes, D.C.; Zayed, A.M.; Ascenzi, R.; McCaskill, A.J.; Hoffman, N.E.; Davis, K.R.; Görlach, J. (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13:1499 - 1510

Brenner, W.G.; Romanov, G.A.; Köllmer, I.; Bürkle, L.; Schmülling, T. (2005) Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant J.* 44: 314 – 333.

Brown, D.E.; Rashotte, A.M.; Murphy, A.S.; Normanly, J.; Tague, B.W.; Peer, W.S.; Taiz, L.; Muday, G.K. (2001). Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 524 – 535.

Cai, X.; Ballif, J.; Endo, S.; Davis, E.; Liang, M.; Chen, D.; De Wald, D.; Kreps, J.; Zhu, T.; Wu, Y. (2007). A putative CAATT – binding transcription factor is a regulator of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 145: 98 – 105.

Campos, P.S.; Quartin, V.; Ramalho, J.C.; Nunes, M.A. (2003). Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *J. Plant Physiol.* 160: 283 - 292.

Carabelli, M.; Morelli, G.; Whitelam, G.; Ruberti, I. (1996). Twilight-zone and canopy

shade induction of the Athb-2 homeobox gene in green plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 3530 – 3535.

Carabelli, M.; Sessa, G.; Baima, S.; Morelli, G.; Ruberti, I. (1993). The *Arabidopsis* Athb-2 and Athb-4 genes are strongly induced by far-red-rich light. Plant J. 4: 469 – 479.

Carpenter, C.; Simon, A. (1998). Methods in Molecular Biology. Vol. 82. *Arabidopsis* Protocols Preparation of RNA. (Martinez-Zapater, J.M.; Salinas J. Eds.). Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

Carrillo, N.; Valle, E.M. (2003). El lado oscuro del oxígeno. Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal. <http://www.safv.com.ar/Carrillo%200305.pdf>.

Casal, J.J.; Frankhauser, C.; Coupland, G.; Blázquez, M.A. (2004). Signalling for developmental plasticity. Trends Plant Sci. 9: 309 - 314.

Casal, J.J.; Sanchez, R.A.; Botto, J.F. (1998). Modes of action of phytochromes. J. Exp. Bot. 49: 127 - 138.

Ceaglio, N. (2002). Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan el gen *HAHB10* de girasol. Tesina para optar al título de Licenciada en Biotecnología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Cerdan, P.D.; Chory J. (2003). Regulation of flowering time by light quality. Nature

423: 881 - 885.

Chan, R.L.; Gago, G.; Palena, C.; Gonzalez, D. (1998). Homeoboxes in plant development. *Biochim. Biophys. Acta* 1442: 1 - 19.

Chan, R.L.; Gonzalez, D.H. (1994). A cDNA encoding an HD-Zip protein from sunflower. *Plant Physiol.* 106: 1687 - 1688.

Cheng, X.F.; Wang, Z.Y. (2005). Overexpression of COL9, a CONSTANS-LIKE gene, delays flowering by reducing expression of CO and FT in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 43: 758 – 768.

Chory, J. (1997). Light modulation of vegetative development. *Plant Cell* 9: 1225 - 1234.

Clarke, J.H.; Dean, C. (1994). Mapping FRI, a locus controlling flowering time and vernalization response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 242: 81 - 89.

Clough, S.J.; Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735 - 743.

Comelli, R.N.; Gonzalez, D.H. (2007). Conserved homeodomain cysteines confer redox sensitivity and influence the DNA binding properties of plant class III HD-Zip proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 467: 41 – 47.

Dae-Shilk, C.; Sung-Hyun, H.; Hong-Gil, N.; Moon-Soo, S. (2003). FIN5 positively

regulates far-red light responses in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 44: 562 – 572.

De Lucas, M.; Davière, J.M.; Rodríguez-Falcón, M.; Pontín, M.; Iglesias-Pedraz J.M.; Lorrain, S.; Frankhauser, C.; Blázquez M.A.; Titarenko, E.; Prat, S. (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. Nature 451: 480 – 484.

Deblaere, R.; Bytebier, B.; De Greve, H.; Deboeck, F.; Schell, J.; Van Montagu, M. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. Nucleic Acids Res. 13: 4777 - 4788.

Deng, X.W.; Caspar, T.; Quail, P.H. (1991). COP1 - a regulatory locus involved in light – controlled development and gene - expression in *Arabidopsis*. Genes Dev. 5: 1172 – 1182

Dezar, C.A.; Gago, G.M.; Gonzalez, D.H.; Chan R.L. (2005). *Hahb-4*, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is a developmental regulator and confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants. Transgenic Res. 14: 429 – 440.

Díaz-Zorita, M.; Duarte, G.; Plante, E. (2003). El cultivo del girasol. Cuadernillo informativo N° 7. Asociación argentina de girasol (ASAGIR).  
[www.asagir.org.ar/Publicaciones/cuadernillo\\_web.pdf](http://www.asagir.org.ar/Publicaciones/cuadernillo_web.pdf)

Emery, J.F.; Floyd, S.K.; Alvarez, J.; Eshed, Y.; Hawker, N.P.; Izhaki, A.; Baum, S.F.; Bowman, J.L. (2003). Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and

KANADI genes. *Curr. Biol.* 13: 1768 - 1774.

Eulgem, T.; Rushton, P.J.; Robatzek, S.; Somssich, I.E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 5: 199 - 206.

Feng, S.; Martinez, C.; Gusmaroli, G.; Wang, Y.; Zhou, J.; Wang, F.; Chen, L.; Yu, L.; Iglesias-Pedraz, J.M.; Kircher, S.; Schäfer, E.; Fu, X.; Fan, L.M.; Deng, X-W. (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 451: 475 – 479.

Fleck, B.; Harberd N.P. (2002). Evidence that the *Arabidopsis* nuclear gibberellin signalling protein GAI is not destabilised by gibberellin. *Plant J.* 32: 935 – 947.

Frank, W.; Phillips, J.; Salamini, F.; Bartels, D. (1998). Two dehydration-inducible transcripts from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* encode interacting homeodomain-leucine zipper proteins. *Plant J.* 15: 413 – 421.

Franklin, K.A.; Praekelt, U.; Stoddart, W.M.; Billingham, O.E.; Halliday, K.J.; Whitelam, G.C. (2003). Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131: 1340 - 1346.

Franklin, K.A.; Whitelam, G.C. (2005). Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. *Ann. Bot. (Lond)* 96: 169 – 175.

Fujibe, T.; Saji, H.; Arakawa, K.; Yabe, N.; Takeuchi, Y.; Yamamoto, K.T. (2004). A methyl viologen-resistant mutant of *Arabidopsis*, which is allelic to ozone-sensitive

*rcd1*, is tolerant to supplemental ultraviolet-B irradiation. *Plant Physiol.* 134: 275 – 285.

Gago, G.M.; Almoguera, C.; Jordano, J.; Gonzalez, D.H.; Chan, R.L. (2002). Hahb-4, a homeobox-leucine zipper gene potentially involved in abscisic acid-dependent responses to water stress in sunflower. *Plant Cell Environ.* 25: 633 – 640.

Gehring, W.J.; Affolter, M.; Bürglin, T.R. (1994). Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 487 - 526.

Gendall, A.R.; Levy, Y.Y.; Wilson, A.; Dean, C. (2001). The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. *Cell* 107: 525 - 535.

Gentzbittel L. ; Abbott A. ; Galaud J.P. ; Georgi L. ; Fabre F. ; Liboz T. ; Alibert G. (2002). A bacterial artificial chromosome (BAC) library for sunflower, and identification of clones containing genes for putative transmembrane receptors. *Mol. Genet. Genomics* 266: 979 – 987.

Gonzalez, D.H.; Chan, R.L. (1993). Screening cDNA libraries by PCR using lambda sequencing primers and degenerate oligonucleotides. *Trends Genet.* 9: 231 - 232.

Gonzalez, D.H.; Valle, E. M.; Chan, R.L. (1997). Interaction between proteins containing homeodomains associated to leucine zippers from sunflower. *Biochim. Biophys. Acta* 1351: 137 – 149.

Greene R. (2002). Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. The Arabidopsis Book. (Somerville, C.R.; Meyerowitz, E.R. Eds.). American Society of Plant Biologists, Rockville. [www.aspb.org/publications/arabidopsis](http://www.aspb.org/publications/arabidopsis).

Groot, H.; Rauen, U. (1998). Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 3: 249

Guo, J.L.; Yang, Q.; Liang, F.; Xing, Y.J.; Wang, Z. (2007). Molecular cloning and expression analysis of a novel CONSTANS-like gene from potato. *Biochemistry* 72: 1241 – 1246.

Hall, T.C.; Ma, Y.; Buchbinder, B.U.; Pyne, J.W.; Sun, S.N.; Bliss, F.A. (1978). Messenger RNA for G1 protein of french bean seeds: Cell-free translation and product characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3196 - 3200.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557 - 580.

Hanson, J. (2000) Functional characterization of the pointed cotyledon subclass of HDZip genes in *Arabidopsis thaliana*. Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science and Technology.

[www.diva-portal.org/diva/getDocument?urn\\_nbn\\_se\\_uu\\_diva-1082-1\\_\\_fulltext.pdf](http://www.diva-portal.org/diva/getDocument?urn_nbn_se_uu_diva-1082-1__fulltext.pdf)

Hanson, J.; Johannesson, H.; Engström, P. (2001). Sugar-dependent alterations in cotyledon and leaf development in transgenic plants expressing the HD-Zip gene ATHB13. *Plant Mol. Biol.* 45: 247 - 262.

Hartmann, U.; Hohmann, S.; Nettekheim, K.; Wisman, E.; Saedler, H.; Huijser, P. (2000). Molecular cloning of SVP, a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* 21: 351 - 360.

Havaux, M.; Eymery, F.; Porfirova, S.; Rey P.; Dörmann P. (2005). Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17: 3451 – 3469.

Henriksson, E.; Olsson, A.S.B.; Johannesson, H.; Johansson, H.; Hanson, J.; Engstrom, P.; Soderman, E. (2005). Homeodomain leucine zipper class I genes in *Arabidopsis*. Expression patterns and phylogenetic relationships. *Plant Physiol.* 139: 509 - 518.

Heinz, R.; Paniego, N.; Guillin, E.; Lopez Bilbao, M.; Fernandez, P.; Fernandez, L.; Talia P.; Nishimakamasu, V.; Rivarola M.; Parodi, B.; Gilli J.; Rocco, M.; Poggio, L.; Hopp, E. (2002). Avances biotecnológicos en girasol y soja. *Idia XXI : revista de información sobre investigación y desarrollo agropecuario. INTA.* N° 3: 96 – 101.

Himmelbach, A.; Hoffmann, T.; Leube, M.; Hohener, B.; Grill, E. (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 21: 3029 - 3038.

Hipskind, J.; Wood, K.; Nicholson, R.L. (1996) Localized stimulation of anthocyanin accumulation and delineation of pathogen ingress in maize genetically resistant to *Bipolaris maydis* race. *Mol. Plant Pathol.* 49: 247 – 256.

Hiwatashi, Y.; Fukuda, H. (2000). Tissue-specific of mRNA for carrot homeobox genes, CHBs, in carrot somatic embryos. *Plant Cell Physiol.* 41: 639 - 643.

Hjellström, M.; Olsson, A.S.B.; Engström, P.; Söderman, E.M. (2003). Constitutive expression of the water deficit-inducible homeobox gene *ATHB7* in transgenic *Arabidopsis* causes a suppression of stem elongation growth. *Plant Cell Environ.* 26: 1127 - 1136.

Höfgen, R.; Willmitzer, L. (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformatio. *Nucleic Acids Res.* 16: 9977.

Holder M.; Lewis P.O. (2003). Phylogeny estimation: Traditional and Bayesian approaches. *Nat. Rev. Genet.* 4: 275 – 284.

Horton, P.; Ruban, A.V. (1992). Regulation of photosystem II. *Photosynthesis Res.* 34: 375 - 385.

Huang, S.; Raman, A.S.; Ream, J.E.; Fujiwara, H.; Cerny, R.E.; Brown, S.M. (1998). Overexpression of 20-oxidase confers a gibberellin-overproduction phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118: 773 - 781.

Jabs, T.; Dietrich, R.A.; Dangl, J.L. (1996). Initiation of Runaway Cell Death in an *Arabidopsis* Mutant by Extracellular Superoxide. *Science* 273: 5283 – 1853.

Jack, T. (2004). Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell* 16: S1

- S17.

Jang, S.; Marchal, V.; Panigrahi, K.C.S.; Wenkel, S.; Soppe, W.; Deng, X-W.; Valverde, F.; Coupland G. (2008). *Arabidopsis* COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *EMBO J.* 27: 1277 – 1288.

Jefferson, R.A.; Kavanagh, T.A.; Bevan, M.W. (1987). GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 20: 3901-3907.

Johannesson, H.; Wang, Y.; Hanson, J.; Engström, P. (2003). The *Arabidopsis thaliana* homeobox gene *ATHB5* is a potential regulator of abscisic acid responsiveness in developing seedlings. *Plant Mol. Biol.* 51: 719 – 729.

Kania, T.; Russenberger, D.; Peng, S.; Apel, K.; Melzer, S. (1997). FPF1 promotes flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9: 1327 - 1338.

Karpinski, S.; Reynolds, H.; Karpinska, B.; Winsgle, G.; Creissen, G.; Mullineaux, P. (1999). Systemic signalling and acclimation response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284: 654 - 657.

Kawahara, R.; Komamine, A.; Fukuda, H. (1995). Isolation and characterization of homeobox-containing genes of carrot. *Plant Mol. Biol.* 27: 155 – 164.

Kim, S.K.; Yun, C.H.; Lee, J.H.; Jang, Y.H.; Park, H.Y.; Kim, J.H. (2008). *OsCO3*, a CONSTANS-LIKE gene, controls flowering by negatively regulating the expression of FT-like genes under SD conditions in rice. *Planta* 228: 355 - 365.

Koornneef, M.; Alonso-Blanco, C.; Blankestijn - De Vries, H.; Hanhart, C.J.; Peeters, A.J. (1998). Genetic interactions among late-flowering mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* 148: 885 - 892.

Koornneef, M.; Hanhart, C.J.; Van der Veen, J.H. (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 229: 57 - 66.

Kuno, N.; Muramatsu, T.; Hamazato, F.; Furuya, M. (2000). Identification by large-scale screening of phytochrome-regulated genes in etiolated seedlings of *Arabidopsis* using a fluorescent differential display technique. *Plant Physiol.* 122: 15 – 24.

Langridge, J. (1957). Effect of day-length and gibberellic acid on the flowering of *Arabidopsis*. *Nature* 180: 36 - 37.

Lasat, M.M.; DiTomaso, J.M.; Hart, J.J.; Kochian, L.V. (1997) Evidence for vacuolar sequestration of paraquat in roots of a paraquat-resistant *Hordeum glaucum* biotype. *Physiol. Plant.* 99: 255 – 262.

Lee, Y.; Chun, J. (1998). A new homeodomain-leucine zipper gene from *Arabidopsis thaliana* induced by water stress and abscisic acid treatment. *Plant Mol. Biol.* 37: 377 - 384.

Leivar, P.; Monte, E.; Al-Sady, B.; Carle, C.M.; Storer, A.; Alonso, J.M.; Ecker, J.R.; Quail, P.H. (2008). The *Arabidopsis* phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating PHYB levels. *Plant Cell* 20: 337 – 352.

Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276: 565 - 570.

Li X.P.; Muller-Moule P.; Gilmore A.M.; Niyogi K.K. (2002). PsbS - dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99:15222 - 15227

Li, J.; Chory, J. (1998). *Methods in Molecular Biology. Arabidopsis Protocols* Preparation of DNA from *Arabidopsis*. (Martinez-Zapater, J.M.; Salinas J.). Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

Li, X.P.; Björkman, O.; Shih, C.; Grossman, A.R.; Rosenquist, M.; Jansson, S.; Niyogi, K.K. (2000). A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403: 391 - 395.

Li, X.P.; Müller-Moulé, P.; Gilmore, A.M.; Niyogi, K.K. (2002). PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15222 - 15227.

Lin, C. (2000). Photoreceptors and regulation of flowering time. *Plant Physiol.* 123: 39

- 50.

Lopato, S.; Bazanova, N.; Morran, S.; Milligan, A.S.; Shirley, N.; Langridge, P. (2006). Isolation of plant transcription factors using a modified yeast one-hybrid system. *Plant methods on line*. <http://www.plantmethods.com/content/2/1/3>

López-Pereira, N.; Trápani, G.; Piñeiro, A.; De la Vega, A.; Hall, J. (2005). La distancia entre surcos: ¿modifica el rendimiento del girasol?. III Congreso Argentino de Girasol. ASAGIR. [http://www.asagir.org.ar/2docongreso\\_murales.asp](http://www.asagir.org.ar/2docongreso_murales.asp)

Lorrain, S.; Allen, T.; Duek, P.D.; Whitelam, G.C.; Frankhauser, C. (2008). Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *Plant J.* 53: 312 – 323.

Manavella, P.A.; Arce, A.L.; Dezar, C.A.; Bitton, F.; Renou, J.P.; Crespi, M.; Chan, R.L. (2006). Cross-talk between ethylene and drought signalling pathways is mediated by the sunflower Hahb-4 transcription factor. *Plant J.* 48: 125 - 137.

Mancinelli, A. (1990). Interaction between light quality and light quantity in the photoregulation of anthocyanin production. *Plant Physiol.* 92: 1191 – 1195.

McGinnis, W.; Levine, M.S.; Hafen, E.; Kuroiwa, A.; Gehring, W.J. (1984). A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila Antennapedia* and *bithorax* complexes. *Nature* 308: 428 - 433.

McNabb, K.; Takahashi, E. (2000). Freeze damage to loblolly pine seedlings as

indicated by conductivity measurements and outplanting survival. Auburn University Southern Forest Nursery Management Cooperative. Forestry Abstracts: 62 <http://www.cabi.org/Pdf/SampleAbstractDatabases/38.pdf>

Meijer, A.H.; Scarpella, E.; Dijk, E.L.; Qin, L.; Taal, A.J.C.; Rueb, S.; Harrington, S.E.; McCouch, S.R.; Schilperoort, R.A.; Hoge, J.H.C. (1997). Transcriptional repression by Oshox1, a novel homeodomain leucine zipper protein from rice. *Plant J.* 11: 263 - 276.

Meijer, A.H.; de Kam R.J.; d'Erfurth, I.; Shen, W.; Hoge, J.H. (2000) HD-Zip proteins of families I and II from rice: interactions and functional properties. *Mol Gen Genet* 263: 12 – 21.

Meissner, R.; Theres, K. (1995). Isolation and characterization of tomato homeobox gene THOM1. *Planta* 195: 541 – 547.

Millar, A.J.; Kay, S.A. (1996). Integration of circadian and phototransduction pathways in the network controlling CAB gene transcription in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15491 – 15496.

Miller, T.A.; Muslin, E.H., Dorweiler, J.E. (2008). A maize CONSTANS-like gene, *conz1*, exhibits distinct diurnal expression patterns in varied photoperiods. *Planta* 227: 1377 – 1388.

Moon, J.; Suh, S.S.; Lee, H.; Choi, K.R.; Hong, C.B.; Paek, N.C.; Kim, S.G.; Lee, I. (2003). The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals

for flowering in *Arabidopsis*. Plant J. 35: 613 - 623.

Moon Y.H.; Choi, K.R; Kim, S.G., Han, T.J.; Cho, S.H.; Kim, W.T.; Lee, K.W. (1996). Isolation and characterization of three homeodomain-leucine zipper genes, Phz1, Phz2 and Phz4 from *Pimpinella brachycarpa* shoot tips. Mol. Cells 6: 697 – 703.

Morelli, G.; Ruberti, I. (2000). Shade avoidance responses. Driving auxin along lateral routes. Plant Physiol. 122: 621 – 626.

Morelli, G.; Ruberti, I. (2002). Light and shade in the photocontrol of *Arabidopsis* growth. Trends Plant Sci. 7: 399 – 404.

Mouradov, A.; Cremer, F.; Coupland, G. (2002). Control of flowering time, interacting pathways as a basis for diversity. Plant Cell 14: S111 - S130.

Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ. 25: 239 – 250.

Murgia, I.; Tarantino, D.; Vannini, C.; Bracale, M.; Carravieri, S.; Soave, C. (2004). *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. Plant J. 38: 940 - 953.

Nishitani, C.; Demura, T.; Fukuda, H. (2001). Primary phloem-specific expression of a *Zinnia elegans* homeobox gene. Plant Cell Physiol. 42: 1210 - 1218.

Niyogi, K.K.; Grossman, A.R.; Björkman, O. (1998). *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10: 1121 - 1134.

Niyogi, K.K.; Li, X-P.; Rosenberg, V.; Jung, H-S. (2004). Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *J. Exp. Bot.* 56: 375 - 382.

Ohashi-Ito, K.; Fukuda, H. (2003). HD-Zip III homeobox genes that include a novel member; *ZeHB-13 (Zinnia) / ATHB-15 (Arabidopsis)*, are involved in procambium and xylem cell differentiation. *Plant Cell Physiol.* 44: 1350 - 1358.

Ohgishi, M.; Oka, A.; Morelli, G.; Ruberti, I.; Aoyama, T. (2001). Negative autoregulation of the *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB-2*. *Plant J.* 25: 389 – 398.

Olsson, A.; Engström, P.; Söderman, E. (2004). The homeobox genes *ATHB12* and *ATHB7* encode potential regulators of growth in response to water deficit in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 55: 663 - 677.

Onouchi, H.; Igeno, M.I.; Perilleux, C.; Graves, K.; Coupland, G. (2000). Mutagenesis of plants overexpressing *CONSTANS* demonstrates novel interactions among *Arabidopsis* flowering-time genes. *Plant Cell* 12: 885 - 900.

Ooms, G.H.; Veen, R.; Beleen, P.; Regensburg-Tuik, J.; Schilperoort, R. (1982). Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the Ti-region. *Plasmid* 7: 15 - 29.

Otsuga, D.; De Guzman, B.; Prigge, M.J.; Drews, G.N.; Clark, S.E. (2001). REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant J.* 25: 223 - 236.

Overmeyer, K.; Tuominen, H.; Kettunen, R.; Betz, C.; Langebartels, C.; Sandermann, H.; Kangasjärvi, J. (2000). Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* 12: 1849 - 1862.

Overmyer, K.; Brosché, M.; Pellinen, R.; Kuittinen, T.; Tuominen, H.; Ahlfors, R.; Keinänen, M.; Saarma, M.; Scheel, D.; Kangasjärvi, J. (2005). Ozone-induced programmed cell death in the *Arabidopsis radical - induced cell death 1* mutant. *Plant Physiol.* 137:1092 - 1104.

Palena, C.; Gonzalez, D.; and Chan, R.L. (1999). A monomer-dimer equilibrium modulates the interaction of the sunflower homeodomain leucine-zipper protein Hahb-4 with DNA. *Biochem J.* 341: 81 – 87.

Pastori G.M.; Foyer C.H. (2002). Common components, networks and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol.* 129: 460 - 468.

Ponting, C.P.; Aravind, L. (1999). START, a lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins. *Trends Biochem. Sci.* 24: 130 - 132.

Price, R.A.; Palmer, J.D.; Al-Shehbaz, I.A. (1994). Systematic relationships of

*Arabidopsis*. A molecular and morphological perspective. In *Arabidopsis*. Meyerowitz, E.M.; Somerville, C.R., (Eds.) New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Putterill, J.; Robson, F.; Lee, K.; Simon, R.; Coupland G. (1995). The CONSTANS gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* 80: 847 - 857.

Quail, P.H. (1994). Phytochrome genes and their expression. Photomorphogenesis in plants. In, Kendrick, R.E.; Kronenberg G.H.M., (Eds.) Dordrecht, Kluwer.

Quail, P.H. (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 85 - 93.

Reed, J. W.; Nagatani, A.; Elich, T.; Fagan, M.; Chory, J. (1994). Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in *Arabidopsis* development. *Plant Physiol.* 104: 1139 - 1149.

Reeves, P.H.; Coupland, G. (2001). Analysis of flowering time control in *Arabidopsis* by comparison of double and triple mutants. *Plant Physiol.* 126: 1085 - 1091.

Riechmann, J.L.; Meyerowitz, E.M. (1998). The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol. Chem.* 379: 633 - 646.

Riechmann, J.L.; Heard, J.; Martin, G.; Reuber, L.; Jiang, C. (2000). *Arabidopsis* transcription factors, genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105 - 2110.

Rodríguez<sup>1</sup>, A.A.; Córdoba, A.R.; Ortega, L.; Taleisnik, E. (2004). Decreased reactive oxygen species concentration in the elongation zone contributes to the reduction in maize leaf growth under salinity. *J. Exp. Bot.* 55: 1383 – 1390.

Rodríguez<sup>2</sup>, A.A.; Ramiro Lescano, H.; Bustos, D.; Taleisnik, E. (2004). Salinity-induced decrease in NADPH oxidase activity in the maize leaf blade elongation zone. *J. Plant Physiol.* 164: 223 – 230.

Rodríguez, R.E.; Lodeyro, A.; Poli, H.O.; Zurbriggen, M.; Peisker, M.; Palatnik, J.R.; Tognetti, V.B.; Tschiersch, H.; Mohammad-Reza, H.; Valle, E.M.; Carrillo, N. (2007). Transgenic tobacco plants overexpressing chloroplastic Ferredoxin-NADP(H) reductase display normal rates of photosynthesis and increased tolerance to oxidative stress. *Plant Physiol.* 143: 639 – 649.

Roig-Villanova, I.; Bou J.; Sorin, C.; Devlin, P.F.; Martínez-García, J. (2006). Identification of primary target genes of phytochrome signaling. Early transcriptional control during shade avoidance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 141: 85 – 96.

Ruban, A.V.; Berera, R.; Iliaia, C.; Van Stokkum, I.H.M.; Kennis, J.T.M.; Pascal, A.A.; Van Amerongen, H.; Robert, B.; Horton, P.; Van Grondelle R. (2007). Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature* 450: 575 - 579.

Ruberti, I.; Sessa, G.; Lucchetti, S.; Morelli, G. (1991) A novel class of plant proteins

containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. *EMBO J.* 10: 1787 - 1791.

Ruiz-Garcia, L.; Madueno, F.; Wilkinson, M.; Haughn, G.; Salinas, J.; Martinez-Zapater, J.M. (1997). Different roles of flowering-time genes in the activation of floral initiation genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9: 1921 - 1934.

Sakakibara, K.; Nishiyama, T.; Kato, M.; Hasebe, M. (2001). Isolation of homeodomain–leucine zipper genes from the Moss *Physcomitrella patens* and the evolution of homeodomain–leucine zipper genes in land plants. *Mol. Biol. Evol.* 18:491 – 502.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Salter, M.G.; Franklin K.A.; Whitelam, G.C. (2003). Gating of the rapid shade - avoidance response by the circadian clock in plants. *Nature* 421: 680 – 683.

Sawa, S.; Ohgishi, M.; Goda, H.; Higuchi, K.; Shimada, Y.; Yoshida, S.; Koshida, T. (2002). The HAT2 gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in *Arabidopsis*. *Plant J.* 32: 1011 – 1022.

Schäfer, E.; Bowler, C. (2002). Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO Reports* 3: 1042 – 1048.

Schena, M.; Davis, R. (1992). HD-Zip proteins, members of an *Arabidopsis* homeodomain protein superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3894 - 3898.

Schena, M.; Lloyd, A.; Davis, R. (1993). The HAT4 gene of *Arabidopsis* encodes a developmental regulator. *Genes Dev.* 7: 367 - 379.

Schrick, K.; Nguyen, D.; Karlowski, W.M.; Mayer, K.F. (2004). START lipid/sterol-binding domains are amplified in plants and are predominantly associated with homeodomain transcription factors. *Genome Biol.* 5: 41.

Schwechheimer C. (2008). Understanding gibberellic acid signaling – Are we there yet? *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 9 – 15.

Sean Gupta, A.; Heinen, J.L.; Holaday, A.S.; Burke, J.J.; Allen, R.D. (1993) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1629 – 1633.

Sessa, G.; Carabelli, M.; Sassi, M.; Ciolfi, A.; Possenti, M.; Mittempergher, F.; Becker, J.; Morelli, G.; Ruberti, I. (2005). A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 19: 2811 – 2815.

Sessa, G.; Carbelli, M.; Ruberti, I. (1994). Identification of distinct families of HD-Zip proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular-Genetic Analysis of Plant Development and Metabolism*. Coruzzi, G.; Puigdomenech, H. (Eds.). Springer Verlag, Berlin.

Sessa, G.; Morelli, G.; Ruberti, I. (1997). DNA-binding specificity of the homeodomain-leucine zipper domain. *J. Mol. Biol.* 274: 303 - 309.

Sessa, G.; Steindler, C.; Morelli, G.; Ruberti, I. (1998). The *Arabidopsis* Athb-8; -9 and -14 genes are members of a small gene family coding for highly related HD-ZIP proteins. *Plant Mol. Biol.* 38: 609 - 622.

Shen, Y.; Khanna, R.; Carle, C.M.; Quail, P.H. (2007). Phytochrome induces rapid PIF5 phosphorylation and degradation in response to red-light activation. *Plant Physiol.* 145: 1043 – 1051.

Simpson, G.G.; Dijkwel, P.P.; Quesada, V.; Henderson, I.; Dean C. (2003). FY is an RNA 3' end-processing factor that interacts with FCA to control the *Arabidopsis* floral transition. *Cell* 113: 777 – 787.

Simpson, G. G.; Dean, C. (2002). *Arabidopsis*, the rosetta stone of flowering time?. *Science* 296: 285 – 289.

Smith, H. (1982). Light quality; photoperception and plant strategy. *Plant Physiol.* 33: 481 - 518.

Smith, H.; Whitelam, G.C. (1997). The shade avoidance syndrome, multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant Cell Environ.* 20: 840 – 844.

Söderman, E.; Hjellström M.; Fahleson J., Engström, P. (1999). The HD-Zip gene ATHB6 in *Arabidopsis* is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-

regulated by water deficit conditions. *Plant Mol. Biol.* 40:1073 – 1083.

Söderman, E., Mattsson, J., and Engström, P. (1996). The *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB-7* is induced by water deficit and by abscisic acid. *Plant J.* 10, 375-381.

Söderman, E.; Mattsson, J.; Svenson, M.; Borkird, C.; Engstrom, P. (1994). Expression patterns of novel genes encoding homeodomain leucine-zipper proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 26: 145 - 154.

Southan, C.; Magnus, U.; Barnes, M.R. (2007). A Bioinformatics Perspective on Genetics in Drug Discovery and Development. *Bioinformatics for Geneticists* (Barnes, M. Ed.) Bioinformatics, GlaxoSmithKline Pharmaceuticals, Harlow, Essex, UK

Steindler, C.; Carabelli, M.; Borello, U.; Morelli, G.; Ruberti, I. (1997). Phytochrome A, phytochrome B and other phytochrome (s) regulate *ATHB-2* gene expression in etiolated and green *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Environ.* 20: 759 – 763.

Steindler, C.; Matteucci, A.; Sessa, G.; Weimar, T.; Ohgishi, M.; Aoyama, T.; Morelli, G.; Ruberti, I. (1999). Shade avoidance responses are mediated by the *ATHB-2* HD-Zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development* 126: 4235 – 4245.

Suárez-López, P.; Wheatley, K.; Robson, F.; Onouchi, H.; Valverde, F.; Coupland, G. (2001). *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410: 1116 – 1120.

Sullivan, J.A.; Deng, X.W. (2003) From seed to seed: the role of photoreceptors in

*Arabidopsis* development. Dev. Biol. 260 : 289 – 297.

Sun, T.P.; Kamiya, Y. (1994). The *Arabidopsis ga1* locus encodes the cyclase entkaurene synthetase-A of gibberellin biosynthesis. Plant Cell 6: 1509 – 1518.

Sung, S.; Amasino, R.M. (2004). Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. Nature 427: 159 - 164.

Sunkar, R.; Bartels, D.; Kirch, H.H. (2003). Improved abiotic stress tolerance of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing a stress-inducible aldehyde dehydrogenase. Plant J. 35: 452 - 464.

Taiz, L.; Zeiger, E. (2002)<sup>1</sup>. Chapter 16: Growth and development.. Plant physiology. 3<sup>rd</sup> Ed. Sinauer Associates; Inc. 339 – 340

Taiz, L.; Zeiger, E. (2002)<sup>2</sup>. Chapter 7: Photosynthesis: the light reactions. Plant physiology. 3<sup>rd</sup> Ed. Sinauer Associates; Inc.126.

Thain, S.C.; Murtas, G.; Lynn, J. R.; McGrath, R.B.; Millar, A.J. (2002). The circadian clock that controls gene expression in *Arabidopsis* is tissue specific. Plant physiol. 130: 102 - 110.

Tron, A.E.; Bertoncini C.W.; Chan R.L.; Gonzalez D.H. (2002). Redox regulation of plant homeodomain transcription factors. J. Biol. Chem. 277: 34800 - 34807.

Tron, A.E.; Bertoncini, C.W.; Palena, C.M.; Chan, R.L.; Gonzalez, D.H. (2001).

Combinatorial interactions of two amino acids with a single base pair define target site specificity in plant dimeric homeodomain proteins. *Nucleic Acids Res.* 29: 4866 - 4872.

Tsugane, K.; Kobayashi, K.; Niwa, Y.; Ohba, Y.; Wada, K.; Kobayashi, H. (1999). A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell* 11: 1195 - 1206.

Wang, Y.; Henriksson, E.; Söderman, E.; Henriksson, K.N.; Sundberg, E.; Engström, P. (2003). The *Arabidopsis* homeobox gene, *ATHB16*, regulates leaf development and the sensitivity to photoperiod in *Arabidopsis*. *Dev. Biol.* 264: 228 – 239.

Wenkel, S.; Turck, F.; Singer, K.; Gissot, L.; Le Gourrierc, J.; Samach, A.; Coupland, G. (2006). *CONSTANS* and the CCAAT Box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 2971 - 2984.

Whatley, F.R.; Arnon, D.I. (1963). Photosynthetic phosphorylation in plants. *Methods Enzymol.* 6: 308 – 313.

Xu, Y.L.; Li, L.; Wu, K.Q.; Peeters, A.J.M.; Gage, D.A.; Zeevaart, J.A.D. (1995). The *ga5* locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase-molecular cloning and functional expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6640 - 6644.

Yanovsky, M.J.; Casal, J.J.; Whitelam, G.C. (1995). Phytochrome A, phytochrome B

and HY4 are involved in hypocotyl growth responses to natural radiation in *Arabidopsis*, weak de-etiolation of the *phyA* mutant under dense canopies. *Plant Cell Environ.* 18: 788 – 794.

Yanovsky, M.J.; Kay S.A. (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* 419: 308 – 312.

Zhong, R.; Ye, Z-H. (1999). IFL1, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in *Arabidopsis*, encodes a homeodomain-leucine zipper protein. *Plant Cell* 11: 2139 – 2152.

Zobell, O.; Coupland G.; Reiss B. (2005). The family of CONSTANS-like genes in *Physcomitrella patens*. *Plant Biol.* 7: 266 – 275.