

PROTEÍNA	SIMILITUD
ATHB3	85 %
ATHB13	95 %
ATHB23	82 %
ATHB20	80 %
CHB2	82 %
CHB4	83 %
TAHDZIPI-2	87 %
OSHOX21	92 %
OSHOX23	85 %

Tabla 10: Porcentaje de similitud de las secuencias de los homeodominios de las proteínas indicadas con respecto a la secuencia del homeodominio de la proteína HAHB1

1.1.3.- El gen *HAHB1* presenta un intrón en una posición atípica.

Existen diferentes tipos de organización intrón/exón dentro de los genes que codifican proteínas de tipo HD-Zip en *Arabidopsis thaliana*. De acuerdo con ello, los genes aislados de la subfamilia I de *Arabidopsis thaliana* se diferencian, entre otras cosas, de los de la subfamilia II, en que no presentan intrones en la región que codifica las hélices 2 y 3 del homeodominio. En esta subfamilia, los intrones se presentan en la región que codifica la hélice 1 y dentro de la secuencia que codifica el motivo de cierre de leucinas (Henriksson y col., 2005).

Durante la realización de esta Tesis, se clonó la secuencia de un intrón del gen *HAB1* de girasol, utilizando los oligonucleótidos Tal 3 y Tal 5 (ver Materiales y Métodos, III.5) sobre ADN genómico. En la figura 21-A, se muestra la secuencia obtenida del mismo y en la figura 21-B su ubicación en la región codificante del gen. El

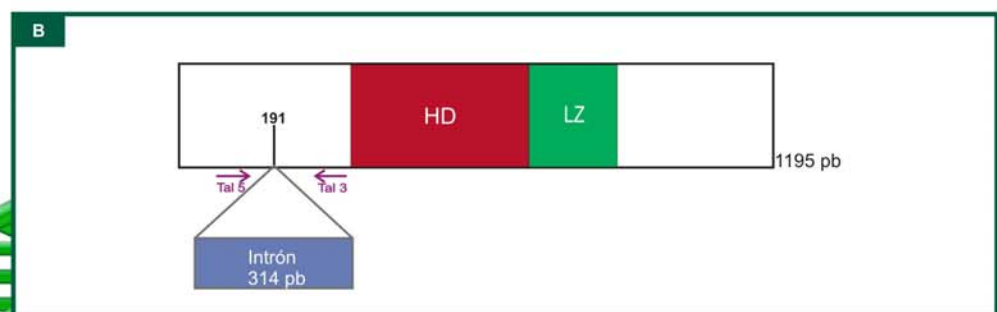


FIGURA 21: Intrón del gen HAHB1

A) Secuencia de un intrón del gen *HAHB1*. En color negro, se muestran los nucleótidos de la región codificante. En color azul, la secuencia obtenida del intrón a partir de la amplificación de ADN genómico con los oligos Tal 3 y Tal 5 (indicados en color violeta).
 B) Posición del intrón dentro del gen. HD = homeodominio. LZ = cierre de Leucinas.



intrón aislado tiene una longitud de 315 pb y está ubicado en el extremo 5' del gen, fuera de la región del homeodominio. Esta ubicación es atípica y no ha sido descrita, en los miembros HD-ZIP I de *Arabidopsis thaliana*.

1.2- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *HAHB1*.

Los genes de la subfamilia HD-Zip I de *Arabidopsis thaliana* y otras especies descritos hasta el momento presentan patrones de expresión heterogéneos. Algunos de ellos, a pesar de expresarse en distintos estadios de desarrollo y/o tejidos estarían involucrados en procesos celulares similares (Henriksson y col., 2005).

Uno de los objetivos planteados en este trabajo de Tesis fue el de dilucidar la función del gen *HAHB1*. Para lograrlo, el primer paso fue establecer el patrón de expresión e identificar cuáles son los factores ambientales, hormonales y/o nutricionales que regulan dicho patrón.

En este punto del capítulo, se describen los experimentos realizados con este fin, estableciendo una primera aproximación para comprender el papel que desempeña el producto de este gen en la regulación del desarrollo de la planta de girasol en respuesta a factores externos.

1.2.1.- Niveles de expresión del gen *HAHB1* en órganos y tejidos de girasol.

Se analizaron los niveles del transcrito en estado estacionario en los distintos órganos y tejidos de la planta, durante distintos estadios de desarrollo. Se extrajo ARN total de cada órgano o tejido en estudio y se analizaron los transcritos con la técnica de *northern blot*. La membrana fue hibridizada con la sonda específica (*HAHB1*, ver

EXPRESIÓN DEL GEN *HAHB1* EN DISTINTOS ESTADIOS DE DESARROLLO.

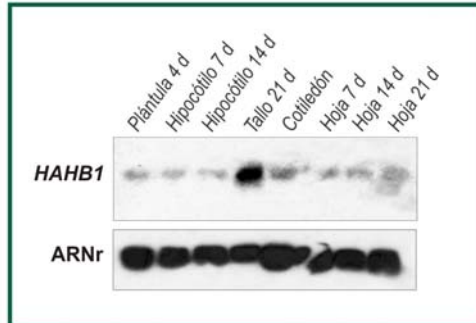


FIGURA 22: Expresión del gen *HAHB1* en estadios tempranos del desarrollo de girasol.

Ensayo de *northern blot* (A). Se sembraron 20 µg de ARN de: plántulas de 4 días de edad, hipocótilos de 7 y 14 días, tallos de 21 días, cotiledones y hojas de 7, 14 y 21 días. El panel superior muestra la membrana hibridizada con la sonda *Hahb-1*. El panel inferior, muestra la misma membrana hibridizada con la sonda para ARN ribosomal.

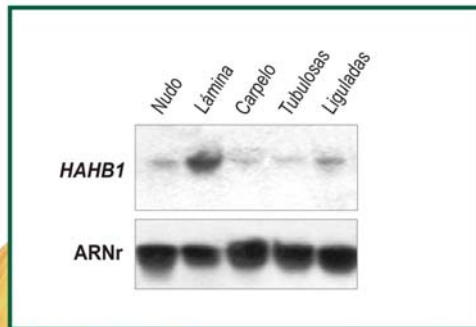


FIGURA 23: Expresión del gen *HAHB1* en algunos órganos o tejidos de plantas adultas de girasol.

Ensayo de *northern blot* (A). Se sembraron 20 µg de ARN de plantas de 90 días de girasol de: nudo, lámina de hoja, carpelos, flores tubulosas y flores liguladas. El panel superior muestra la membrana hibridizada con la sonda *Hahb-1* y el panel inferior, muestra la misma membrana hibridizada con la sonda para ARN ribosomal.



VII.5, Tabla 9) y luego con una sonda para detectar ARNs ribosomales (ARNr) de *Vicia faba*, con el objeto de controlar la similitud entre las cantidades de ARN sembradas y transferidas de cada muestra.

En la figura 22 se observa que en un estadio de desarrollo temprano, el gen *HAHB1* se expresa principalmente en tallos de 21 días de edad. Los demás tejidos u órganos analizados (hojas jóvenes, hipocótilos y cotiledones) presentan niveles de expresión bajos, aunque detectables por la técnica utilizada.

En la figura 23 se muestran los niveles de expresión del gen en tejidos y órganos de plantas de 90 días de edad, incluyendo algunas estructuras reproductivas. El mayor nivel de expresión se detecta en láminas de hojas. En el nudo y en las estructuras florales (carpelos, flores liguladas y tubulosas) los niveles de expresión son bajos.

El patrón de expresión observado sugiere que la función del gen podría estar relacionada con algunas vías de señalización en los tejidos fotosintéticos en el estadio adulto de la planta y/o con algún proceso de transporte o de desarrollo que ocurra en el tallo.

1.2.2.- Regulación de la expresión del gen *HAHB1* por factores ambientales.

Dado que *HAHB1* pertenece a la familia HD-Zip, y los miembros de esta familia hasta donde se conoce actualmente, están involucrados en procesos del desarrollo vegetal regulados por factores externos u hormonas, se analizaron los cambios que podrían presentarse en el patrón de expresión estudiando el efecto de factores externos. Como se muestra en la figura 24, no hay cambios significativos en el nivel de

EXPRESIÓN DEL GEN *HAHB1* EN PLÁNTULAS SOMETIDAS A DISTINTOS EFECTORES AMBIENTALES.

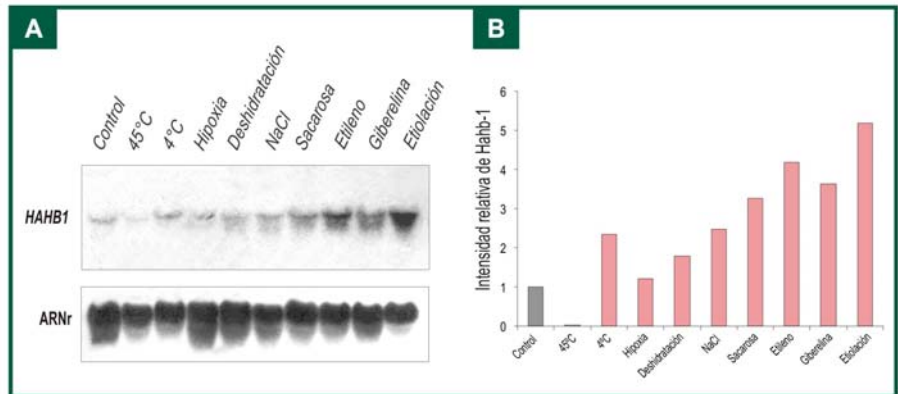


FIGURA 24: Variación de la expresión del gen *HAHB1* por efectores ambientales. Ensayo de *northern blot* (A). Se sembraron 20 µg de ARN total extraído de plántulas de 7 días de edad sometidas a distintos tratamientos. En todos los casos los tiempos de incubación fueron de 2 horas con excepción de las plántulas etioladas, que germinaron y se mantuvieron durante 4 días en oscuridad antes de ser procesadas. En el panel superior se muestra la membrana hibridizada con la sonda Hahb-1 y en el panel inferior, se muestra la misma membrana hibridizada con la sonda para ARN ribosomal. (B) Intensidades relativas cuantificadas con el programa *Image Pro Plus* con respecto al control tomado arbitrariamente como 1.

INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *HAHB1* POR ESTRÉS SALINO.

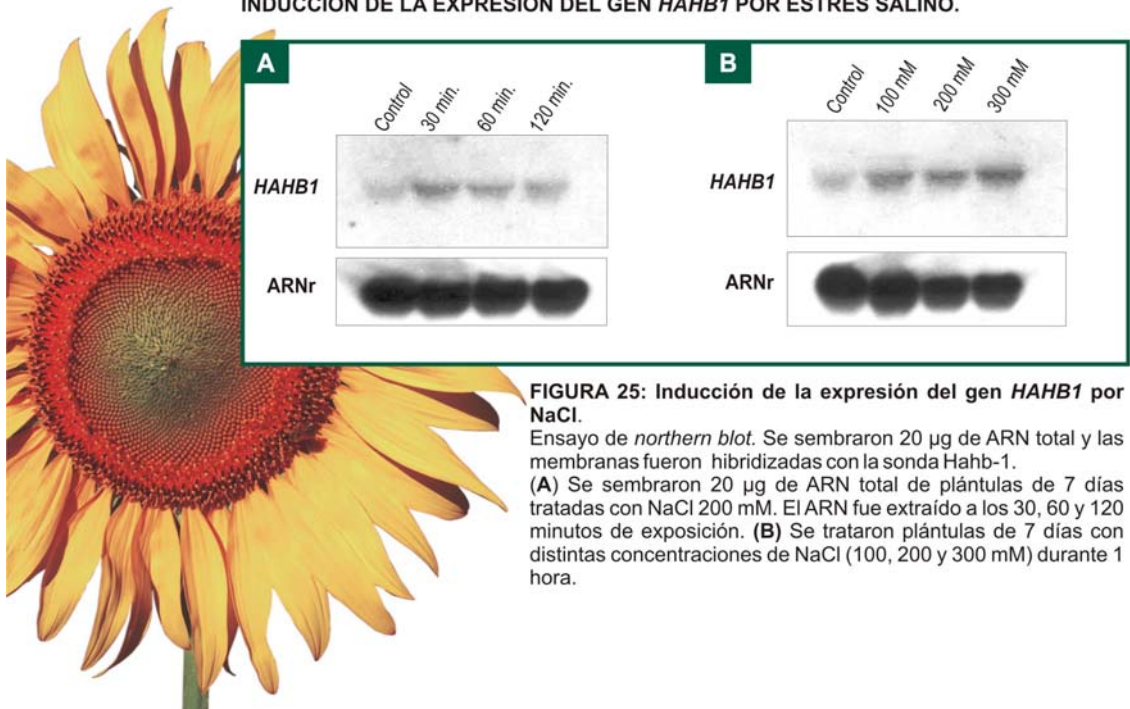


FIGURA 25: Inducción de la expresión del gen *HAHB1* por NaCl. Ensayo de *northern blot*. Se sembraron 20 µg de ARN total y las membranas fueron hibridizadas con la sonda Hahb-1. (A) Se sembraron 20 µg de ARN total de plántulas de 7 días tratadas con NaCl 200 mM. El ARN fue extraído a los 30, 60 y 120 minutos de exposición. (B) Se trataron plántulas de 7 días con distintas concentraciones de NaCl (100, 200 y 300 mM) durante 1 hora.

expresión con los tratamientos de estrés hídrico, hipoxia, o choque térmico producido por altas temperaturas. Cuando las plántulas son incubadas con NaCl 200 mM, sacarosa (10 % p/v), o a bajas temperaturas (4 °C), los niveles de expresión muestran un leve aumento. En este ensayo, los niveles de expresión más altos se observan en plántulas tratadas con GA₃ (100 µM), con Ethrel[®] 30 mM (agente liberador de la hormona etileno) o en plántulas etioladas. De acuerdo a estos resultados, se analizaron individualmente algunos de los factores ambientales para los cuales el nivel de expresión fue distinto al observado en condiciones normales.

En la figura 25-A, se muestran los niveles de expresión de plántulas que fueron incubadas con NaCl (200 mM) durante distintos tiempos (30, 60 y 120 minutos). En esta figura puede observarse que el nivel del transcripto aumenta a los 30 minutos del tratamiento. En otro ensayo, donde el tiempo de incubación se mantuvo constante y se variaron las concentraciones de NaCl (Figura 25-B), los niveles del transcripto aumentaron de forma similar en las tres concentraciones ensayadas. Cabe aclarar que los aumentos en los niveles del transcripto observados en estos ensayos no son muy elevados cuando se los compara con los aumentos observados por ejemplo, en plántulas cultivadas en condiciones etioladas (ver discusión).

Habiendo visto un aumento de los niveles de expresión en plántulas etioladas, se realizaron diferentes ensayos para estudiar los efectos de las condiciones de iluminación, tanto en calidad como en cantidad, pero no se detectaron diferencias significativas (resultados no mostrados).

En resumen, a partir de los estudios de expresión presentados hasta el momento, podemos concluir que el gen *HAHB1* se expresa principalmente en tallo de plantas jóvenes y en láminas de hojas adultas. Además, al igual que los genes de la subfamilia I descritos hasta el momento, manifiesta cambios en su patrón de expresión cuando se varían algunas condiciones ambientales. En este sentido, vemos que la expresión de *HAHB1* en plántulas está regulada positivamente por varios

factores ambientales, de acuerdo con las condiciones de ensayo. Los mayores niveles de transcripto se obtienen cuando las plantas son tratadas con sacarosa y etileno, o cuando las plantas son cultivadas en condiciones etioladas. Por otro lado, hay una inducción similar de la expresión en plantas cultivadas en condiciones de estrés salino y frío, ambos factores correlacionados entre sí.

1.3.- ESTUDIOS FUNCIONALES DEL GEN *HAHB1* EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Arabidopsis thaliana*.

Una herramienta de uso frecuente para establecer la función de un gen consiste en la generación de plantas transgénicas que expresen el mismo bajo el control de un promotor constitutivo. Las modificaciones fenotípicas que ocurran en las plantas que lleven el transgén pueden atribuirse a los efectos del mismo solamente si dichos cambios se manifiestan en varias líneas independientes. En forma alternativa, pueden obtenerse plantas que presenten una anulación de la expresión de un determinado gen utilizando una construcción antisentido. Los ensayos realizados utilizando ambas estrategias en forma combinada han contribuido a la comprensión del papel que desempeñan algunos genes de la familia HD-Zip de *Arabidopsis thaliana* en los procesos de desarrollo vegetal (Carabelli y col., 1993; Schena y col., 1993; Himmelbach y col., 2002).

Para determinar la función del gen *HAHB1*, nos planteamos obtener plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresen el gen bajo el control de un promotor constitutivo. La elección de este modelo de estudio se debe al hecho de que no existen protocolos establecidos de transformación estable para plantas de girasol. Por lo tanto utilizamos como sistema heterólogo plantas de *Arabidopsis thaliana* cuya transformación en forma estable es un proceso rutinario.

1.3.1.- Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan el gen *HAB1*.

En el capítulo de Materiales y Métodos (VI.6.11), se detalla la estrategia de obtención de una construcción que contiene la región codificante del gen *HAB1* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor en el plásmido pBI 121. Con esta construcción se transformaron bacterias de *Agrobacterium tumefaciens* y luego, mediante la técnica de *floral dip*, plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col 0. Se recogieron aproximadamente unas 13000 semillas, y se sembraron en medio de cultivo MS suplementado con el antibiótico kanamicina. Al cabo de dos semanas se observaron unas 30 plantas que mostraban resistencia, de lo cual se puede estimar una eficiencia de transformación de alrededor del 0,23%. Las plantas resistentes al antibiótico, denominadas F_1 , se transplantaron en tierra cuando presentaron un par de hojas (aproximadamente 15 días después de la germinación).

A estas plantas (F_1) se les extrajo ADN genómico a partir de una hoja para comprobar la presencia del transgén por la técnica de PCR utilizando el par de oligonucleótidos específicos Tal 3 y Tal 5. Las plantas que dieron positiva la reacción

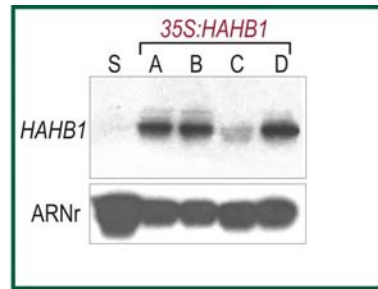


FIGURA 26: Expresión del gen *HAHB1* en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Ensayo de *northern blot*. (A) Se sembraron 10 µg de ARN total extraído de plántulas de *Arabidopsis thaliana*, de cuatro líneas independientes (A, B, C y D) obtenidas de la transformación con la construcción *35S:HAHB1* y de plantas no transformadas (S). El panel superior muestra el filtro hibridizado con la sonda $\delta H1$ (Materiales y Métodos III.5). El panel inferior, muestra el mismo filtro hibridizado con la sonda que detecta ARN ribosómico.



FIGURA 27: Las plantas transformadas con la construcción *35S:HAHB1* son de menor tamaño. Aspecto de plantas de *Arabidopsis thaliana* de 18 días de edad cultivadas en condiciones normales. A la izquierda, se observan las salvajes y a la derecha, las plantas que llevan la construcción *35S:HAHB1*.

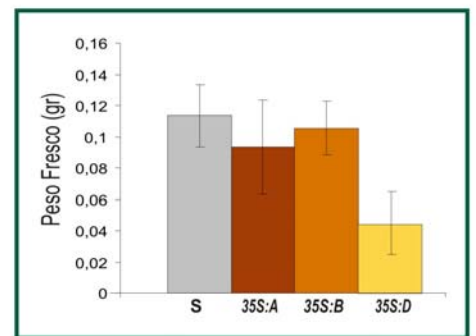


FIGURA 28: Peso fresco al inicio del estadio reproductivo. Peso fresco de la porción aérea de plantas salvajes y de tres líneas independientes que llevan la construcción *35S:HAHB1*. Las medidas se toman a los 20 días de edad. Los datos se expresan en gramos. n = 35 individuos.

de PCR (70% de las líneas analizadas), se seleccionaron y las semillas que produjeron se cultivaron nuevamente en medio MS en presencia del antibiótico kanamicina, obteniendo de esta manera la segunda filial (F_2). De 7 plantas F_2 de 20 días de edad se extrajeron ARNs totales y mediante la técnica de *northern blot* se identificaron 4 líneas que expresaban el gen constitutivamente que se denominaron 35S:A, 35S:B, 35S:C y 35S:D respectivamente.

En la figura 26, se presenta un ensayo de *northern blot* en el que se muestra el nivel de expresión del gen *HAHB1* en las distintas líneas transgénicas. Se utilizó la sonda $\delta H1$ (ver Materiales y Métodos, VI.5) que hibridiza específicamente y no lo hace con los ARNs de las plantas salvajes. De acuerdo a este ensayo, se obtuvieron tres líneas con nivel de expresión alto y una línea con un nivel de expresión inferior. Para una primera caracterización fenotípica, se trabajó únicamente con las líneas estables e independientes que presentaban los niveles de expresión del gen *HAHB1* más altos (35S:A, 35S:B y 35S:D).

1.3.2.- Fenotipo de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas crecidas en condiciones normales.

Se caracterizaron las plantas transformadas en las que denominamos “condiciones de cultivo normales en tierra” (ver Materiales y Métodos, VI.1.2). Se utilizaron bandejas con 16 macetas cada una. Cada hilera de la bandeja (35S:A, Salvajes, 35S:B, y 35S:D), comprende 4 macetas en las que se cultivaron 3 plantas. A partir de los 10 días de cultivo, las plantas transformadas comenzaron a diferenciarse de las plantas salvajes ya que su tamaño era menor. En la figura 27 se observa que estas plantas a los 18 días de germinadas son de menor tamaño que sus pares utilizadas como controles. Coincidiendo con la observación visual, la biomasa de la

porción aérea de las plantas transgénicas a los 20 días es menor que la de las plantas salvajes (Figura 28).

A la diferencia en el tamaño que se observa entre las plantas transgénicas y las plantas salvajes, se le agrega una diferencia en la velocidad del desarrollo, que resulta evidente a simple vista como se muestra en la figura 29, dado que a los 28 días de edad, las plantas que llevan la construcción *35S:HAHB1* no han elongado aún el tallo. Para cuantificar la velocidad del desarrollo se contaron el número de hojas en roseta de las plantas a lo largo del ciclo de vida. La figura 30 muestra que las plantas transgénicas presentan un menor número de hojas en roseta con respecto a las plantas salvajes durante los 40 días de cultivo en que se realizó la medición.

La transición del estadio vegetativo al reproductivo, medida como la aparición del primordio de la inflorescencia, ocurre cuando las plantas transgénicas presentan más de 10 hojas en roseta, mientras que en las plantas salvajes esto sucede cuando las plantas presentan 8-9 hojas en roseta (Figura 31).

Las plantas salvajes comienzan a elongar el tallo una semana antes que las plantas transformadas lo que deriva en que las plantas salvajes de 20, 30 y 40 días de edad sean más altas que las plantas transgénicas.

El inicio de la senescencia de las plantas salvajes, también se anticipa al de las plantas transformadas, tal como se muestra en la figura 32, también la formación y la maduración de las vainas se produce antes. La cosecha de las semillas (cuando las



FIGURA 29: Características fenotípicas de plantas transformadas con la construcción *35S:HAHB1*. Plantas de 28 días de edad salvajes (S) y líneas independientes de plantas que llevan la construcción *35S:HAHB1* (A,B y D), crecidas en condiciones de cultivo normales.

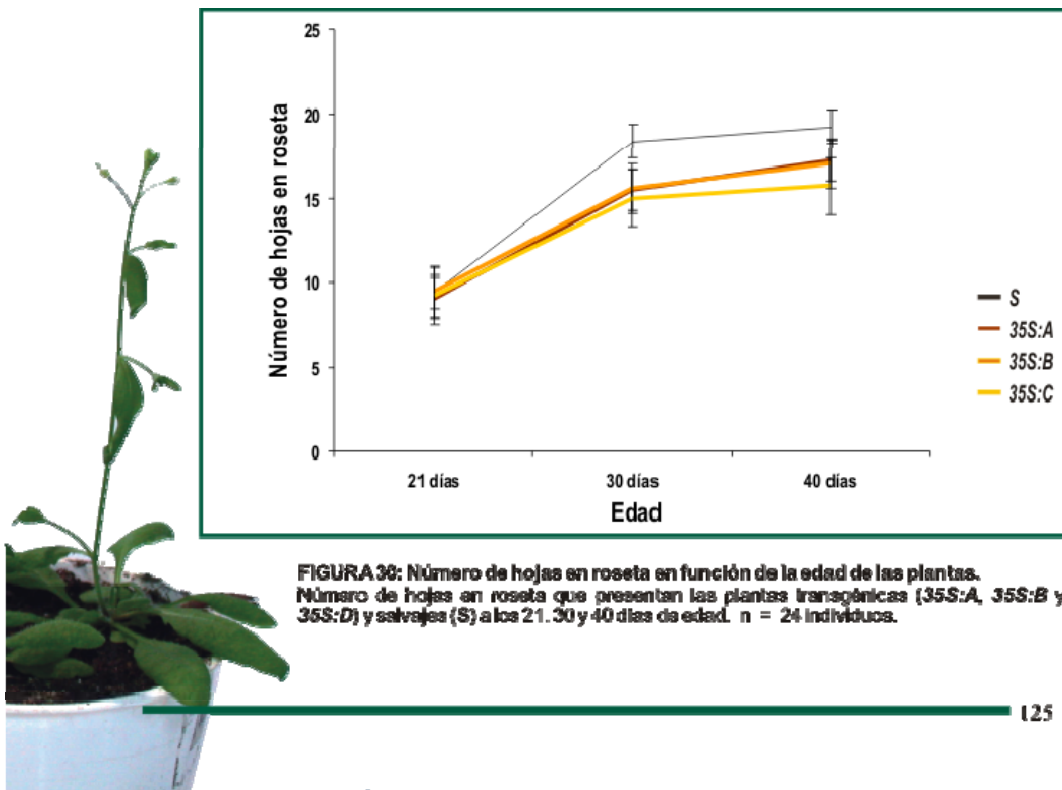


FIGURA 30: Número de hojas en roseta en función de la edad de las plantas. Número de hojas en roseta que presentan las plantas transgénicas (35S:A, 35S:B y 35S:D) y salvajes (S) a los 21, 30 y 40 días de edad. n = 24 individuos.

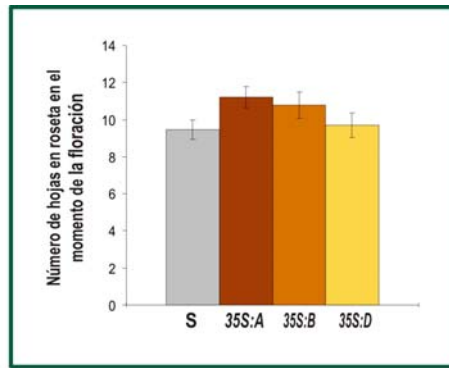


FIGURA 31: Número de hojas en roseta al inicio del estadio reproductivo.

Número de hojas en roseta que presentan las plantas en el momento de la formación del primordio de la inflorescencia en las líneas independientes de plantas que llevan la construcción 35S:HAHB1 (35S:A, 35S:B y 35S:D) y en las plantas no transformadas (S). n = 24.



FIGURA 32: Ingreso al estado de senescencia de plantas salvajes y transgénicas.

Plantas de 45 días de edad salvajes y transformadas con la construcción 35S:HAHB1, crecidas en condiciones normales.

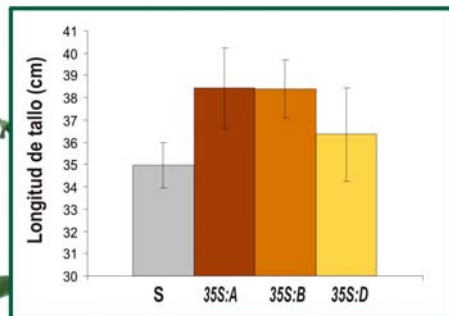
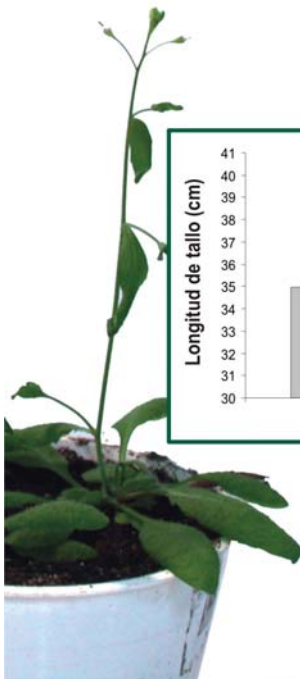


FIGURA 33: Longitud de tallo al final del ciclo de vida.

Longitud del tallo (cm) cuando las plantas presentan el 100 % de las vainas maduras (final del ciclo de vida) de plantas transformadas (35S:A, 35S:B y 35S:D) y plantas no transformadas (S). Las mediciones se realizaron a los 65 días (plantas transgénicas) y a los 50 días (plantas salvajes). Se midieron 20 plantas en cada ensayo realizado.

plantas tienen el 100 % de las vainas maduras) se realiza a los 50 días de la siembra de las plantas salvajes y a los 65 días de las que expresan el transgén.

Al momento de la cosecha, se midió la longitud del tallo y se observó que la de las plantas transformadas era superior a la de las salvajes (Figura 33). Esto indica que las plantas transgénicas además de presentar un desarrollo tardío, son más altas al finalizar el ciclo que sus pares salvajes.

Además de los ensayos descriptos realizados en plantas crecidas en tierra, se analizó el desarrollo de las plantas cultivadas en placas de Petri con medio MS en condiciones normales. En estas condiciones, las plantas transformadas presentan hojas más pequeñas que las plantas salvajes. También, se estudiaron otros parámetros del desarrollo como la longitud del hipocótilo y la longitud de la raíz, que resultaron similares en las plantas transformadas y las salvajes.

1.3.3- Análisis del fenotipo de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas crecidas en condiciones de estrés salino.

El estrés abiótico causado por el aumento en la concentración de NaCl del medio -estrés salino-, afecta al desarrollo normal de las plantas retrasando el crecimiento. Dado que se había observado en girasol una inducción de la expresión del gen *HAHB1* cuando las plántulas se colocaban en un medio con elevadas concentraciones de NaCl, se sometieron plantas transgénicas y salvajes a diferentes tratamientos con NaCl.

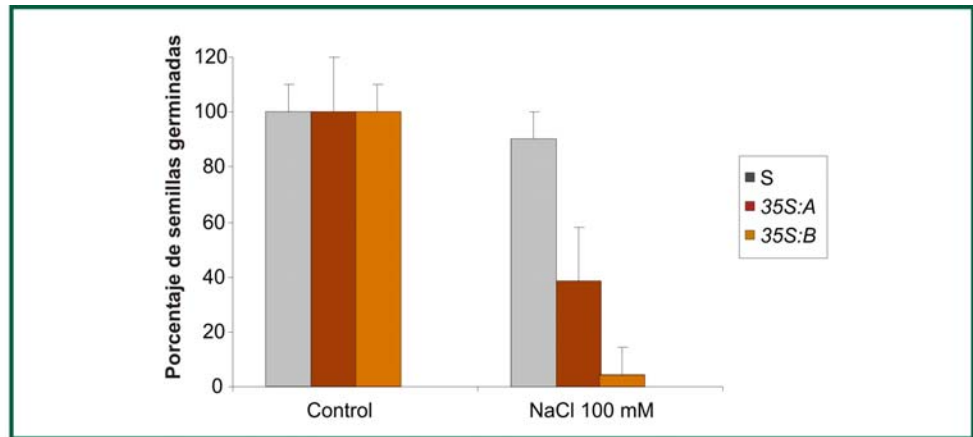


FIGURA 34: Sensibilidad de la germinación al estrés salino.

Se sembraron 20 semillas de plantas de *Arabidopsis thaliana* que llevan la construcción 35S:HAHB1 (35S:A y 35S:B) y plantas no transformadas (S) en placas de Petri con medio MS. Para los tratamientos, el medio MS fue suplementado con una concentración final de NaCl 100 mM. A los 4 días, se calculó el porcentaje de semillas germinadas en la condición ensayada. (n = 20)

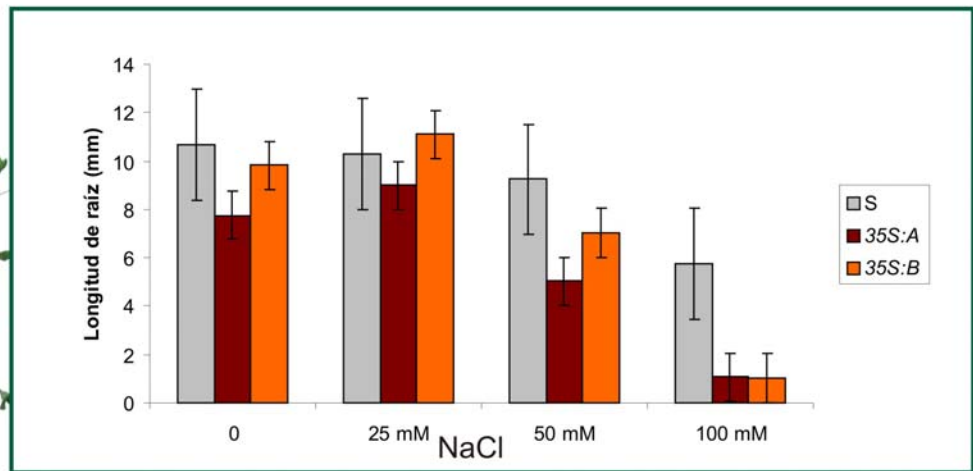


FIGURA 35: Efecto del estrés salino sobre el desarrollo de las raíces.

Se sembraron 200 semillas de plantas de *Arabidopsis thaliana* que llevan la construcción 35S:HAHB1 (35S:A y 35S:B) y plantas no transformadas (S) en placas de Petri con medio MS. Para los tratamientos, el medio MS fue suplementado con distintas concentraciones finales de NaCl (25 mM, 50 mM y 100 mM). Se midió la longitud de la raíz de 10 plántulas a los 7 días de cultivo en las distintas condiciones ensayadas.



En la figura 34, se muestra el efecto del NaCl en la germinación de plantas cultivadas en condiciones normales o en presencia de NaCl 100 mM. Las plantas que llevan la construcción *35S:HAHB1* mostraron ser más sensibles que las salvajes, lo que se deduce de la obtención de un porcentaje de germinación inferior.

En la figura 35, se muestran las mediciones de la longitud de la raíz de las plantas que germinan y crecen durante 7 días en condiciones normales o en un medio suplementado con NaCl de concentraciones 50 mM y 100 mM. En este ensayo, las plantas transgénicas presentan menor longitud de raíz que las plantas salvajes indicando una mayor sensibilidad de las mismas al aumento de la concentración de sal en este medio.

En síntesis, el aumento de la concentración de NaCl en el medio afecta en mayor medida a las plantas que llevan la construcción *35S:HAHB1*, tanto en el proceso de germinación como en el desarrollo de las raíces.

1.3.4.- Análisis del efecto de las condiciones de iluminación en plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas.

Se realizaron ensayos con plantas salvajes y plantas *35S:HAHB1* cultivadas con distintas condiciones de iluminación (de calidad y de cantidad). También se midió la expresión de algunos genes de *Arabidopsis thaliana* involucrados en distintos procesos de desarrollo relacionados con la respuesta a la luz, que podrían ser blanco indirecto de *HAHB1*.

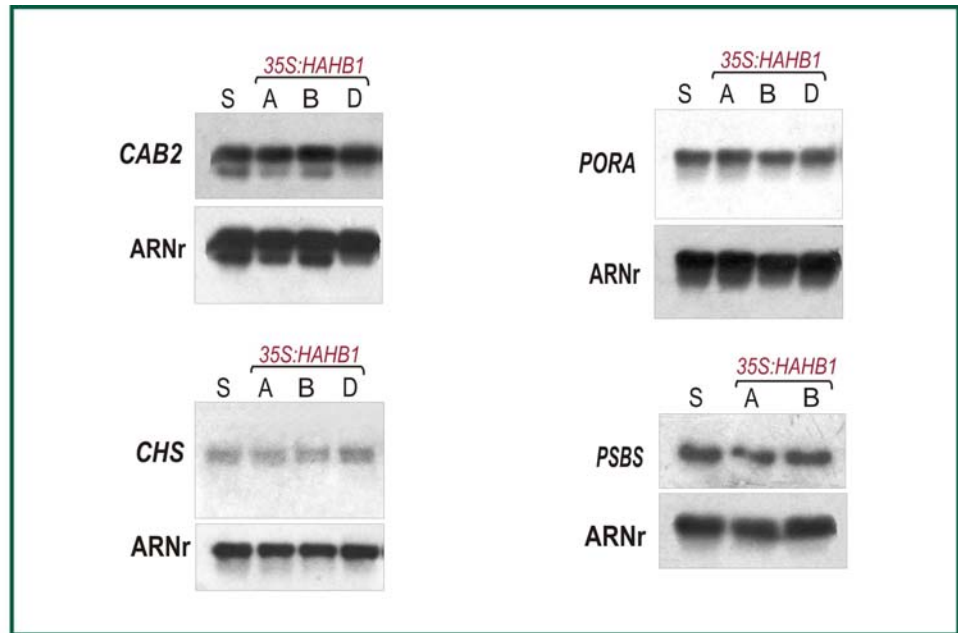


FIGURA 36: Análisis de la expresión de genes de *Arabidopsis thaliana* relacionados con la fotosíntesis.

Se extrajo ARN total (10 µg) de plántulas transformadas y no transformadas de *Arabidopsis thaliana* de 4 días de edad, cultivadas en placas de Petri, en condiciones normales. Se utilizaron sondas específicas para medir los niveles de ARNm de los genes *CAB2*, *CHS*, *PSBS* y *PORA*, relacionados con las funciones de fotosíntesis. En el panel inferior de cada gen analizado se muestran los mismos filtros hibridizados posteriormente con la sonda de ARNr.



Se analizaron de manera independiente la sensibilidad a luz enriquecida en rojo, en rojo lejano y en azul, la tolerancia a períodos largos de etiolación, como también la respuesta a diferentes fotoperíodos (día corto/día largo). En ninguno de los ensayos se encontraron otras diferencias (de supervivencia o de desarrollo) entre las plantas salvajes y las plantas transformadas, más allá de las ya observadas entre plantas (transgénicas y salvajes) crecidas en condiciones normales.

Como mencionáramos, se estudió la expresión de genes que podrían ser blancos del gen *HAHB1* en el modelo de estudio (*Arabidopsis thaliana*), involucrados en las vías de los procesos de fotosíntesis y fotomorfogénesis. Para los estudios de *northern blot*, se utilizaron sondas correspondientes a los genes *PSBS*, *CAB2*, *CHS* y *PORA* (ver Materiales y Métodos, VI.5). En la figura 36, se muestra que la expresión de los genes analizados no presenta diferencias entre las plantas salvajes y las plantas transgénicas crecidas en condiciones normales. Esto nos indica que el gen *HAHB1* no afecta la expresión de los genes estudiados y que por lo tanto, corriente debajo de los mismos no estarían afectadas vías de señalización. El gen *CHS*, cuya expresión es regulada por la luz, codifica para una enzima que participa en la vía de síntesis de flavonoides como también en la regulación del transporte de auxinas y del gravitropismo de la raíz (Brown y col., 2001). El análisis de la expresión de este gen en plantas que llevan el transgén, tampoco mostró diferencias con respecto a las plantas salvajes, lo que indica que *HAHB1* no participaría en estas vías de regulación, al menos interactuando con el gen *CHS*.

1.4- DISCUSIÓN.

En el primer punto de este capítulo se describe la estructura del gen *HAHB1* y de la proteína que el mismo codifica. Tanto el homeodominio como el cierre de

leucinas de la proteína HAHB1 presentan los residuos conservados y/o sustituciones conservadas presentes en la mayoría de homeodominios identificados en otros organismos (Gehring y col., 1994; Henriksson y col., 2005). Esta primera caracterización estructural permitió incluir a la proteína HAHB1 dentro de la familia HD-Zip y dentro de la misma, en la subfamilia I (Chan y col., 1998).

Se han aislado varios genes que codifican proteínas de la subfamilia I pertenecientes a diferentes especies incluyendo musgos y plantas vasculares (Aso y col., 1999; Schena y Davis, 1992; Söderman y col., 1994; Sessa y col., 1998; González y Chan, 1993; Meijer y col., 1997; Sakakibara y col., 2001). A partir del alineamiento de las secuencias del homeodominio de los miembros de la subfamilia I, se estableció una secuencia consenso que coincide con la presentada en la bibliografía (Henriksson y col., 2005).

En base al alineamiento de las secuencias de los homeodominios de las proteínas HD-Zip I, se realizaron estudios de filogenia utilizando el método de *Neighbour joining* (Holder y Lewis, 2003). Estos estudios permitieron construir un árbol evolutivo, del cual se obtuvieron 11 subgrupos monofiléticos con los miembros de las diferentes especies. Los estudios previos realizados por Nishitani y col. (2001) en los que se construyó un árbol evolutivo a partir del alineamiento de las secuencias del homeodominio de los miembros de las subfamilias I, II, III y IV de *Arabidopsis thaliana*, *Daucus carota*, *Lycopersicon esculentum* y de *Zinnia elegans* con el método de máxima parsimonia, presentan a las proteínas de la subfamilia I de los miembros de dichas especies agrupados de la misma forma que en el árbol que se construyó en este trabajo de Tesis. En el análisis realizado únicamente con secuencias de proteínas HD-Zip I de *Arabidopsis thaliana* también utilizando el método de máxima parsimonia (Henriksson y col., 2005), dio como resultado agrupamientos similares de las proteínas a los obtenidos en nuestro trabajo de Tesis, con la excepción de ATHB1 y ATHB51, que están incluidos en otro subgrupo. El árbol construido por Aso y col. (1999) con las

secuencias de los homeodominios de las proteínas de las 4 subfamilias HD-Zip de distintas especies vegetales (método de *Neighbour joining*), propone a la proteína CHB3 de *Daucus carota* en un subgrupo diferente al propuesto en nuestro árbol. El árbol construido por el método de *Neighbour Joining*, fue el de Agalou y col. (2007) con las secuencias del homeodominio y del cierre de leucinas de los miembros de *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* y *Craterostigma plantagineum* es similar al obtenido en esta Tesis, y presenta los mismos subgrupos de proteínas. Las mayores diferencias se encontraron cuando se comparó nuestro árbol con el construido por Sakakibara y col. (2001) con el método de máxima probabilidad, donde las proteínas VAHOX (*Lycopersicon esculentum*), CHB3 (*Daucus carota*), CHB1 (*Daucus carota*), ATHB1 (*Arabidopsis thaliana*) y las proteínas de tipo HD-Zip I identificadas hasta el momento de *Ceratopteris richardii* están en subgrupos diferentes. Es probable que las diferencias observadas entre el árbol que se obtuvo en esta Tesis y los árboles obtenidos por otros autores se deban al número de secuencias utilizadas para su construcción y/o al método utilizado para la misma. Sin embargo, a pesar de las diferencias encontradas en las comparaciones, la proteína HAHB1, junto con ATHB3, 13, 20, 23 (*Arabidopsis thaliana*) y CHB2-4 (*Daucus carota*), siempre se presentan como un subgrupo en todos los árboles analizados.

Los estudios de filogenia indican que las proteínas más relacionadas con HAHB1 son ATHB13 (*Arabidopsis thaliana*), OSHOX21 (*Oryza sativa*), TAHDZIPI2 (*Triticum aestivum*) y CHB4 (*Daucus carota*) con las cuales, además de compartir el 95 %, 92 %, 86 % y 83 % respectivamente de la secuencia de aminoácidos del homeodominio, forman parte del subgrupo II. Los miembros del subgrupo II comparten además la posición del homeodominio en el contexto global de la proteína y la presencia de los residuos ácidos hacia el extremo N-terminal del homeodominio.

A partir de ADN genómico de girasol, se aisló un intrón dentro del gen *HAHB1*. La presencia de este intrón corriente arriba del homeodominio es atípica, si se

consideran las posiciones de los intrones en *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* o *Physcomistrella patens* (Henriksson y col., 2005; Agalou y col., 2007; Sakakibara y col., 2001). Las proteínas HD-Zip de estas especies presentan un patrón de distribución de intrones específico, y todos ellos ubicados en la región del homeodominio y/o del cierre de leucinas. Además, no podemos descartar la presencia de otros intrones en el gen *HAHB1* ya que sólo se utilizaron dos oligonucleótidos que hibridizan en el gen *HAHB1* pero afuera del homeodominio o del dominio de cierre de leucinas (ver figura 6), por lo que es posible que hayan otros intrones cuya posición pueda correlacionarse con algún patrón ya descrito o bien, las proteínas HD-Zip de girasol tienen su propio patrón de posiciones de intrones.

Los resultados del análisis del patrón de expresión del gen *HAHB1* en diferentes estructuras y órganos de la planta de girasol muestran que los niveles de expresión del gen son significativos en tallos o en láminas de hojas de 21 y 90 días respectivamente. Si bien hay antecedentes de genes que codifican proteínas HD-Zip de *Arabidopsis thaliana* que se expresan únicamente en un órgano y en una etapa del desarrollo (Henriksson y col., 2005) no podemos decir lo mismo de *HAHB1*, ya que no se analizaron muestras de hojas de estadios intermedios ni de tallos en estadios adultos de las plantas. Por lo tanto no se puede descartar la posibilidad de que el gen tenga altos niveles de expresión en otros estadios del desarrollo y deberán realizarse en el futuro estudios más detallados a fin de completar el patrón de expresión del gen *HAHB1*.

En la tabla 11 se resume el patrón de expresión de los miembros del subgrupo II. Las diferencias observadas en estos patrones indica que cada uno estaría cumpliendo funciones diferentes.

En cuanto a la respuesta a efectores ambientales, los resultados obtenidos indican que los niveles de transcritos de *HAHB1* son mucho más elevados en plántulas de girasol tratadas con giberelinas, etileno, o en plántulas crecidas en

condiciones etioladas. En plántulas tratadas con NaCl también se observa un aumento en el nivel de expresión, pero no tan elevado como en las condiciones mencionadas previamente.

La expresión de los genes *ATHB3*, *ATHB20*, *ATHB13* y *ATHB23* en plántulas de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a distintas condiciones ambientales (Henriksson y col., 2005) presenta diferentes patrones comparados con los observados para *HAHB1*.

GEN	EXPRESIÓN
<i>ATHB3</i>	Niveles altos en raíz y más bajos en plántulas, flores y tallos (Söderman y col., 1994; Henriksson y col., 2005).
<i>ATHB20</i> <i>ATHB23</i>	En la mayoría de los órganos: plántulas, raíces, hojas y tallos (Henriksson y col., 2005).
<i>ATHB13</i>	En plántulas, hojas y flores (Henriksson y col., 2005).
<i>CHB4</i>	En las capas corticales internas del eje embrionario (Hiwatashi y Fukuda, 2000).
<i>TAHDZIP2</i>	En flores, plántulas y embriones (Lopato y col., 2006).
<i>OSHOX21</i>	Niveles altos en tallos y plántulas y niveles más bajos en vainas y panículas (Agalou y col., 2007).
<i>OSHOX23</i>	Niveles altos en tallos, raíces, vainas, panículas y plántulas (Agalou y col., 2007)

Tabla 11: Patrón de expresión de genes del subgrupo II.

Los genes *ATHB3* y *ATHB23* disminuyen sus niveles cuando las plántulas son tratadas con NaCl y aumentan cuando se colocan en oscuridad. *ATHB13* y *ATHB20* no varían los niveles de transcritos cuando las plántulas se tratan con NaCl y se reprimen cuando las plántulas son colocadas en oscuridad. De estas comparaciones

se deduce que no es posible establecer una correlación entre la función y la relación filogenética de los genes del subgrupo II.

El último punto de este capítulo describe la obtención y el análisis de plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan el factor de transcripción HAHB1 de girasol. Los estudios fenotípicos de las plantas se realizaron con 3 líneas independientes de forma tal que los cambios observados en las mismas pueden ser adjudicados a la presencia de HAHB1 y no a la posición en la cual se haya insertado. Las plantas que expresan el gen *HAHB1* presentan un retraso en el desarrollo puesto en evidencia por una velocidad de crecimiento inferior en los primeros estadios del desarrollo y por la entrada tardía a la fase reproductiva. La progresión cronológica de los principales estadios de desarrollo podemos observarla en la figura 37. Tanto la etapa vegetativa como la reproductiva son más largas en las plantas que llevan la construcción *35S:HAHB1*.

Las plantas transgénicas entran en la fase reproductiva aproximadamente una semana más tarde y presentan el mismo retraso en el ingreso a la senescencia y la maduración de las vainas. En las plantas salvajes, cuando ya se han formado el 100 % de las vainas y las semillas están maduras como para la cosecha, las hojas en roseta están completamente senescentes; esto ocurre entre los 45 y 55 días después de germinadas (Boyes y col., 2001).

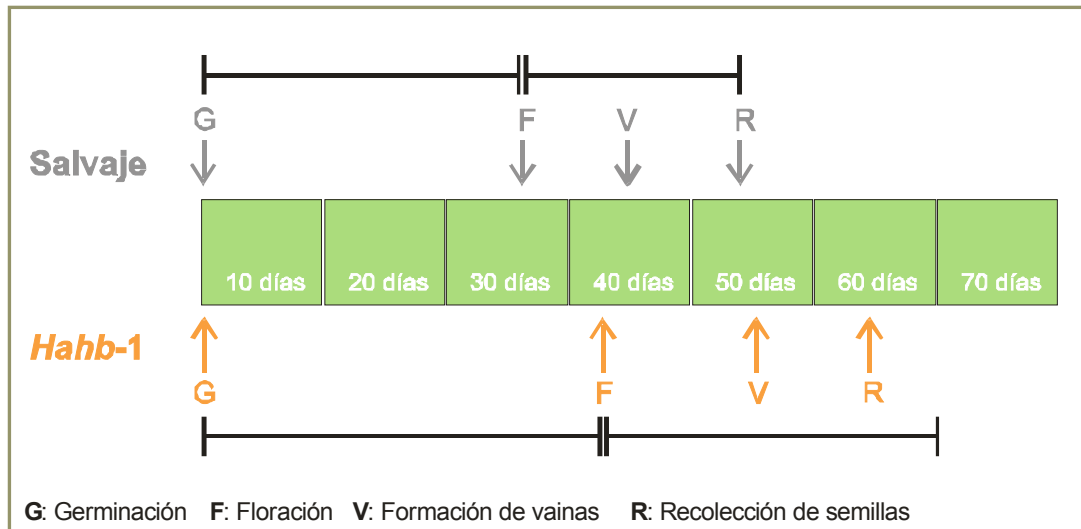


Figura 37: Representación esquemática de la progresión cronológica de los estadios de desarrollo de las plantas transformadas y salvajes.

En las plantas que expresan constitutivamente el gen *HAHB1*, este proceso ocurre aproximadamente 10 días más tarde.

Las plantas que expresan el gen *HAHB4* de girasol de forma constitutiva o de manera inducible, muestran también un retraso en el ingreso a la senescencia, causado por una menor sensibilidad a la acción del etileno y una inhibición de su síntesis (Manavella y col., 2006). Las plantas transformadas con la construcción 35S:*HAHB1*, presentan un retraso en la entrada a la senescencia pero como no se encontraron diferencias ni en la sensibilidad de las plantas adultas al etileno, ni en la triple respuesta de plántulas germinadas *in vitro*, no podemos atribuir dicho efecto a alguna interacción entre el gen *HAHB1* y el etileno.

De acuerdo a lo reportado por Henriksson y col. (2005), los genes *ATHB3*, -20, -13 y -23, regulan la forma y la división celular y como consecuencia de ello las plantas que expresan estos genes constitutivamente, tienen la forma de los cotiledones y de las hojas, modificadas. Por otro lado, *ATHB7*, un gen también de *Arabidopsis thaliana* perteneciente al subgrupo VI, inhibe la expansión celular en los tallos cuando es

expresado de forma constitutiva (Olsson y col., 2004). Las plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan constitutivamente el gen *HAHB4* de *H. annuus* presentan tallos más cortos debido a que las células tienen un menor tamaño (Dezar y col., 2005). Queda pendiente el realizar cortes histológicos para responder si la diferencia observada entre las plantas que llevan la construcción *35S:HAHB1* y las salvajes es el número y/o tamaño de las células de los tallos.

Son varias las vías de señalización que controlan el inicio de la floración de *Arabidopsis thaliana*. Wang y col. (2003), reportaron que el factor de transcripción *ATHB16* de *Arabidopsis thaliana* regula la transición al estado reproductivo y controla la expansión celular de las hojas. Cuando este gen es sobreexpresado en plantas bajo el control del promotor *35SCaMV*, éstas demoran más en florecer a medida que cambia el fotoperíodo disminuyendo las horas de luz. Para evaluar si el retraso en el desarrollo que presentan las plantas que sobreexpresan el gen *HAHB1* está relacionado con el fotoperíodo, se realizaron ensayos cultivándolas en día corto (8 horas de luz, 16 horas de oscuridad). La diferencia en la velocidad de desarrollo observada en condiciones estándar fue la misma proporcionalmente, aunque el ciclo de vida fuera más largo. Por otro lado, se realizaron ensayos evaluando la expresión de genes de *A.thaliana* que están asociados a la fotosíntesis [*CHS* (Brown y col, 2001), *PSBS* (Li y col., 2002)] e involucrados en el control del ritmo circadiano y en el fotoperíodo -*CAB2* (Millar y Kay, 1996)- y tampoco se encontraron diferencias en los niveles de expresión de estos genes entre las plantas transformadas y las salvajes. Por lo tanto no hay evidencia suficiente que indique que el gen *HAHB1* participe en las vías de señalización que regulan el desarrollo en función del fotoperíodo.

Finalmente se estudió la respuesta de las plantas transformadas en condiciones de estrés salino y se observó que las mismas son más sensibles a los tratamientos que las salvajes, en estado de plántula. El estrés salino reduce la capacidad de las plantas de captar agua y la consecuencia directa de ello es una

disminución de la velocidad de crecimiento acompañada por diversos cambios metabólicos. En las plántulas, este cambio en el desarrollo probablemente esté dirigido a través de señales hormonales generadas en las raíces (Munns, 2002). De esta manera, si el efecto del estrés salino impacta directamente en el desarrollo vegetal es probable que la hipersensibilidad de las plantas que llevan la construcción *35S:HAHB1* al tratamiento con NaCl esté estrechamente vinculada al retraso del desarrollo que las mismas presentan y el gen *HAHB1* sea un regulador negativo en respuesta al estrés salino. Sin embargo debería estudiarse si la mayor sensibilidad de las plantas que llevan el gen *HAHB1* es debida al estrés iónico o a la disminución del potencial osmótico del medio, ya que no se realizaron ensayos con otras sales (ClK, ClCs, ClLi) o con manitol (que genera únicamente estrés osmótico).

Los resultados presentados en esta Tesis indican que el gen *HAHB1* presenta un comportamiento similar a los genes *ATHB7* y *ATHB12* de *Arabidopsis thaliana*, aunque estos últimos pertenezcan a otro grupo monofilético. Los estudios de expresión muestran que cuando se tratan plántulas de *Arabidopsis thaliana* con NaCl, la hormona ABA o se someten a estrés salino, aumentan los niveles de ARN mensajero tanto de *ATHB7* (Söderman y col., 1996; Hjelström y col., 2003) como de *ATHB12* (Lee y Chun, 1998). Por otro lado, cuando *ATHB7* y *ATHB12* se sobreexpresan en plantas de *Arabidopsis thaliana*, las mismas presentan un fenotipo similar entre sí caracterizado por pecíolos más cortos, hojas más redondeadas, tallos más cortos y raíces hipersensibles al tratamiento con la hormona ABA (Olsson y col., 2004). El parecido fenotípico entre estas plantas y las que expresan ectópicamente el gen *HAHB1*, es un indicio que orienta la búsqueda de la función del gen *HAHB1* hacia la señalización por la hormona ABA, para lo cual deberán realizarse ensayos de expresión en girasol en respuesta a ABA como también en las plantas transgénicas en respuesta a ABA y a estrés hídrico.

En resumen, podemos decir que los estudios funcionales aquí presentados muestran que el gen *HAB1* es un regulador negativo del proceso de desarrollo participando probablemente en alguna vía de señalización relacionada con las respuestas al estrés salino.



Capítulo 2: *H_{AHB10}*, un gen de girasol
perteneciente a la subfamilia *HD-Zip II*

2.1.- ESTRUCTURA DEL GEN.

2.1.1.- Características generales.

El gen *HAHB10* se aisló a partir de una biblioteca de ADNc de raíz de girasol. El ADNc completo contiene un marco abierto de lectura de 708 pares de bases que codifica una proteína de 236 aminoácidos que incluye un homeodominio y un dominio de dimerización del tipo cierre de leucinas (Figura 38). Corriente abajo del dominio cierre de leucinas, la proteína HAHB10 presenta el motivo conservado CPSCE. Estas características permitieron incluir a la proteína dentro de la subfamilia HD-Zip II (Gonzalez y col., 1997).

El homeodominio de la proteína HAHB10 está ubicado entre los aminoácidos 92 y 152, 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, están presentes 8 (**Q₁₂**, **K₃₁**, **L₃₈**, **L₄₀**, **Q₅₀**, **R₅₂**, **K₅₅** y **K₅₇**) y en las posiciones correspondientes a los otros 2, se encuentran sustituciones conservadas en todos los miembros de la subfamilia II:



En la figura 38, también puede observarse que en la región codificante, el motivo cierre de leucinas de HAHB10 presenta 5 repeticiones de 7 residuos que conforman la hélice α anfipática. Las posiciones **d₂**, **d₃**, **d₄** y **d₅** se encuentran ocupadas por leucinas, mientras que en la posición **d₁** hay una sustitución por una treonina (T) presente en todos los miembros de la subfamilia II.

Z taaacatcgatcaatctacacatcttttattcagATGGATTTTCATGGATTGCCGAACATGCACTGGAACAGCCCTT

M D F H G F A E H A L E L R L

AGTACAACATCATCGGTGGCCGAAAACACAACGAATCCCATCAAGAAGCCTAGCCCAGATTCTGATCATTGTCTTGAAC

S T T S S V A E N T T N P I K K P S P S S D H C L E

CATCTCTAACTTTGGCTCTTCTGGTGATTTCATGCGGTGGTTCGTCTCTATCGCTAGTGCAGAGAGGAAAGAGA

P S L T L A L S G D S C G G S S F S I A S A K R E R E

GGTCCGAGTGAAGAATCGGAGAGAGGAGGAGAACAACACTAGTGGTGAAGAAGATGAAGATGGTGGTGTGAATGGTAAAG

V P S E E S E R G G E N T S G E E D E D G G V N G K

AAGAACTCAGGTTAACTAAAGCTCAATCTGGACTATTAGAGGAAGCCTCAAACCTCACACAACCTTAAACCCCTAAAC

K K L R L T K A Q S G L L E E A F K L H T T L N P K

AAAAGCAAGAGCTTGCAAGGGACTTAAAGCTAAGGCCTAGACAAGTTGAAGTATGGTTCCAAAACAGGAGAGCAAGAAC

Q K Q E L A R D L K L R P R Q V E V W F Q N R R A R T

AAAAGCAAGAGCTTGCAAGGGACTTAAAGCTAAGGCCTAGACAAGTTGAAGTATGGTTCCAAAACAGGAGAGCAAGAAC

K L K Q T E V D C E Y T K R C C N T T D E N Q R T

CGGCAAGAGGTTCAAGAAGCTTAAAGCACAAAAGTGTCCACAGCGTTGTACATGCAGCTGCCACGACCACCCTCACCG

R Q E V Q E T K A Q K V S P A L Y M Q L P T T T L T

TGTGTCCGTCGTGTGAACAGATCGGAGACACAAAGTCTGCCACAAGCAAAAACCCCTTGACTAAAAACCATCTTTTTT

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

TAACCCCTTCACTAGTTCATCGGCAGCTTGTGAtaattgattttatagtggattatgtgcataaaatttaaatac

N P F T S S S A A C .

tcatgcacagccccaccctttttcagagtcattggcttatctagtggggaagaaataatgaaactggaatattgtag

aaagatatcagaatacccaactcatattttttgtttttctaaagaatgtattgttattttttgttgtgtaaaataat

ttcctatttataatataacaagaataatcttatttgaatt



FIGURA 38: Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de HAHB10

Las regiones 5' y 3' no codificantes están indicadas con letras minúsculas. La región codificante se describe con las letras mayúsculas. Los aminoácidos correspondientes al homeodominio se destacan en color verde y los residuos de leucina pertenecientes al dominio cierre de leucinas, en rojo. La sustitución de una leucina por una treonina en la posición d1 está subrayada. En azul se indican los residuos de cisteína en el dominio del cierre de leucinas y el motivo CPSCE adyacente al mismo.

El dominio de cierre de leucinas también presenta tres cisteínas adicionales, que están conservadas en el 63 % de los miembros de la subfamilia II.

2.1.2.- Comparación de secuencias dentro de la subfamilia.

Para determinar la relación evolutiva de la proteína HAHB10 con el resto de las proteínas HD-Zip II aisladas hasta el momento, se alinearon las secuencias de aminoácidos de las regiones correspondientes al homeodominio y al cierre de leucinas de los miembros conocidos de esta subfamilia de distintas especies vegetales. En la figura 39 se expone el alineamiento de los homeodominios de los miembros HD-Zip II. Una característica de la subfamilia II (Chan y col., 1998) es que sus miembros comparten un alto porcentaje de similitud en el homeodominio con la secuencia consenso y en este sentido, HAHB10 comparte con ésta el 97,8 % de sus aminoácidos, indicando que no es un miembro divergente.

La figura 40 muestra el alineamiento del cierre de leucinas. Las posiciones “**d**” están conservadas en todos los miembros identificados hasta el momento. En la posición **d**₁ el aminoácido leucina está sustituido por treonina en el 100 % de los casos. Dentro del dominio del cierre de leucinas se encuentran otras posiciones muy conservadas que, como muestra la figura 40, permitieron definir una secuencia consenso dentro de este dominio.

Utilizando el programa *Clustal W*, se compararon los homeodominios de las proteínas de la subfamilia II. En la tabla 12, se muestran los resultados obtenidos del análisis de la similitud de los homeodominios de los miembros más cercanos a la proteína HAHB10.



		HELICE I	HELICE II	HELICE III
N° ACCESO		...KKRL...EAVK...EK...E...ENKLEPERKQVLA...EIGLQPROVAI...QR...ARWTKQ		
AAC67320	AAC67320 (<i>A. thaliana</i>)	PPRKKLRUTREOSRLLEDSFRQNHHTLMPKQEVIAKHLMLRPRQIEVWFQNRARSKLLKQ		
At2q01430	ATHB17 (<i>A. thaliana</i>)	PPRKKLRUTREOSRLLEDSFRQNHHTLMPKQEVIAKHLMLRPRQIEVWFQNRARSKLLKQ		
At2g44910	ATHB4 (<i>A. thaliana</i>)	GSRKKLRUSKQDAVLEETFKHESTLNPQKALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
At4g17460	HAT1 (<i>A. thaliana</i>)	TCRKKLRUSKQDAVLEETFKHESTLNPQKALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
At5g06710	HAT14 (<i>A. thaliana</i>)	STRKKLRUSKQDAVLEETFKHESTLNPQKALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
At5g47370	HAT2 (<i>A. thaliana</i>)	TSRKKLRUSKQDAVLEETFKHESTLNPQKALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
At4g37790	HAT22 (<i>A. thaliana</i>)	SARKKLRUTKQDSALIEDNFKHSHTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
At3g60390	HAT3 (<i>A. thaliana</i>)	SSRKKLRUSKQDAVLEETFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
At4g16780	HAT4 (<i>A. thaliana</i>)	NSRKKLRUSKQDAVLEETFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
At2g22800	HAT9 (<i>A. thaliana</i>)	SARKKLRUTKQDSALIEESFKDHSHTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
AJ005820	CPHB1 (<i>C. plantigenium</i>)	NSRKKLRUSKQDAVLEETFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
AJ005833	CPHB2 (<i>C. plantigenium</i>)	NGRKKLRUTKQDSALIEESFKHSHSTLNPQKQDLAREKLRPRQEVWFQNRARTKLLKQ		
BAA34236	CRHB2 (<i>C. richardii</i>)	SARKKLRUSKQDSALIEESFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
BAA34243	CRHB3 (<i>C. richardii</i>)	STRKKLRUSKQDSALIEESFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
BAA34244	CRHB9 (<i>C. richardii</i>)	VVRKKLRUSKEASALIEESFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
CAA63222	GMH1 (<i>G. max</i>)	STRKKLRUTKQDSALIEESFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
AAA63770	HAB6 (<i>H. annuus</i>)	NGRKKLRUTKQDSALIEESFKHSHSTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
AAA79779	HAB9 (<i>H. annuus</i>)	NCKKKLRUTKQDSALIEESFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
AAA79778	HAB10 (<i>H. annuus</i>)	NGKKKLRUTKQDSALIEESFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
X96681	HAB10 (<i>H. annuus</i>)	NGKKKLRUTKQDSALIEESFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
AAD37695	OSHOX1 (<i>O. sativa</i>)	GSRKKLRUSKQDAVLEETFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
AP003725	OSHOX2 (<i>O. sativa</i>)	HRPKKLRUSKQDAVLEESFRLNHTLTPKQEAIAIKKLRPRQEVWFQNRARTKLLKQ		
AAD37700	OSHOX3 (<i>O. sativa</i>)	GARKKLRUSKQDSALIEESFKHESTLTPKQSDLANRLNLRPRQEVWFQNRARTKLLKQ		
AP005575	OSHOX7 (<i>O. sativa</i>)	SARKKLRUSKQDSALIEESFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
AC069324	OSHOX11 (<i>O. sativa</i>)	NSRKKLRUSKQDSALIEESFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
AL731613	OSHOX15 (<i>O. sativa</i>)	GSRKKLRUSKQDAVLEESFRLNHTLTPKQEAIAIKKLRPRQEVWFQNRARTKLLKQ		
AP005445	OSHOX17 (<i>O. sativa</i>)	GTRKKLQTKQESTLLEDSFRVNIISHAQHEJARQKPKRQEVWFQNRARTKLLKQ		
AC105927	OSHOX18 (<i>O. sativa</i>)	STRKKLRUTKQDSALIEESFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
AP006845	OSHOX19 (<i>O. sativa</i>)	SARKKLRUSKQDSALIEESFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
CAA64491	OSHOX27 (<i>O. sativa</i>)	SARKKLRUSKQDSALIEESFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
CAA64152	PHZ1 (<i>P. brachycarpa</i>)	NSRKKLRUTKQDSALIEESFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
CAA64221	PHZ2 (<i>P. brachycarpa</i>)	NSRKKLRUTKQDSALIEESFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
BAA93463	PHZ4 (<i>P. brachycarpa</i>)	NSRKKLRUSKQDSALIEESFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		
	PPHB4 (<i>P. patens</i>)	TTRKKLRUSKQDSALIEESFKHESTLNPQKQALAKQNLRLARQEVWFQNRARTKLLKQ		

FIGURA 39: Comparación de las secuencias de aminoácidos de los homeodominios de las proteínas pertenecientes a la subfamilia HD-Zip II. La primera fila muestra la secuencia consenso establecida para la subfamilia. Los residuos conservados se indican en rojo. 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 de la cual fue aislada.

CONSENSO	LKQTEVDCE.LK.CC.LT.EN.RL.E.ELR..
AAC67320 (<i>A. thaliana</i>)	LKQTEMECEYLKRWFGSLTEENHRLHREVEELRAM
ATHB17 (<i>A. thaliana</i>)	LKQTEMECEYLKRWFGSLTEENHRLHREVEELRAM
ATHB4 (<i>A. thaliana</i>)	LKQTEVDCEYLKRCCDNLTEENRRLQKEVSELRAL
HAT1 (<i>A. thaliana</i>)	LKQTEVDCEYLKRCVEKLTENRRLKEKAAELRAL
HAT14 (<i>A. thaliana</i>)	LKQTEVDCEYLKRCCESLTENRRLQKEVKELRTL
HAT2 (<i>A. thaliana</i>)	LKQTEVDCEYLKRCVEKLTENRRLQKEAMELRTL
HAT22 (<i>A. thaliana</i>)	LKQTEVDCEFLKCCETLTENRRLQKELQDLKAL
HAT3 (<i>A. thaliana</i>)	LKQTEVDCEYLKRCCENLTENRRLQKEVSELRAL
HAT4 (<i>A. thaliana</i>)	LKQTEVDCEFLRCCENLTENRRLQKEVTELRAL
HAT9 (<i>A. thaliana</i>)	LKQTEVDCEFLKCCETLADENIRLQKEIQELKTL
CPHB1 (<i>C. plantigenium</i>)	LKQTEADCEYLKQRCESLTDDNKRLLQELKDLRGL
CPHB2 (<i>C. plantigenium</i>)	LKQTEVDYALLKCCETLTENRRLQKEVQELKAL
CRHB2 (<i>C. richardii</i>)	LKQTEVDCELLKRCCESLTENRRLQKEVAELRAL
CRHB3 (<i>C. richardii</i>)	LKQTEVDCELLKRCCESLTENRRLQKEVQELRAL
CRHB9 (<i>C. richardii</i>)	LKQTEVDCELLKRCCASLTENRRLQMEVDQLRAL
CRHB10 (<i>C. richardii</i>)	LKQTEVDCELLKRCCESLTENRRLQKEVQELRAL
GMH1 (<i>G.max</i>)	LKQTEVDCEFLKRCCENLTENRRLQKEVQELRAL
HAHB10 (<i>H. annuus</i>)	LKQTEVDCEYLKRCCNLTENRRLQKEVQELKAQ
OSHOX1 (<i>O. sativa</i>)	LKQTEVDCELLKRCCETLTENRRLHRELQELRAL
OSHOX2 (<i>O. sativa</i>)	LKQTEVDCEYLKRWICERLADENKRLKEKELADLRAL
OSHOX3 (<i>O. sativa</i>)	LKQTEMECEYLKRCFGSLTEENRRLQREVEELRAM
OSHOX7 (<i>O. sativa</i>)	LKQTEVDCEHLKRCCERLTENRRLQREVAELRGA
OSHOX11 (<i>O. sativa</i>)	LKQTEVDCEYLKRCCETLTENRRLQKELAEALRAL
OSHOX15 (<i>O. sativa</i>)	LKQTEVDCELLKRCCETLTENRRLHRELQQLRAL
OSHOX17 (<i>O. sativa</i>)	LKQTEVDCEFLKRCCETLTENRRLQKEVQELRAL
OSHOX18 (<i>O. sativa</i>)	LKQTEVDCEFLKRCCESLTENKQLKHELMELRRL
OSHOX19 (<i>O. sativa</i>)	LKQTEVDCEFLKRCCETLTENRRLQRELQELRAL
OSHOX27 (<i>O. sativa</i>)	LKQTEVDCEYLKRCCETLTENRRLHKELAEALRAL
OSHOX28 (<i>O. sativa</i>)	LKQTEVDCEYLKRCCETLTENRRLHKELAEALRAL
PHZ1 (<i>P. brachycarpa</i>)	LKQTEVDCEFLKRCCQTLTEENRRLQKEVQELRAL
PHZ2 (<i>P. brachycarpa</i>)	LKQTEVDCEFLKRCCQTLTEENRRLQKEVQELRAL
PHZ4 (<i>P. brachycarpa</i>)	LKQTEVDCEFLKRCCENLTENRRLMKEVQELRAL
PPHB4 (<i>P. patens</i>)	LKQTEVDCELLKRCYESLKEENRRLQKELLELRAI
THOM1 (<i>L. esculentum</i>)	LKQTEVDCELLKRCYESLKEENRRLQKELLELRAI



FIGURA 40: Comparación de las secuencias del dominio cierre de leucinas de proteínas de la subfamilia II pertenecientes a distintas especies.
 La primera fila muestra la secuencia consenso. Los aminoácidos que muestran identidad con la misma están sombreados en gris. En rojo se muestran las posiciones "d" y en azul los residuos de cisteínas presentes en el motivo de los miembros de la subfamilia II.

PROTEÍNA / GEN	SIMILITUD HD
HAHB9	98,4 %
HAHB6	86,7 %
CPHB2	88,3 %
HAT22	81,7 %
HAT9	81,7 %

Tabla 12: Porcentaje de similitud de los homeodominios (HD) relativos al homeodominio de la proteína HAHB10.

Según este alineamiento, la proteína HAHB10 presenta la mayor similitud de secuencia con otro miembro de girasol, HAHB9.

A partir de las secuencias alineadas con el programa Clustal W, se construyó un árbol filogenético, utilizando el método para la construcción de filogenias de *Neighbour Joining* (Figura 41) (Holder y Lewis, 2003). La construcción del árbol utilizando la secuencia de aminoácidos del homeodominio, permitió diferenciar 11 subgrupos dentro de la subfamilia II. La proteína HAHB10 se encuentra dentro del subgrupo II.

2.2.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *HAHB10*..

Los genes que condifican factores de transcripción de tipo HD-Zip de la subfamilia II, al igual que los de la subfamilia I, están involucrados en la regulación del desarrollo vegetal mediado por condiciones ambientales (Chan y col., 1998).

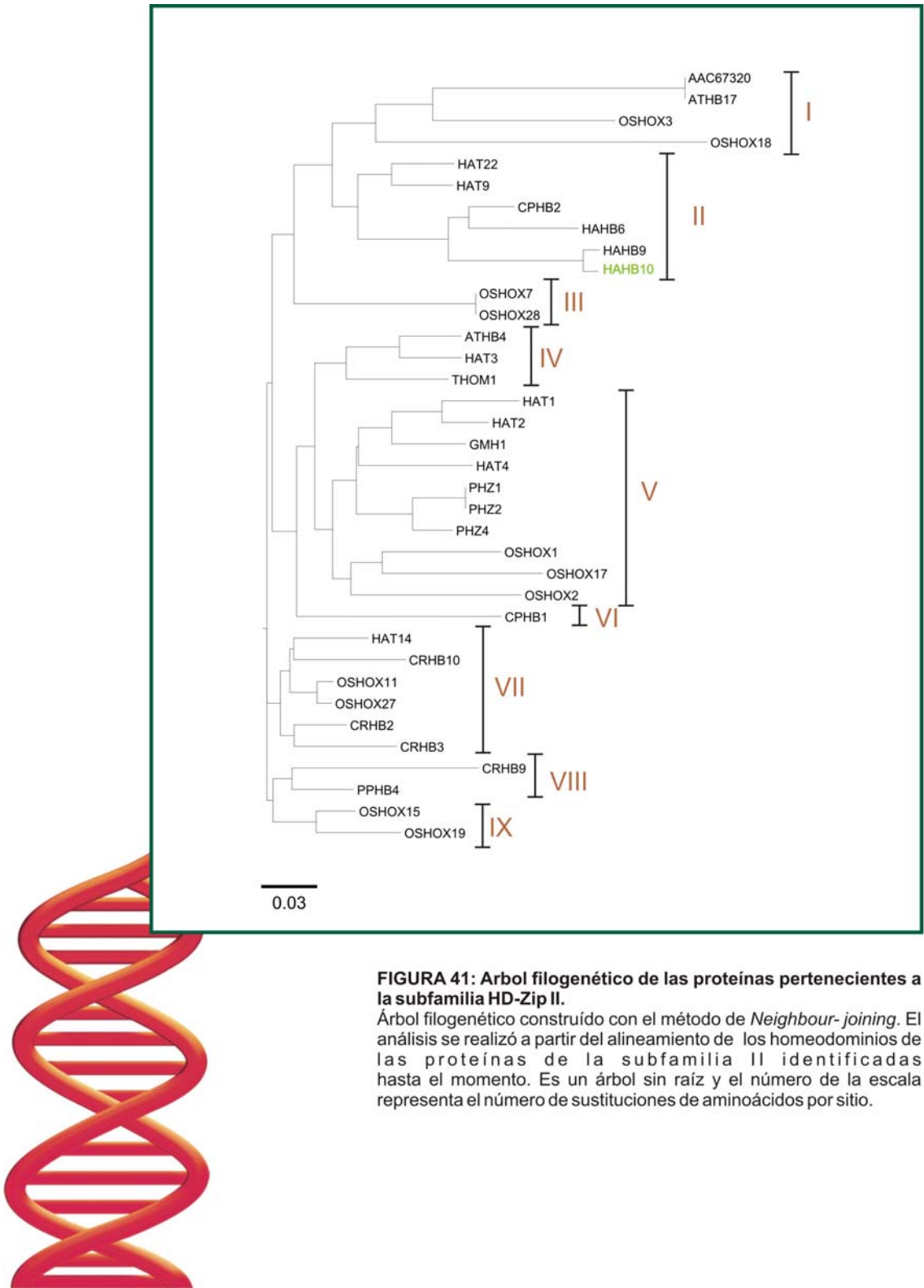


FIGURA 41: Arbol filogenético de las proteínas pertenecientes a la subfamilia HD-Zip II.

Árbol filogenético construido con el método de *Neighbour-joining*. El análisis se realizó a partir del alineamiento de los homeodominios de las proteínas de la subfamilia II identificadas hasta el momento. Es un árbol sin raíz y el número de la escala representa el número de sustituciones de aminoácidos por sitio.

La expresión de *ATHB2*, un gen de *A. thaliana* de la subfamilia II, está regulada por luz roja-lejana. Las evidencias experimentales sugieren que la función de este gen está relacionada con las repuestas de adaptación de las plantas a la sombra producida por la vegetación, denominadas repuestas de “*shade avoidance*” (Carabelli y col., 1993; Morelli y Ruberti, 2000; 2002). La expresión de *HAT2*, otro miembro de la misma familia de *A. thaliana* se regula positivamente por la fitohormona auxina de acuerdo a un estudio de microarreglos (Sawa y col., 2002).

Para comprender el papel que desempeña la proteína HAHB10 en la regulación del desarrollo de la planta de girasol, se planteó como objetivo establecer el patrón de expresión génica en condiciones normales así como identificar cuáles son los factores ambientales y hormonales que influyen sobre el mismo.

2.2.1.- Niveles de expresión del gen *HAHB10* en distintos órganos y tejidos de girasol.

Con el objeto de estudiar la expresión del gen *HAHB10*, se extrajo ARN total de los diferentes órganos y/o estructuras de plantas de girasol y se realizaron ensayos de *northern blot* utilizando la sonda Hahb-10 5' (ver Materiales y Métodos VI.5).

La figura 42 muestra cómo se expresa el gen en los distintos órganos y estructuras de la planta de girasol. Se puede observar que éste presenta el nivel de expresión más elevado en hojas de 30 días de edad. En el resto de los órganos y estructuras analizados (plántulas, raíces, tallos, carpelos, inflorescencias, flores liguladas y flores tubulosas) se detectaron niveles de expresión más bajos.

EXPRESIÓN DEL GEN HAHB10 EN DISTINTOS ESTADIOS DE DESARROLLO.

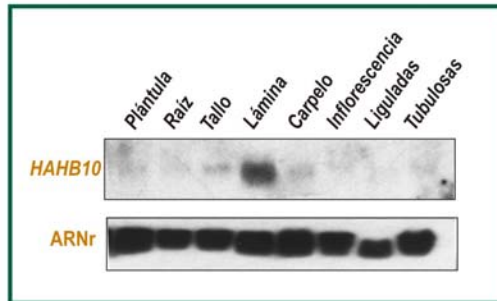


FIGURA 42: Expresión del gen *HAHB10* en distintos estadios y órganos de girasol..

Ensayo de *northern blot*. Se sembraron 10 µg de ARN de: plántulas de 4 días de edad, raíces de 14 días, tallos de 14 días, hojas de 30 días, carpelos, inflorescencias, flores liguladas y flores tubulosas. El panel superior muestra el filtro hibridizado con la sonda Hahb-10. El panel inferior, muestra el mismo filtro hibridizado con la sonda para ARN ribosomal.

EXPRESIÓN DEL GEN HAHB10 EN PLÁNTULAS SOMETIDAS A DISTINTOS EFECTORES AMBIENTALES.

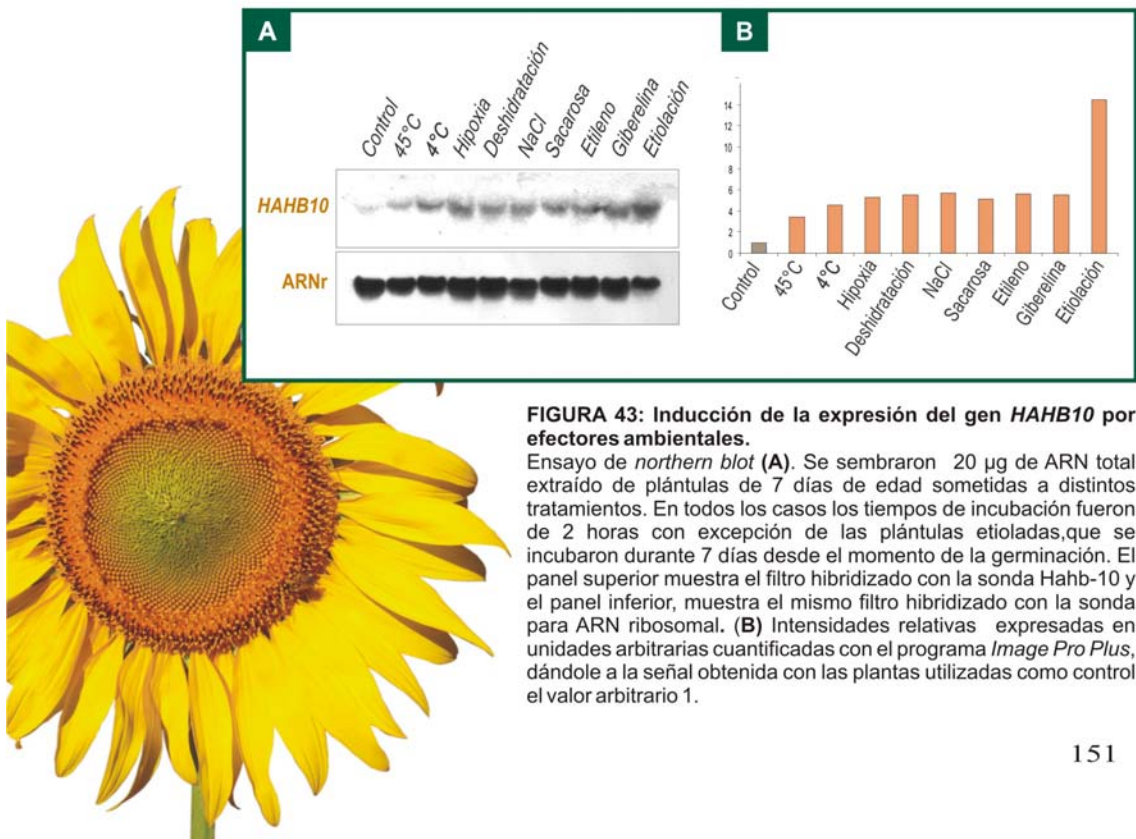


FIGURA 43: Inducción de la expresión del gen *HAHB10* por efectores ambientales.

Ensayo de *northern blot* (A). Se sembraron 20 µg de ARN total extraído de plántulas de 7 días de edad sometidas a distintos tratamientos. En todos los casos los tiempos de incubación fueron de 2 horas con excepción de las plántulas etioladas, que se incubaron durante 7 días desde el momento de la germinación. El panel superior muestra el filtro hibridizado con la sonda Hahb-10 y el panel inferior, muestra el mismo filtro hibridizado con la sonda para ARN ribosomal. (B) Intensidades relativas expresadas en unidades arbitrarias cuantificadas con el programa *Image Pro Plus*, dándole a la señal obtenida con las plantas utilizadas como control el valor arbitrario 1.

Este resultado indicaría que el factor de transcripción *HAHB10* podría participar en las vías de señalización asociadas a funciones propias de los tejidos fotosintéticos.

2.2.2.- Regulación de la expresión del gen *HAHB10* por factores ambientales.

Se analizó el efecto de distintos factores externos sobre la expresión del gen *HAHB10* en plántulas de 7 días de edad.

La figura 43 muestra que los niveles del mensajero de *HAHB10* aumentan cuando las plántulas se someten a estrés producido por choque térmico (altas o bajas temperaturas), desecación, hipoxia, NaCl o sacarosa (200 mM). Se observaron niveles de inducción similares cuando las plántulas fueron tratadas con la hormona GA₃ (100 μM) o el agente liberador de etileno Ethrel® (30 mM). Sin embargo, los niveles de expresión más significativos se obtuvieron cuando las plántulas se cultivaron en condiciones etioladas durante 7 días.

Con el objetivo de caracterizar la respuesta del gen *HAHB10* en plantas sometidas a distintas condiciones de iluminación, se realizó un ensayo en el que éstas fueron mantenidas durante 72 horas en luz. El resultado obtenido se muestra en la figura 44 e indica una variación poco significativa frente a este tratamiento.

Los resultados obtenidos sugieren que el gen *HAHB10* participaría en funciones relacionadas con los tejidos fotosintéticos, y que su expresión estaría regulada positivamente por la condición de etiolación.

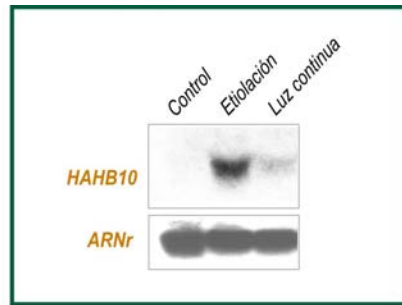


FIGURA 44: Inducción de la expresión del gen *HAHB10* en plántulas crecidas en etiolación.

Ensayo de *northern blot* en el que se sembraron 20 µg de ARN total extraído de plántulas de 7 días de edad. Las plántulas etioladas se incubaron durante 4 días en oscuridad desde el momento de la germinación. Las plantulas crecidas en luz continua se cultivaron 3 días en condiciones normales y luego se mantuvieron en luz continua durante cuatro días. El panel superior muestra el filtro hibridizado con la sonda Hahb-10 y el panel inferior, muestra el mismo filtro hibridizado con la sonda para ARN ribosomal.



2.3.- ESTUDIOS FUNCIONALES DEL GEN *HAHB10* EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Arabidopsis thaliana*.

En el trabajo de Tesina realizado previamente en nuestro laboratorio por la Lic. Natalia Ceaglio, se describe la obtención de una construcción en la cual la región codificante del gen *HAHB10* se clonó bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, en el plásmido pBI 121.3, así como la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col 0 con la misma. Se obtuvieron tres líneas transgénicas (35S:A, 35S:B y 35S:C) independientes que expresaban el ARNm del gen *HAHB10* según lo analizado en un ensayo de *northern blot* (Ceaglio, 2002).

La Figura 45 presenta un ensayo de *northern blot* que muestra el nivel de expresión del gen *HAHB10* en las distintas líneas transgénicas. Se utilizó la sonda *HAHB10* 5' (ver Materiales y Métodos, VI.5) que hibridiza específicamente con el gen *HAHB10* y que no hibridiza con el ARNm de las plantas salvajes. Con este ensayo se corroboró que el gen no se silenció en las generaciones siguientes.

Con las tres líneas homocigotas obtenidas (**35S:A**, **35S:B** y **35S:C**) se realizaron los estudios de caracterización fenotípica para investigar las funciones del gen *HAHB10*.

2.3.1.- Fenotipo de plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan el gen *HAHB10*, crecidas en condiciones normales.

La primera caracterización de las plantas transformadas se realizó en las que denominamos “condiciones de cultivo normales” (ver Materiales y Métodos, VI.1.2).

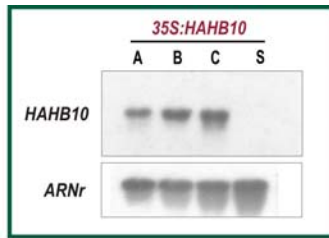


FIGURA 45: Expresión del gen *HAHB10* en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

Ensayo de *northern blot*. Se sembraron 10 µg de ARN total extraído de plántulas de *Arabidopsis thaliana*, de tres líneas independientes (A, B y C) obtenidas de la transformación con la construcción 35S:*HAHB10* y de plantas no transformadas (S). El panel superior muestra la hibridización con la sonda Hahb-10 5' (Materiales y Métodos III.5). El panel inferior, muestra el mismo filtro hibridizado con la sonda para ARN ribosomal.

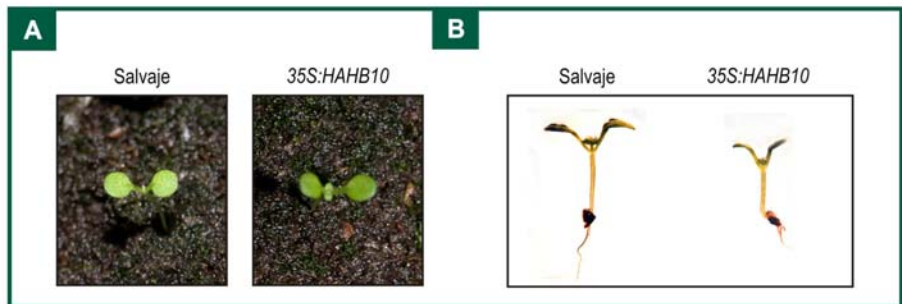


FIGURA 46: Fenotipo de los cotiledones de las plantas transformadas 35S:*HAHB10*.

Aspecto de los cotiledones de las plantas transformadas y plantas salvajes, 5 días después de la germinación.

- (A) Vista aérea.
- (B) Vistalateral.



FIGURA 47: Fenotipo de las hojas de las plantas transformadas con la construcción 35S:*HAHB10*

Comparación de la forma de la hoja entre plantas transformadas y salvajes. Hojas de 21 días de edad de plantas crecidas en tierra en condiciones normales.

Se utilizaron bandejas con 16 macetas cada una. En cada maceta, se cultivaron 3 o 4 plantas correspondientes a las tres líneas transgénicas seleccionadas, intercalando macetas sembradas con el mismo número de plantas sin transformar (salvajes).

Comparadas con las salvajes, las plantas que llevan el transgén *HAHB10*, muestran características distintivas. Cuando se cultivan en cajas de Petri, las plantas transgénicas tienen las raíces más cortas (Tabla 13). Los cotiledones son diferentes en las plantas transformadas ya que son más oscuros, están menos expandidos y forman un ángulo menor con respecto al eje del hipocótilo, a diferencia de las plantas salvajes, en las que los cotiledones se ubican perpendiculares al eje del hipocótilo (Figura 46).

Salvajes	35S:A	35S:B	35S:C
17,7 ± 2,9	14,8 ± 1,8	13,7 ± 2,2	12,7 ± 2,2

Tabla 13. Las plantas transformadas tienen raíces mas cortas.

Longitud de la raíz (expresada en mm) de plantas de 8 días de edad que sobreexpresan el gen *HAHB10* (35S:A, B y C) crecidas en placas de Petri en condiciones normales de cultivo. Las medidas de 20 plantas de cada genotipo se realizaron con una regla.

Las hojas de las plantas que llevan la construcción *35S:HAHB10*, al igual que los cotiledones, son de color verde más oscuro (Figura 47). Se midió el contenido de los pigmentos clorofilas y antocianinas y se observó una mayor concentración de los mismos en las plantas transformadas, lo que explicaría la diferencia de color (Figura 48).

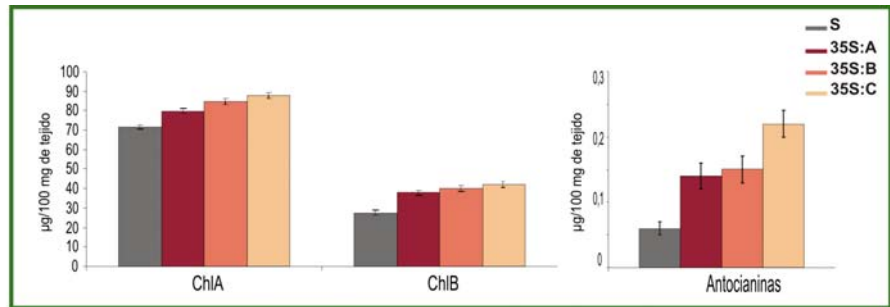


FIGURA 48: Las plantas 35S:HAHB10 tienen mayor concentración de pigmentos que las no transformadas.

Cuantificación de la concentración de clorofila A, clorofila B y antocianinas en plantas transformadas (35S:A, 35S:B y 35S:C) y no transformadas (descrito en Materiales y Métodos, III.1.2). Los valores expresan µg de pigmento por 100 mg de tejido procesado. Se utilizaron 20 plantas de cada genotipo.

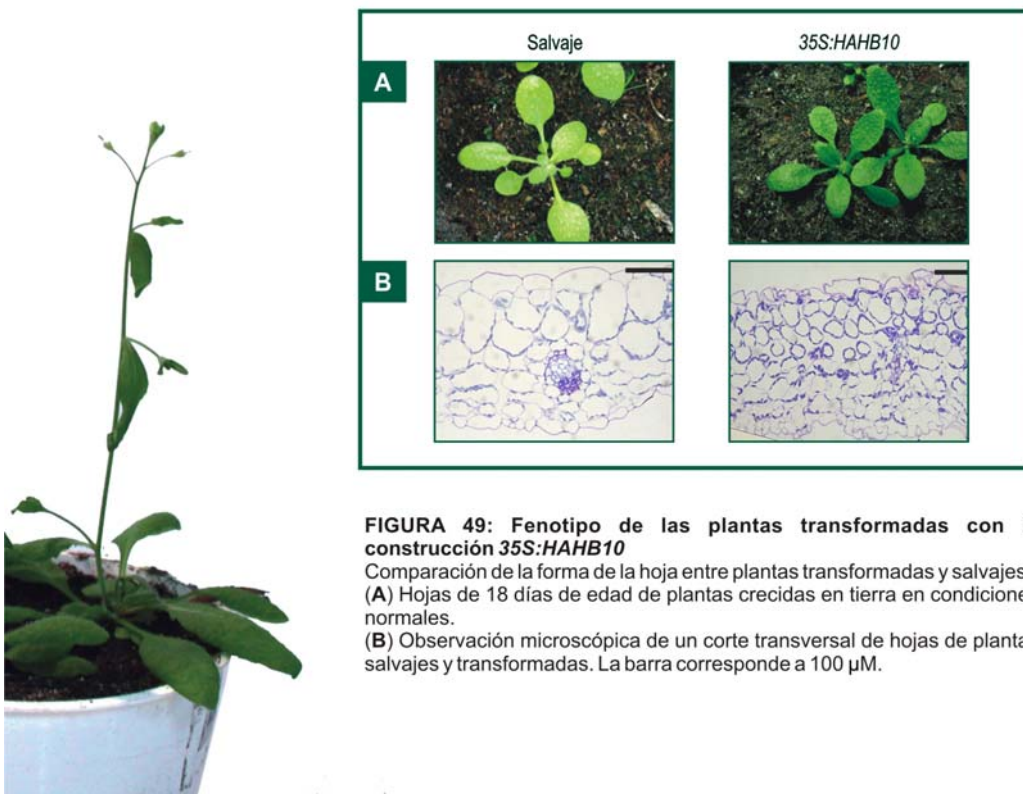


FIGURA 49: Fenotipo de las plantas transformadas con la construcción 35S:HAHB10

Comparación de la forma de la hoja entre plantas transformadas y salvajes. (A) Hojas de 18 días de edad de plantas crecidas en tierra en condiciones normales.

(B) Observación microscópica de un corte transversal de hojas de plantas salvajes y transformadas. La barra corresponde a 100 µM.

Otra diferencia morfológica que se observa en las hojas de las plantas transformadas es que éstas son más pequeñas y más planas que las de las plantas salvajes (Figura 47, 49 - A). Un corte histológico de estas hojas muestra que las células que conforman el tejido parenquimático de las mismas son más pequeñas, lo que explicaría también la mayor concentración de pigmentos (Figura 49 - B). La diferencia en la forma y en el color de las hojas se mantiene durante los estadios vegetativo y reproductivo.

Las plantas transgénicas florecen entre 5 y 7 días antes, y presentan un ciclo de vida más corto que el de las plantas salvajes. En las plantas que llevan el transgén, el primordio de la inflorescencia aparece cuando presentan 6 o 7 hojas en roseta, mientras que esto ocurre en las plantas salvajes cuando tienen 9 o 10 hojas en roseta. Por otro lado, como se muestra en la Figura 50 – A, la diferencia es visible en la longitud del tallo. Las plantas que llevan la construcción *35S:HAHB10* elongan el tallo antes que sus pares salvajes (Figura 50 - B). La diferencia en la longitud del tallo se hace menos evidente conforme al desarrollo de las plantas, mostrando el pico cuando las plantas tienen 35 días de edad. A los 45 días, esta diferencia desaparece. En esta etapa todas las plantas presentan la misma altura.

El momento de la recolección de las semillas también varía según el genotipo. Las semillas de las plantas transformadas se cosechan a los 50 días del ciclo mientras que las de las plantas salvajes a los 65 días produciendo una diferencia en la recolección de las semillas de 2 semanas. No se encontraron diferencias entre plantas transgénicas y salvajes en cuanto a la producción de semillas, medida por el peso, por planta.

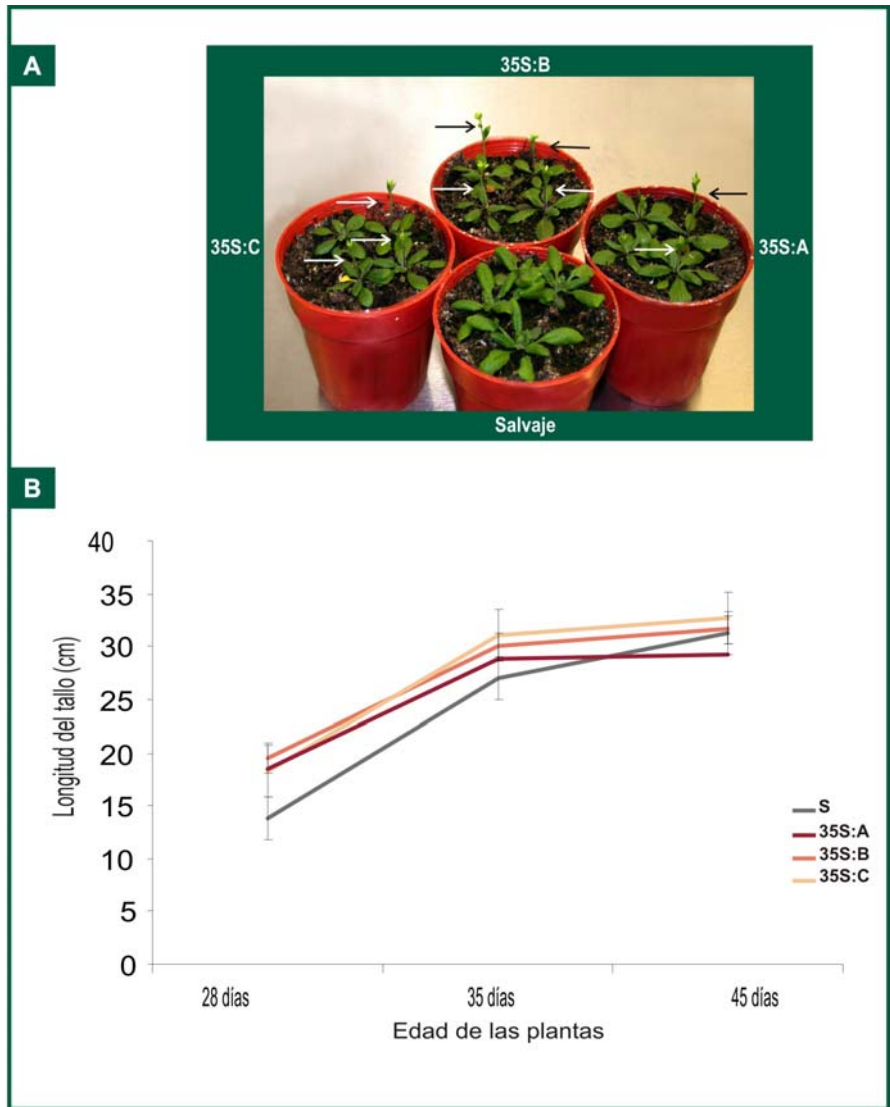


FIGURA 50: Las plantas *35S:HAHB10* se desarrollan más rápido que las plantas salvajes.

(A) Comparación del desarrollo de plantas de 21 días de edad transformadas (35S:A, 35S:B y 35S:C) y no transformadas (4 plantas por maceta).

(B) Evolución de la longitud del tallo de las plantas transgénicas (35S:A, 35S:B y 35S:C) y salvajes (S) a los 28, 35 y 45 días de edad. n = 24 individuos.

2.3.2.- Análisis del fenotipo de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas en respuesta a tratamientos con hormonas vegetales.

En el desarrollo reproductivo de las plantas, el grupo de hormonas giberelinas (GAs, distinguiéndose una de otra por un subíndice GA_{13} , GA_{20} , GA_{52} , etc.) estimulan la transición del estado juvenil al adulto como también el inicio de la floración. También regulan la elongación de las células aumentando la velocidad de la división celular y el crecimiento. Cuando se tratan plantas salvajes con GAs exógenas, la longitud del tallo aumenta como producto del incremento de la tasa de mitosis y del tamaño inducido por este grupo de hormonas (Taiz y Zeiger, 2002³).

Con el objeto de evaluar si existe un comportamiento diferencial con respecto al agregado exógeno de GA_3 , se trataron las plantas con GA_3 a una concentración de 200 μ M según se describe en Materiales y Métodos (VI.1.2). La Figura 51 muestra que en las condiciones ensayadas, las plantas salvajes tratadas con GA_3 , elongan el tallo 3,7 veces respecto de sus controles sin tratar mientras que en las plantas transformadas, este aumento es de sólo 1,6 veces. Las plantas salvajes tratadas presentan 7 hojas en roseta cuando aparece el primordio de la inflorescencia a diferencia de sus controles que presentan 10 hojas en roseta. Por su parte, las plantas transformadas presentan 7 hojas en roseta en el momento de la floración, hayan sido o no tratadas con GA_3 , mostrando cierta insensibilidad a la hormona.

Cuando se realizó una segunda aplicación de la hormona, el aumento (porcentual) en la longitud del tallo de ambos genotipos tratados fue similar, indicando que la insensibilidad observada es mayor cuando se aplica la hormona por primera vez. Es probable que esto se deba al hecho que al momento de la segunda aplicación,

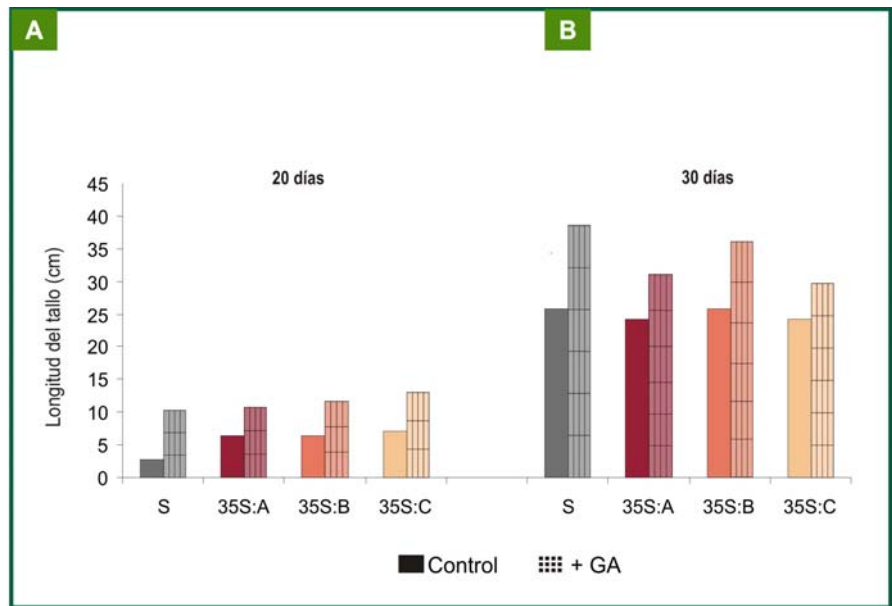


FIGURA 51: El agregado exógeno de GA₃ afecta menos a la elongación del tallo de las plantas transformadas con la construcción 35S:HAHB10.

Comparación de la longitud del tallo de plantas tratadas con la hormona giberelina (+GA₃) y plantas controles cultivadas en condiciones normales. La longitud del tallo se midió con una regla (n=20).

(A) Medición a los 20 días.

(B) Medición a los 30 días.