



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE POSGRADO.

**TAR: POSIBLE CONEXIÓN ENTRE
ETILENO Y CRECIMIENTO VEGETAL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

PRESENTA:

QFB. FERNANDO SÁNCHEZ ALBARRÁN

ASESOR:

DC. RODOLFO LÓPEZ GÓMEZ.

CO-ASESOR:

DC. PLINIO GUZMÁN V.

Morelia Mich. Agosto 2012

IIQB

Agradecimientos:

A mis asesores DC Rodolfo López y Plinio Guzmán Por su apoyo durante esta etapa de mis estudios.

Al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, por la oportunidad de realizar éste posgrado.

Al Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas, del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por el espacio y el equipo para desarrollar la fase experimental de la tesis.

Al CONACYT por el apoyo económico, sin el cual no habría podido realizar el posgrado.

Al CINVESTAV por la oportunidad de realizar una valiosa estancia en el laboratorio de regulación post-transcripcional en el campus de Irapuato Gto.

A los MC. Luis M. Suárez y Laura Aguilar por el apoyo, orientación y paciencia en ésta etapa de mi formación.

A los compañeros del laboratorio de FMP por su ayuda en incontables ocasiones.

A mis padres Profrs. Santiago E. Sánchez Q. y Susana Albarrán V., mis hermanos Santiago y Vania y mi familia toda sin los cuales no podría haber llegado tan lejos.

Y gracias a Jorge Enrique M. H. y José Adrián D. S, por apoyarme y darme ánimos cuando los necesité y por soportarme cuando el cansancio y la presión me hicieron más insoportable.

Con cariño para mi tía y madrina *GABY*[†], que me
dejó sus consejos y su ejemplo.

Y para mis 3 nuevos hermanos
Tania, Samantha y Fer.

CONTENIDO

RESUMEN:	1
ABSTRACT:	3
INTRODUCCION:	5
CITOCINÉISIS VEGETAL Y PATELINAS:	6
REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO:	9
AUXINA.	12
CITOCININA:	14
GIBERELINA.....	16
BRASINOESTEROIDES:.....	18
ETILENO:	19
ETILENO Y CRECIMIENTO VEGETAL.....	21
EVITAR LA INMERSION	23
EVITAR LA SOMBRA	25
BUSQUEDA DE NUTRIENTES.	26
TIGMOMORFOGÉNESIS DURANTE ESTRES MECANICO.	26
ESTRES POR DROGAS.	27
OTROS GENES DE CONTROL DEL CRECIMIENTO:	28
ARGOS y ARGOS-LIKE:	28
ANTECEDENTES:	31
JUSTIFICACIÓN:	33
HIPOTESIS:	34
OBJETIVOS:	35
MATERIALES Y MÉTODOS:	36
BIOINFORMÁTICA:	36
MATERIAL VEGETAL:.....	37
AISLAMIENTO DE GENES:.....	38
MODELACIÓN Y CONSTRUCCIONES GENÉTICAS:	39
ENSAYO DE DOS HÍBRIDOS EN LEVADURA (2HY):.....	40
REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA:.....	42
RESULTADOS:	43
ANÁLISIS DE SECUENCIA Y EXPRESIÓN DE TAR	43
ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE TAR EN GENOMAS VEGETALES	44
GENOTIPIFICACION	46
INTERACCIÓN TAR-PATELINA:.....	48
DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y PERSPECTIVAS:	52
RESUMEN DE RESULTADOS	58
CONCLUSIONES.....	59
BIBLIOGRAFIA:	60
APENDICE:.....	66
VECTORES DE CLONACIÓN UTILIZADOS.	66

FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.- Esquema de la citocinesis en la célula vegetal: 1-3 formación del fragmoplasto; 4,5 Formación del plato celular y división final.	7
Figura 2.- Mecanismo de Acción de patelinas. Modificada de Peterman et. al. 2004	8
Figura 3.- Proyección confocal (A) y simple (B) de una punta de raíz de tabaco; la fluorescencia indica la presencia de patelinas. Tomado de Peterman et. al. 2004	8
Tabla 1.-Hormonas vegetales, función y efecto en el crecimiento de las plantas	11
Figura 4.- Respuestas mediadas por etileno a diferentes retos ambientales. Modificado de Pierik et. al. 2007.	22
Figura 5.- Efecto del gen ARGOS en plantas de <i>A. thaliana</i> . a) De izquierda a derecha: 35S-anti-ARGOS, Control (vector), 35S-ARGOS. b) Número de células por cm ² . Modificado de Hu, Xie y Chua 2003.....	28
Figura 6.- Efecto de ARL.- a) de Izquierda a derecha: planta con gen inhibido: ARLi, Control, Planta con gen sobreexpresado: ARL-OE. b) Número de células por cm ² . Modificado de Hu et. al. 2006.	29
Figura 7.- Alineamiento de ARGOS y ARGOS-Like. Resaltados las regiones hidrofóbicas en negro y el motivo rico en prolinas en azul. Tomado de Hu et. al. 2006.....	29
Figura 8.- Microarreglo genes de respuesta a etileno. En Rojo se observa la expresión de un gen de respuesta a etileno que supera los niveles de expresión del Factor de Respuesta a Etileno (ERF 1) en azul. Com. Pers. Plinio Guzmán.	30
Tabla 2.- Semillas con inserciones disruptivas.	36
Tabla 3.- Cebadores para PCR.....	37
Figura 9.- Alineamiento de TARs del genoma de <i>A. thaliana</i> . (SEA-VIEW).....	42
Figura 10.- Localización de los genes TAR en un fragmento del genoma de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Se observan: TAR 1 (At2g41230), TAR 2 (At2g41225) y TAR 3 (At2g41233). Modificada de http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress	42
Tabla 4.- Muestra los homólogos encontrados en la base de phytozome.	43
Figura 11.- Árbol filogenético de genes homólogos de TAR.	46
Tabla 5.- Diseño del experimento de 2hy. P= prueba, C= Control.	47
Figura 12.- 2HY de TAR2.- Una ausencia total de interacción, el único crecimiento se observa en el medio de recuperación (-T-L).....	49
Figura 13.- Control de fondo 2HY. Se observa un marcado fondo con interacciones incluso en los medios más astringentes.	49
Figura 14.- Control positivo. Muestra un fondo moderado pero con interacciones notables dentro del rango del experimento.	50
Figura 15.- Control positivo. Demuestra una fuerte interacción que supera el fondo.....	50

ABREVIATURAS:

ARGOS: Auxin-Regulated Gene involved in Organ Size (Gen regulado por auxina envuelto en el tamaño de los órganos)

ARL: ARGOS-LIKE

PITP: Phospho Inositol Transfer Protein (Proteína Fosfoinositol Transferasa)

GOLD: Golgi Interact Domain (Dominio de interacción con el Golgi)

PI: Fosfoinositol

PC: Fosfatidilcolina.

AVP1: Pirofosfatasa Vacuolar de *Arabidopsis*

Aux: Auxina

IAA: Ácido Indol Acético

iaa (x): Genes Aux/IAA

ARF: Factor de Respuesta a Auxina

CRF: Factor de Respuesta a Citocinina

ERF: Factor de Respuesta a Etileno

GA: Giberelina

PHOR1: Photoperiod Responsive (Responsivo a fotoperiodo)

CPD: Constitutive Photomorphogenesis Dwarfism (Enanismo fotomorfogénico constitutivo)

ACC: 1-aminociclopropano 1-ácido carboxílico

ANT: AINTEGUMENTA

CTAB: Bromuro de Hexametil trimetil amonio

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

YPAD: Medio de levadura con Adenina

TEL: Tris, EDTA, Litio

DMSO: Dimetil Sulfoxido

2HY: Ensayo de dos híbridos en levadura

GAL4: Gen de la subunidad alfa de la beta galactosidasa

SD: Medio mínimo para levaduras

BIFC: Fluorescencia de complementación bimolecular

OSR: Organ Size Related (Relacionado con el tamaño de órganos)

PATL: Patellinas

RESUMEN:

En la naturaleza es muy común observar una infinita variedad en el tamaño de las diferentes plantas y sus órganos; hojas, tallos, flores y frutos pueden tener variaciones en el orden de los varios miles de veces entre especies, pero en una misma especie, y cuando las condiciones de crecimiento han sido parecidas, el tamaño de éstos varía en proporciones prácticamente insignificantes. (Busov et. al. 2008). Éste fenómeno conduce a pensar que el desarrollo del tamaño y la forma de los órganos vegetales es objeto de un estricto, ordenado y eficiente sistema de regulación seguramente genético. (Busov et. al. 2008). El descubrir los procesos (y más aún los mecanismos que regulan los procesos) ha sido el tema de ocupación de muchos estudiosos durante los últimos años; sin embargo, como en toda ciencia, el responder una pregunta genera muchas más y, hasta la fecha, no se ha hecho más que ampliar éste campo de estudio de la regulación del crecimiento. Cuando se encuentran las hormonas se tuvo que buscar las proteínas involucradas en la síntesis de éstas, luego los receptores, después las cascadas de transducción de las señales, entonces los genes blanco y así continuar ahora con la investigación de éstos genes, así como el mecanismo con el que participan en la regulación del crecimiento. Éste trabajo versa sobre la identificación de un gen de respuesta a etileno, en el laboratorio del DC Guzmán (CINVESTAV-Irapuato) el RNAm del gen At2g41230 de *Arabidopsis* mostró una temprana y fuerte inducción. Al identificar y caracterizar éste gen se encontró que tiene un alto grado de homología con ARGOS

y ARGOS-LIKE (ARL), así como la existencia de un motivo rico en prolinas que pudiese corresponder a un motivo de interacción proteína-proteína. Un análisis en busca de las posibles interactoras arrojó como candidatas a las patelinas. En la búsqueda del gen (At2g41230) en la base de datos del genoma de *Arabidopsis*, se detectó la presencia de 2 presuntos genes en tándem (At2g41225 y At2g41233), que aunado a la homología con ARGOS conduce a que los nombremos TAR (Tándem ARGOS). De un análisis filogenético se observó que están presentes en una gran variedad de plantas, monocotiledóneas y dicotiledóneas, además de una copia única en *Physcomitrella patens*; un musgo. Parecen formar una familia ancestral con ARGOS y ARL y además son inducidas por diferentes hormonas. De un experimento de dos híbridos en levadura (2YH) se determinó que TAR 2 (At2g41225) no interactúa con patelinas, pero no se ha descartado la interacción de TAR1 (At2g41230) y TAR 3 (At2g41233). Finalmente un estudio con líneas de *Arabidopsis thaliana* con inserciones disruptivas en los genes TAR mostró una carencia de fenotipo al silenciar solo un gen del tándem, lo que sugiere la teoría de una posible redundancia en su función.

ABSTRACT:

In the nature is very common to found a large variety on plant size and form. They can vary a thousand times between species, but in the seem species and common conditions the difference is null (Busov et. al. 2008). This lead us to think that the organ form and size development is tight regulated by an efficient and ordered genetic program (Busov et. al. 2008). Discover, study and understood the process and mechanisms of that genetic program has being the hot topic of several scientists around the globe in the past years, but the answers has bring with them new questions increasing the field of study in the plant growth and development regulation. When the hormones were found the synthesis paths were needed, then the receptors and after that the transduction signal pathways and once the target genes were found, the new mechanisms of those genes get the attention of the scientists. This paper is about the study of an ethylene response gen, in the laboratory of Guzmán the *Arabidopsis* At2g41230 RNAm shows to be increased in early and strong way. This shows homology and a putative conserved domain with those who will be known as ARGOS and ARGOS- LIKE (ARL), this homology domain have a proline rich region that can work as protein-protein interaction domain; a 2HY prescreening shows a putative interaction with proteins known as patellins that were involved in the cell plate development during plant citokinesis. This work is about the identification of a gen (At2g41230) of early response to ethylene, the distribution of this gen among the plant genomes, and the attempt to confirm interactions between

this gen and patellin. A search on *Arabidopsis thaliana* genome shows a couple of putative tandem repeats (At2g41225 & At2g41233) this together with the homology with ARGOS lead to name them as TAR (Tandem ARGOS). They exist in a quite long variety of monocotyledonous and dicotyledonous and there is a single copy in *Physcomitrella patens*, that is a moss. TAR looks to be part of an ancestral family with ARGOS and ARL were they are induced by different hormones, seems to be a chance of that has being an ancestral gene that evolve and diversified to accomplish a large variety of functions. In the two hybrid on yeast assay TAR 2 (At2g41225) has shown not have any interaction with any of candidate proteins, but can't refuse the interaction of TAR 1 (At2g41225) and TAR 3 (At2g41233). Finally an study with insertional lines of *Arabidopsis thaliana* has not shown any phenotype when just one of TAR is silenced supporting the theory of function redundancy.

INTRODUCCION:

El crecimiento y desarrollo de los órganos vegetales consiste en la multiplicación, diferenciación y especialización de las células que conforman una planta.

El fenómeno del crecimiento vegetal depende de la presencia de tejidos aptos para la división celular. Tejidos de esta clase se llaman meristemas (del griego meristos, dividido). Los tejidos meristemáticos se observan en el extremo superior del tallo, el ápice de las raíces y en la zona del cámbium.

La mayoría de las células meristemáticas provienen de células embrionarias. Conforme las células forman el primer embrión se dividen y toman caminos distintos, unas formarán la parte apical de la planta, de las cuales surgirán tallo y hojas; mientras que otras la basal de la cual se formarán las raíces.

Las células jóvenes o embrionarias, que en un inicio constituían la totalidad del embrión son dispersadas en diferentes estructuras; dependiendo de la planta en cuestión. En las plantas más sencillas sólo se mantienen algunos meristemas apicales en el tallo y las raíces centrales; se trata de plantas generalmente con ciclo corto y de tallos herbáceos. En otras plantas superiores encontramos que poseen además tejidos meristemático a todo lo largo de los tallos, en la delgada capa llamada cámbium, justo entre el xilema y floema. Estas plantas suelen formar tejido fibroso en anillos concéntricos; suelen ser leñosos y de ciclos

muy largos (plantas perennes).

Independientemente de la ubicación del meristemo, en éste se desarrollará siempre una intensa actividad de división y elongación celular, esas células se especializarán según la función para la cual sean requeridas, ya sea como células fotosintéticas y/o metabólicas; o ya sea como estructuras de soporte.

CITOCINÉISIS VEGETAL Y PATELINAS:

Durante la replicación de las células un paso fundamental es la división, también llamada citocinesis, en el cual las células hijas se independizan. Las células vegetales dividen su citoplasma durante la citocinesis construyendo una nueva pared y membrana desde el interior, en medio de los dos grupos de cromosomas. (Peterman et. al. 2006) Este proceso inicia cuando el fragmoplasto, un arreglo específico del citoesqueleto, es ensamblado a partir de los remanentes del huso mitótico en la anafase tardía y conduce vesículas derivadas del Golgi que transportan material de pared celular al plano de división (Figura 1) (Peterman et. al. 2004). La fusión de éstas vesículas permite el crecimiento radial del plato celular hasta formar una división completa en la célula.

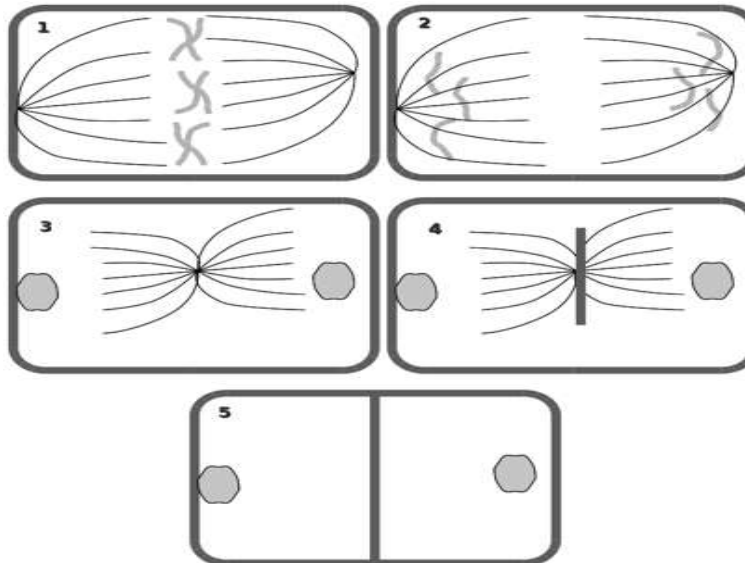


Figura 1.- Esquema de la citocinesis en la célula vegetal: 1-3 formación del fragmoplasto; 4,5 Formación del plato celular y división final.

Las patelinas son proteínas fosfoinositol transferasas (PITP [phospho-inositol transfer protein]) que se encuentran en plantas; son capaces de transportar monómeros de fosfolípidos entre bicapas lipídicas (Figura 2); Basado en su localización en el plato celular se les llamó patelinas del latín “patella” que significa “pequeño plato”; y en estudios previos se les ha asociado con la maduración del plato celular durante la fase de citocinesis en la célula vegetal (Peterman et. al. 2004), pudiendo participar en los procesos de reconocimiento y fusión de las vesículas que transportan material de pared celular para favorecer el crecimiento del plato celular.

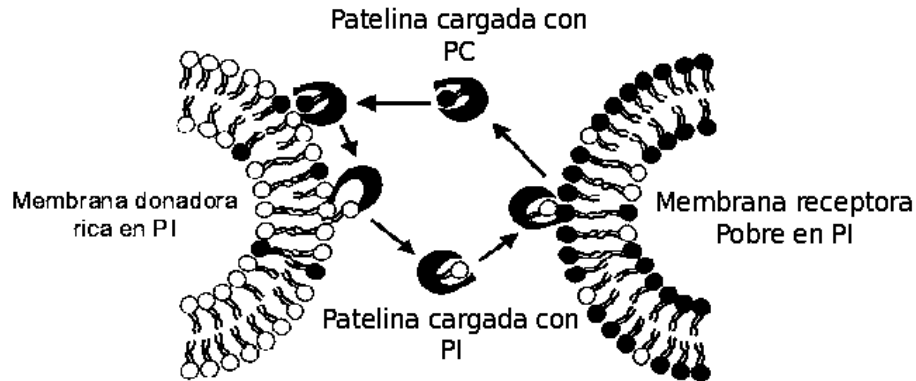


Figura 2.- Mecanismo de Acción de patelinas. Modificada de Cockcroft 2001

Se han reportado varias proteínas de éste tipo caracterizándose por la presencia de 2 dominios bien conservados a saber el GOLD (Golgi interact domain) y el sec14 relacionado con el transporte de fosfolípidos. También se han caracterizado por su afinidad a ciertos fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfoinositol y sus derivados). Su actividad en meristemas (Figura 3) demuestra su participación en el crecimiento de las plantas; ya que podemos observar su presencia y actividad en los planos de división de la célula.

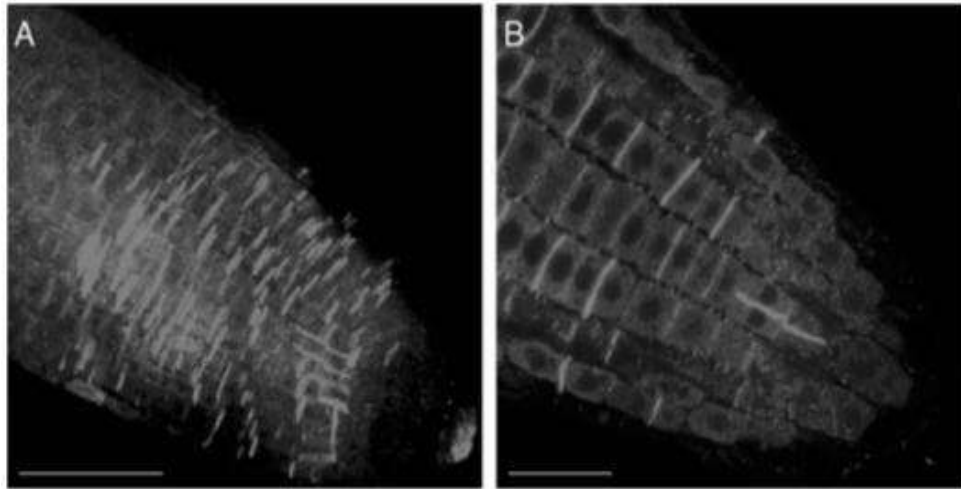


Figura 3.- Proyección confocal (A) y simple (B) de una punta de raíz de tabaco; la fluorescencia indica la presencia de patelinas. Tomado de Peterman et. al. 2004

Esta división y multiplicación celular afectará en forma directa el crecimiento de la planta y junto con los procesos de elongación y especialización de la célula determinará el tamaño final de los órganos de ésta.

REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO:

Al observar la variedad y diversidad de formas y tamaños en los diferentes órganos vegetales salta a la vista que entre especies tenemos una variabilidad de varios miles de veces en el tamaño de hojas y/o frutos, pero en una misma especie, con condiciones de desarrollo similares esta diferencia es muy sutil. Este hecho nos habla de un estricto control genético sobre el desarrollo de las plantas; éste control genético ha sido objeto de un fuerte estudio desde hace algunos años y a la fecha se han identificado genes involucrados en la regulación de señales, en la síntesis de hormonas e incluso en el control de ciclo (Busov et. al. 2008). A pesar de los avances éstos genes representan solo una minúscula porción de

aquellos que se involucran en la compleja red de regulación del crecimiento. Sus funciones de control y el lugar en el que se ejercen son solo algunas piezas dentro de un complejo rompecabezas de la bioquímica vegetal.

Aunque las rutas clave que limitan el crecimiento de los órganos en insectos y mamíferos fueron caracterizados (Dong et. al. 2007), las contrapartes de muchos factores que determinan el tamaño de órganos en insectos y mamíferos no fueron encontrados en plantas, sugiriendo que el mecanismo detrás de éste difieren de aquel en animales. Dado su estilo de vida sésil y la organogénesis postembrionaria, el crecimiento de órganos en plantas es también muy influenciado por señales internas y ambientales, incluyendo hormonas vegetales, luz, temperatura y nutrientes, y el tamaño final es altamente influenciado por el efecto combinado de estas señales durante la organogénesis (Tsukaya 2003, Tsukaya 2005)

En plantas, el crecimiento de un órgano a su tamaño característico ocurre en dos fases, sucesivas pero traslapadas; la fase de proliferación celular, durante la cual el número de células incrementa dramáticamente, y la subsecuente fase de expansión celular, durante la cual las células se expanden a su tamaño apropiado (Mizukami 2001; Anastasiou y Lenhard 2007). Éstas dos fases, son referidas como “crecimiento por proliferación celular” y “crecimiento por expansión celular” respectivamente (Anastasiou y Lenhard 2007). En hojas de *Arabidopsis* muchas de las células comienzan la fase de expansión cuando la de proliferación se detiene gradualmente desde la punta a la base de la hoja, de cualquier manera, aún

existen algunas células que mantienen la competencia meristemática para continuar dividiendo y formando el tipo específico de célula en cada capa celular (Anastasiou y Lenhard 2007), sugiriendo que la proliferación y expansión celular es controlada coordinadamente en el desarrollo (Tsukaya y Beemster 2006).

Estos procesos están regulados por diferentes hormonas vegetales; Una hormona vegetal es una sustancia que producida en un tejido puede actuar sobre éste mismo o en otro distante y afectar su desarrollo y/o funciones; hasta el momento se han estudiado diversas sustancias que afectan el crecimiento, desarrollo y especialización de las células vegetales (Tabla 1) Sin embargo el proceso bioquímico por el cual se alteran éstos procesos continúa siendo un fértil campo de estudio.

Tabla 1.-Hormonas vegetales, función y efecto en el crecimiento de las plantas

HORMONA	FUNCION	EFECTO
AUXINA	Elongación Celular	Incrementa el tamaño de las células.
CITOCININA	División Celular	Incrementa la división celular.
GIBERELINA	Diferenciación Celular	Induce la floración.
BRASINOESTEROIDES	Crecimiento y Desarrollo	Participa en procesos de expansión, división y diferenciación celular en los tejidos jóvenes.
ETILENO	Escisión y senescencia	Desencadena los procesos de senescencia y escisión de hojas y frutos.

Las hormonas vegetales son los principales reguladores de crecimiento y desarrollo, y tienen efectos dramáticos en la estatura, forma y fisiología (Busov et. al. 2008).

Éstas hormonas cubren un papel de mensajeros y ejercen su acción a través de una complicada red de activación y/o represión de genes en la planta; la compleja interacción entre los diferentes receptores, las cascadas de transducción de señales y los mecanismos de represión y activación de éstos genes dan lugar a una amplia gama de respuestas en el control del crecimiento y desarrollo de las plantas.

AUXINA.

Probablemente no existe un solo aspecto del crecimiento y desarrollo de una planta que no sea afectado por auxina (Davies 1995, Leyser y Berleth 1999). La multiplicidad de respuestas a auxina refleja el rol central que esta hormona juega en coordinar los efectos de crecimiento y desarrollo, y por lo tanto no es de sorprender que los genes involucrados en biosíntesis y transducción de señales de auxina puedan ser fuertes modificadores del tamaño y forma de las plantas (Busov et. al. 2008)

Debido a que la auxina actúa dependiendo de la concentración y los gradientes de auxina sirven como una señal de posicionamiento, las plantas han desarrollado un intrincado sistema de transportadores de auxina que regulan la distribución de la hormona (Friml y Palme 2002).

La teoría ácida del crecimiento postula que la excreción de protones estimulada por auxina, hacia la pared celular causa la acidificación y la dilatación de la pared celular permite la expansión... La recientemente clonada AVP1 (Pirofosfatasa vacuolar de *Arabidopsis*) provee evidencia que soporta esta hipótesis (Grebe 2005; Li et. al. 2005). Además de mantener el pH vacuolar, AVP1 fue localizado en la membrana plasmática y su sobreexpresión incrementa el transporte de auxina, así como la pérdida de función lo disminuye. Particularmente interesantes fueron los fenotipos de sobreexpresión, donde la expresión ectópica de la proteína incrementa el número de las hojas de roseta y el tamaño de la hoja, principalmente vía el incremento del número de células. La sobreexpresión fue acompañada por un aumento similar en el tamaño de la raíz.

Una de las marcas distintivas de la respuesta a auxina en plantas es la fuerte y rápida inducción de los genes Aux/IAA (auxina/indol, ácido acético) (Abel y Theologis 1996) Ellos son los genes de respuesta primaria a auxina, lo que implica que su activación no necesita síntesis de proteína de novo. (Busov et. al. 2008). Las mutaciones en algunos de éstos genes presentan fenotipos como: hipocotilos cortos (*iaa3*, *iaa7*, *iaa17*) o largos (*iaa18*); incremento en dominancia apical (*iaa17*) con

menos ramas laterales; disminución de dominancia apical (iaa28) con aumento en las ramas laterales; un efecto inverso es inducido en la raíz con iaa17 aumentando las raíces laterales y con iaa28 disminuyéndolas. Además la supresión mediante expresión anti-sentido de IAA9 en tomate (*Lycopersicon esculentum*) induce la conversión de las hojas compuestas en hojas simples, una elongación de hipocotilo y una disminución en la dominancia apical.

La familia ARF (Factor de Respuesta a Auxina) es parte de los genes importantes para la función de ésta hormona. El miembro fundador de la familia ARF, ARF1, fue descubierto usando el sistema de un híbrido debido a su propiedad de unirse al elemento cis de respuesta a auxina (AuxRE) encontrado en los promotores de muchos genes regulados por auxina (Ulmasov et. al. 1997).

Aunque muchos mutantes de pérdida de función en un solo gen ARF no muestra defectos en crecimiento y desarrollo, presuntamente por la redundancia en la función entre los 23 miembros, algunas mutaciones dobles tienen un efecto significativo en la estatura y forma (Okushima et. al. 2005). Por ejemplo las mutantes arf7/arf19 muestran un tallo de florescencia delgado y corto; un aumento en la dominancia apical y una reducción y retraso en la formación de raíces laterales. (Okushima et. al. 2005).

CITOCININA:

Es una hormona identificada en traqueofitas, musgos y algas, y

nombrada así por su habilidad de promover la citocinesis. La primera fue extraída del maíz (*Zea mays*) y nombrada por lo tanto como Zeatina, es la más común de las citocininas naturales; las cuales son derivados de adenina sustituidos en N6. Su función es balancear el crecimiento aéreo y subterráneo (Skoog y Miller 1957)

Un lugar especialmente importante en la producción de citocininas es la punta de las raíces desde donde se transporta por el xilema al sistema de ramas; esta síntesis y redistribución es dirigida por estímulos ambientales (Van Staden y Wareing 1972).

Los factores de respuesta a a citocinina (CRF) son proteínas ERF-like inducidas por citocinina, CRF 2,5 son inducidas de forma rápida (< 30 minutos) mientras que CRF6 es inducida más lentamente. CRF 1,3,4 demuestran una leve o nula respuesta ante citocinina. Mutantes *crf* simples muestran un efecto pobre de penetración en el desarrollo de los cotiledones (3-5%). En todos los mutantes CRF identificados aparecen pequeñas muescas en los cotiledones y ocasionalmente en las primeras hojas verdaderas, sugiriendo que existen áreas localizadas donde se restringe la división y expansión celular. En mutantes *crf* múltiples el fenotipo de penetración logra alcanzar arriba del 50% en el mutante *crf* 1,2,5; esto sugiere una redundancia en la función de los CRFs, *crf* 1,2,5 forma cotiledones muy reducidos y blancos o translúcidos. Por su parte un mutante triple del receptor a citocinina *ahk* 2,3,4 muestra un reducido tamaño de cotiledones por una baja expansión celular, lo que contrasta con otros estudios sobre el tamaño de la 7ª hoja donde se demuestra

que la reducción en tamaño de ésta es debido a un reducido número de células. (Riefler et. al. 2006).

El triple mutante de crf muestra fenotipos no presentes en el triple mutante ahk, lo que indica que algunos de éstos pudieran ser independientes de la citocinina. Los mutantes crf ocasionalmente afectan a hojas juveniles, sin embargo los mutantes dobles crf 5/crf 6 son letales para los embriones, en mutantes dobles de ambos alelos la expresión de CRF5 genómico restaura la viabilidad de los embriones, lo que sugiere que la función de CRF 5 y 6 son redundantes e indispensables para el desarrollo embrionario (Rashotte et. al. 2006).

GIBERELINA.

Las giberelinas (GAs), son una compleja familia de diterpenoides tetracíclicos reguladores del crecimiento que juegan un rol crítico muchos procesos de crecimiento y desarrollo (Hooley 1994; Davies 1995).

Genes de metabolismo y respuesta a giberelina sentaron las bases de las variedades de arroz y trigo de la “Revolución Verde” (David y Otsuka 1994) y tuvieron un enfoque lógico para mejorar el rendimiento de los cultivos por ambas vías, hibridación convencional e ingeniería genética (Sakamoto et. al. 2003)

Algunas propiedades de los genes metabólicos y de respuesta a giberelina les hacen particularmente atractivos como blancos para su manipulación,

primero, muchos de los genes actúan en forma dependiente de la concentración, permitiendo la generación de un gradiente de respuestas fenotípicas (Cowling et. al. 1998) Segundo, efectos fenotípicos similares pueden ser obtenidos en especies heterólogas (Hynes et. al. 2003; Busov et. al. 2006). Finalmente en contraste con muchas otras modificaciones por hormona vegetal, los efectos pleiotrópicos son usualmente positivos, con respecto al rendimiento del cultivo, incluyendo incremento en asimilación de nitrógeno (Nagel y Lambers 2002), fotosíntesis (Biemelt et. al. 2004) y producción de raíces laterales (Busov et. al. 2006).

GA20ox y GA3ox son enzimas biosintéticas que catalizan los últimos dos pasos en la ruta de biosíntesis (Busov et. al. 2008). Mutantes de pérdida de función en los genes GA20ox y GA3ox o sobreexpresión de los genes GA20ox, tienen un efecto de enanismo que se ha observado en numerosas especies de planta incluyendo *Arabidopsis* (Sun y Kamiya 1994; Helliwell et. al. 1998; Yamaguchi et. al. 1998) arroz (Sakamoto et. al. 2001) papa (*Solanum tuberosum*, Carrera et. al. 2000) y álamo (Busov et. al. 2003). En contraste mutantes de sobreproducción de GA con actividad biosintética hiperactivada o una reducida actividad catabólica suele presentar una extrema elongación de los brotes (Martin et. al. 1999; Carrera et. al. 2000).

DWARF1 (D1) en arroz es el único gen que codifica una subunidad alfa de de la proteína G heteromérica (Ashikari et. al. 1999). El bloqueo de ése gen causa una reducción de estatura y hojas color verde oscuro, similares a las plantas de

arroz con deficiencia en GA; sin embargo mutaciones en el ortólogo de *Arabidopsis* en el que también existe una sola copia del gen no muestra el fenotipo enano que se observa en arroz (Ullah et. al. 2001).

PHOTOPERIOD RESPONSIVE (PHOR1) (Amador et. al. 2001); el bloqueo antisentido de éste gen causa un fenotipo semienano similar a aquellos mutantes del metabolismo de GA y su sobreexpresión resulta en un crecimiento mejorado.

SLEEPY fue inicialmente identificado como un supresor de la mutante insensible al ácido abscísico de *Arabidopsis abil-1* y su pérdida de función causa fenotipos enanos y de follaje verde oscuro típicamente asociado a mutantes de la señalización o metabolismo de GA (Amador et. al. 2001).

BRASINOESTEROIDES:

Los brasinoesteroides (BRs) son una clase de más de 40 derivados de esteroides en plantas que tienen profundos efectos en el tamaño y arquitectura de las plantas. (Busov et. al. 2006) . El Brasinolido es el brasinoesteroide más bioactivo encontrado hasta la fecha (Choe et. al. 2001). Se encontró que DWARF4 codifica una enzima P450 con una alta homología al CPD (Constitutive Photomorphogenesis Dwarfism o Enanismo fotomorfogénico constitutivo). La pérdida de función produce un fenotipo enano, mientras que la sobre expresión causa un fuerte efecto de promoción del crecimiento en *Arabidopsis* y tabaco (*Nicotiana tabacum*) que fue

similar al de la aplicación exógena de BR bioactivo. La altura de las plantas transgénicas de *Arabidopsis* fue 40% mayor que el tipo silvestre, y resultó principalmente por continuar el crecimiento más allá de 35 días después de la germinación, cuando las plantas silvestres habían cesado la elongación. La altura fue similar pero más modestamente (14%) incrementada en tabaco. En ambos *Arabidopsis* y tabaco DWF4 incrementó la longitud del peciolo y la superficie de la hoja e incrementó las ramas laterales (Busov et. al. 2008).

En cereales la deficiencia de brasinoesteroides es asociada con un incremento en la erección de las hojas, lo que es un importante mejora porque incrementa la fotosíntesis en las hojas bajas y permite un crecimiento normal bajo condiciones de siembra muy densas en granjas (Feldmann 2006).

DWARF4 en arroz, es codificado por dos genes, OsDWRAF4LI y OsDWARF4 (Sakamoto 2006). La pérdida de función de OsDWARF4LI resulta en fenotipos semienanos con semillas pequeñas, mientras que mutaciones knockout en OsDWARF4 producen un enanismo más modesto sin afectar el tamaño de la semilla e incrementando la erección de la hoja. Bajo condiciones de alta densidad y nitrógeno las plantas que poseían el alelo mutante *osdwarf4-l* produjeron 40% más biomasa. Las plantas *osdwarf4-l* mostraron un incremento en rendimiento de grano (17-20%). Diferencias en biomasa y rendimiento de grano fueron menos dramáticas bajo condiciones de cultivo de densidad normal.

ETILENO:

La naturaleza química simple del etileno contrasta con su complejidad regulatoria; Esto se ilustra por la multiplicidad de genes codificando las enzimas claves ACC-sintasa, ACC-oxidasa, múltiples receptores de etileno y componentes de transducción de señal, y la complejidad de los pasos regulatorios involucrando relevadores de señales, control de RNAm y síntesis de proteína. En adición existe una extensa red de interacción con otras hormonas. (Lin, Zhong y Grierson 2009)

El etileno se ha estudiado como una hormona vegetal, sus efectos dentro de las plantas incluyen la senescencia y escisión de frutos, hojas y otros órganos; la germinación de semillas, inducción de raíces, desarrollo de pelos radiculares, desarrollo de flores, determinación de sexo, maduración de frutos, senescencia y respuesta a estrés biótico (como ataque de patógenos) y abiótico (como heridas, hipoxia y frío) (Lin, Zhong y Grierson 2009) se le ha vinculado en los procesos de respuesta a infecciones y su efecto en los procesos de crecimiento ha sido denominado como «triple respuesta a etileno»; éste fenotipo es observado en plántulas etioladas de dicotiledóneas, consiste en la inhibición del hipocotilo y la elongación de la raíz, un hinchazón radial del hipocotilo y las células de la raíz y un exagerado gancho apical cuando son tratados con etileno o su precursor ACC, (Lin, Zhong y Grierson 2009)

El etileno tiene actividad biológica a 1ml/l que corresponde a 6.5×10^{-9} M a 25°C. El etileno puede disolverse tanto en membranas lipídicas y la fase acuosa

de las células, pero es ~14 veces más soluble en los lípidos que en el agua, y la solubilidad disminuye con los solutos (Abeles et. al. 1992).

ETILENO Y CRECIMIENTO VEGETAL.

Como hormona vegetal el etileno puede influenciar varios aspectos en el ciclo de vida de las plantas, el crecimiento es un proceso vital en el cual también ejerce su influencia. El etileno puede verse envuelto en la inhibición, así como en la estimulación del crecimiento vegetal (Pierik et. al. 2007).

El efecto clásico y más conocido del etileno sobre el crecimiento vegetal es la inhibición de la elongación. (Abeles et. al. 1992) La inhibición en la elongación del hipocotilo y de la raíz, la inducción de un hinchamiento radial y la formación de un exagerado gancho apical comprenden los 3 componentes de lo que frecuentemente se denomina La Triple Respuesta (Guzmán y Ecker 1990; Abeles et. al. 1992) La Triple Respuesta parece ser general para muchas especies (Pierik et. al. 2007). La inhibición de la elongación del hipocotilo está limitada a plántulas crecidas en obscuridad, ya que el etileno ha demostrado ejercer el efecto opuesto a la luz en *Arabidopsis*, a saber, un significativo incremento en la elongación del hipocotilo (Smalle et. al. 1997) aunque esto parezca contradictorio al concepto de la Triple Respuesta una cantidad sustancial de trabajo que demuestra que el etileno puede estimular la elongación en un rango de especies de hábitats que se inundan frecuentemente. Ejemplos en modelos bien conocidos son el arroz de inundación (Kende, Van der Knaap y Cho 1998) y *Rumex palustris* (Voesenek et. al. 2003)

donde la elongación de brotes inducida por etileno ayuda a éstas especies a crecer fuera de la capa de agua (Voeselek et. al. 2006)

En algunas especies niveles muy pequeños pero elevados de etileno pueden incrementar, más que inhibir la elongación de la raíz, en otras solo una inhibición es observada (Visser et. al. 1997). De forma similar, un vistazo más cercano a las relaciones dosis-respuesta en la elongación de plántulas etioladas de *Arabidopsis* revela que , aún ahí la situación no es tan clara como se suele pensar (Pierik et. al. 2007). Consistente con la idea de que el etileno actúa como un inhibidor del crecimiento, las mutantes insensibles al etileno en *Arabidopsis* reportaron ser más largas que las cepas silvestres (Hua et. al. 1995). Pero estudios recientes en *Arabidopsis*, petunia y tabaco revelan un rango de crecimiento relativo idéntico para las plantas insensibles a etileno y sus contrapartes silvestres (Tholen, Voeselek y Poorter 2004).

El etileno puede participar en la adaptación al ambiente; ésto es evidente en retos ambientales como inundaciones o competencia donde las respuestas resultantes ayudan a la planta a evitar la adversidad (Figura 4). (Pierik et. al. 2007)

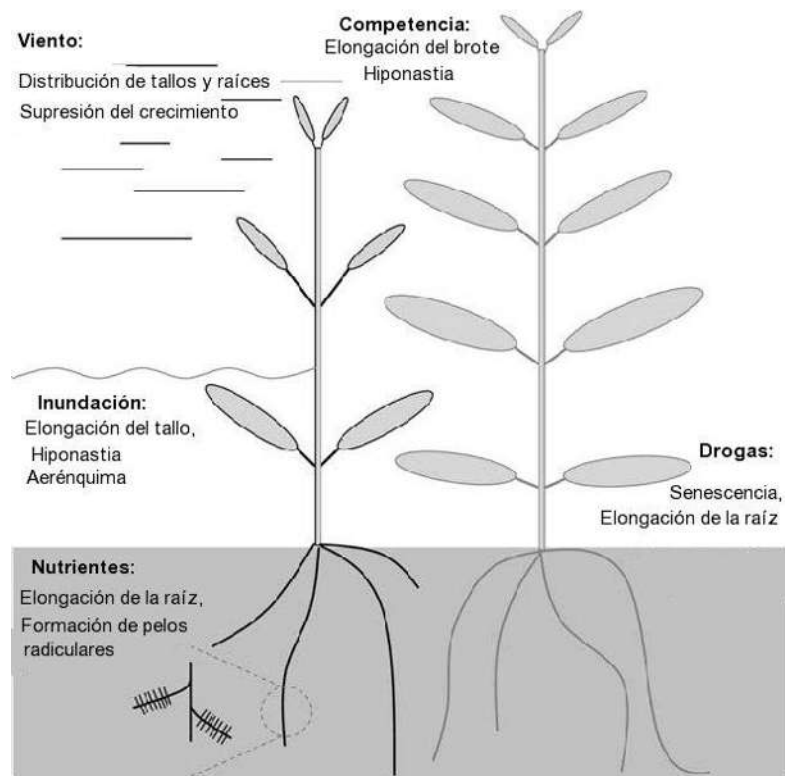


Figura 4.- Respuestas mediadas por etileno a diferentes retos ambientales. Modificado de Pierik et. al. 2007.

EVITAR LA INMERSION

Hay especies que pueden sobrevivir inundaciones severas, algunas de ellas a través de impresionantes estrategias de evasión (Voeselek et. al. 2006). El etileno, se cree es la señal primaria para detectar condiciones de inmersión, y una señal de iniciación de traducción de las vías que llevan a un aumento en el crecimiento de brotes (Voeselek et. al. 2006). Esto favorece que la planta logre irrumpir más allá de la capa de agua que la cubre. El etileno también incrementa la respuesta a giberelina durante la inmersión en arroz de inundación y *R. palustris* (Hoffmann-Benning y Kende 1992). Estas hormonas también regulan el crecimiento

diferencial del peciolo inducido por etileno a una orientación más vertical (crecimiento hiponástico; Cox et. al. 2004), una respuesta similar se observó en *Arabidopsis* (Millenaar et. al. 2005).

Recientes desarrollos en la investigación sobre arroz ha identificado un sitio genómico, Sub1 que regula una estrategia de “quietud” en cultivares de arroz que no exhiben una fuerte elongación inducida por inmersión (Xu y Mackill 1996). El etileno puede regular ambos, la inhibición y la estimulación de la elongación de raíces, incluso en especies donde la elongación de los brotes es fuertemente promovida por el etileno. Por ejemplo mientras que la elongación del peciolo se incrementa tres veces aproximadamente con 5 ppm de etileno en *R. palustris*, con solo 1 ppm de etileno se puede producir una inhibición de cuatro veces en la elongación de la raíz (Visser et. al. 1997). La inhibición puede representar una desventaja pero en ella puede aportar algunos beneficios. Estos pueden incluir la formación de canales de aire longitudinales (aerénquima; He, Morgan y Drew 1992), que pueden permitir a los gases, especialmente O₂, difundir desde los brotes emergentes hasta el sistema radicular (Colmer 2003). Así el etileno puede inducir un bloque de respuestas que juntas facilitan mucho la aireación de la planta completa, respuestas que ayudan a evitar la hipoxia dentro de la planta y ayudan a algunas especies de plantas terrestres a sobrevivir varios meses de anegamiento (Van Eck et. al. 2006; Mommer et. al. 2006)

EVITAR LA SOMBRA

Además de la percepción de competidores vecinos, muchas especies muestran un grupo de respuestas colectivamente llamadas “evitar la sombra” (Ballaré 1999; Franklin y Whitelam 2005). Ésta incluye hiponastia y un aumento en la elongación de tallo y peciolo, comportamientos reminiscentes de las respuestas para evitar la inmersión ya discutidas. Plantas en las que los mecanismos de síntesis y percepción de etileno son alterados pueden perder la capacidad de reaccionar a éstos estímulos y así ser inferiores como competidores. Plantas de tabaco transgénicas insensibles al etileno, generadas por la inserción del receptor mutante *etr1-1* de *Arabidopsis*, fueron competidores inferiores comparadas con sus vecinos silvestres (Pierik et. al. 2003) de forma interesante la acumulación de biomasa en monocultivos transgénicos o con plantas creciendo en aislamiento fue muy similar a la que obtuvo la cepa silvestre (Pierik et. al. 2004b). La producción de etileno en muchas especies está controlada por el radio rojo:rojo-lejano (R:FR) de la radiación (Finlayson et. al. 1999; Pierik et. al. 2004a; Foo et. al. 2006; Kurepin et. al. 2006) y es considerada la primera señal para detección de vecinos en doseles muy densos. Sin embargo la detección de vecinos envuelve señales adicionales, como reducción en el rango de flujo de fotones de la luz azul (Ballaré 1999; Franklin y Whitelam 2005). La concentración de etileno en la atmósfera de los doseles de plantas de tabaco en competencia se encontró elevada en tres veces aproximadamente de 5 a 15-20 ppb en experimentos de invernadero (Pierik et. al. 2004c). Esas concentraciones fueron suficientes para inducir elongación del tallo y crecimiento hiponástico en la hoja en

plantas silvestre, ésto podría indicar que el etileno puede funcionar como una señal volátil de detección de vecinos, como pueden ser otros volátiles (Pierik et. al. 2007).

BUSQUEDA DE NUTRIENTES.

El etileno ha sido implicado en la regulación del crecimiento de la raíz y respuestas de crecimiento de raíz a diferentes disponibilidades de nutrientes (Lynch y Brown 1997). La producción de etileno es incrementada en condiciones de deficiencia de fósforo (P) en frijol común (*Phaseolus vulgaris*), así como la sensibilidad a etileno (Borch et. al. 1999). En maíz la biosíntesis de etileno puede ser reducida durante la deficiencia de nitrógeno y fósforo, pero en este caso la responsividad a etileno sigue fuertemente incrementada (He, Morgan y Drew 1992). El etileno ha demostrado ser un estimulador en mantener el crecimiento de la raíz bajo deficiencia de fósforo (Borch et. al. 1999). Cuando las raíces encuentran condiciones de pobreza en nutrientes la formación de pelos radicales puede ser aumentada, lo que aumenta la superficie del área de la raíz para absorción de nutrientes (Ma et. al. 2001). La formación de pelos radicales es sabido, se induce por la aplicación de etileno (Cao et. al. 1999).

TIGMOMORFOGÉNESIS DURANTE ESTRES MECANICO.

En la exposición a estímulos mecánicos como el viento o el contacto, las plantas exhiben un juego de respuestas que son denominadas tigmomorfogénesis (Jaffe y Forbes 1993, Braam 2005). Estas respuestas incluyen

una reducción en la elongación de brotes, en el área de la hoja y en la acumulación de peso seco, al mismo tiempo el diámetro del tallo y la distribución de raíces típicamente aumenta por la estimulación mecánica; éstos ajustes fenotípicos aumentan la resistencia de la planta a un fallo mecánico (Jaffe y Forbes 1993, Anten et. al. 2005). El aumento de etileno por estimulación mecánica es bien conocido (Abeles et. al. 1992, Emery, Reid y Chinnappa 1994) con los picos de etileno inducidos por heridas como el más conocido ejemplo (Boller y Kende 1980, Abeles et. al. 1992).

Niveles elevados de etileno pueden estimular la expresión de genes TOUCH que se cree están involucrados en las cascadas de transducción de señales desde la estimulación mecánica hasta la tigmomorfogénesis consecuente (Braam 2005). Estudios en un ecotipo alpino de *Stellaria longipes* muestra que las reducciones del crecimiento inducidas por el viento pueden prevenirse por la aplicación de un inhibidor de señales del etileno, el tiosulfato de plata (Emery, Reid y Chinnappa 1994).

ESTRES POR DROGAS.

El etileno es un regulador positivo en la senescencia de hojas inducida por drogas y un regulador negativo en la tolerancia a drogas (Pierik et. al. 2007). Recientemente un factor transcripcional (Hahb-4) de girasol (*Helianthus annuus*) se encontró que media la señalización de drogas y etileno. La sobreexpresión de Hahb-4 en *Arabidopsis* lleva a un aumento en la resistencia a drogas retrasando la

senescencia inducida por etileno, ésto puede ocurrir por disminución de la expresión de genes relacionados con la señalización de etileno, como ERF2 y ERF5 (Manavella et. al. 2006).

Otro reporte muestra una contribución positiva a la tolerancia a drogas de parte de un factor de respuesta a etileno de tomate, TERF1, expresado en plántulas de tabaco (Zhang et. al. 2005).

OTROS GENES DE CONTROL DEL CRECIMIENTO:

Uno de los principales controladores del tamaño de órganos en planta es AINTEGUMENTA (ANT). Originalmente descubierto como resultado de su efecto en el desarrollo de las flores (Elliott et. al. 1996; Klucher et. al. 1996). La sobreexpresión de ANT ha mostrado incrementar dramáticamente el tamaño de hojas y flores en *Arabidopsis* (Mizukami y Fischer 2000).

Recientemente, ANT fue relacionado como parte de una cascada de señales regulada por auxina. Un gen central de ésta cascada llamado ARGOS (Auxin-regulated gene controlling organ size o Gen regulado por auxina controla el tamaño de los órganos) fue descubierto durante un análisis de microarreglo para respuesta a auxina (Hu, Xie y Chua 2003).

ARGOS y ARGOS-LIKE:

Los Genes ARGOS (Auxin-Regulated Gene involved in Organ Size o

Gen regulado por auxina involucrado en el tamaño de los órganos) y ARGOS-Like (ARL) se han caracterizado como una parte importante en la cascada de respuesta para auxina y brasinoesteroides respectivamente y afectan la respuesta a éstos dentro del desarrollo de las plantas. Estudios de sobreexpresión del gen demuestran el efecto de éste sobre el desarrollo celular, en plantas de *Arabidopsis thaliana* en las que se sobreexpresa presentan un incremento notorio de hasta el 35% en el tamaño de sus hojas; las flores y las silicuas, entre otros órganos también se ven incrementadas (Wang et. al. 2009).

ARGOS está relacionado con la respuesta a auxina; ha sido estudiado en *Arabidopsis thaliana* (Hu, Xie y Chua 2003) y en col china (*Brassica rapa*) (Wang et. al. 2009); demostrando un fuerte aumento de tamaño debido principalmente al aumento en el número de células (Figura 5). Éste aumento viene acompañado de un retraso en el grado de desarrollo por lo tanto parece deberse a la prolongación del estado de división de las células en la planta.

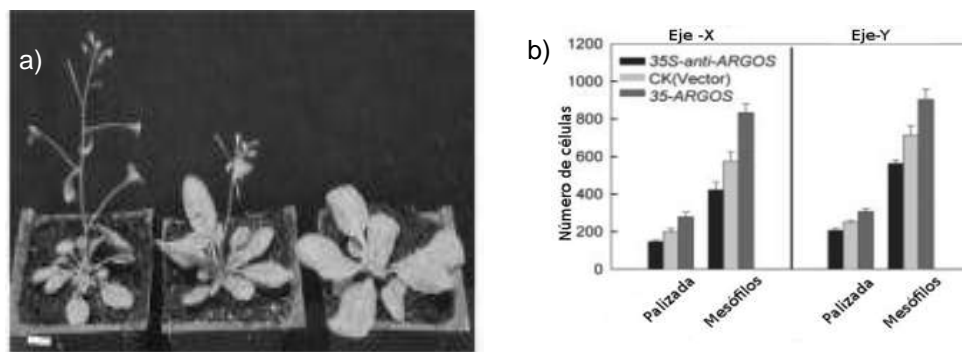


Figura 5.- Efecto del gen ARGOS en plantas de *A. thaliana*. a) De izquierda a derecha: 35S-anti-ARGOS, Control (vector), 35S-ARGOS. b) Número de células por cm². Modificado de Hu, Xie y Chua 2003

ARL (ARGOS-Like) por su parte se ha relacionado con la respuesta a brasinoesteroides y su efecto sobre el tamaño final del órgano en la planta se debe principalmente al aumento en el tamaño de las células que lo conforman (Figura 6). Siendo así es probable que su efecto sea dentro de la etapa de elongación, a diferencia del anterior.

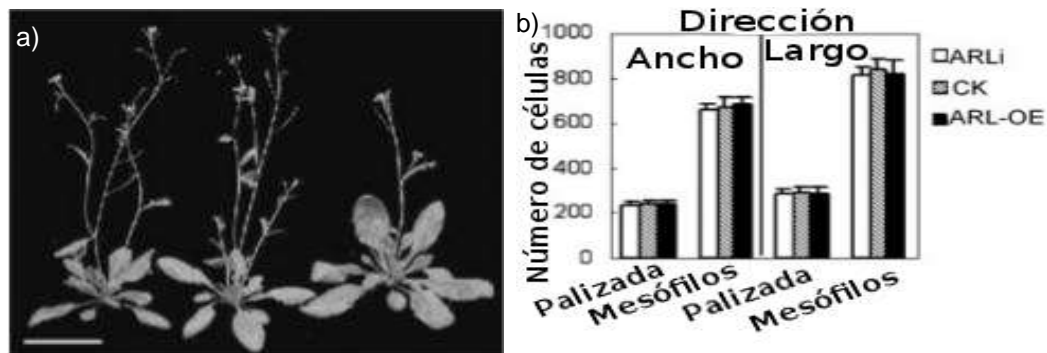


Figura 6.- Efecto de ARL.- a) de Izquierda a derecha: planta con gen inhibido: ARLi, Control, Planta con gen sobreexpresado: ARL-OE. b) Número de células por cm². Modificado de Hu et. al. 2006.

Además de su notorio efecto sobre el crecimiento ambos genes comparten una alta homología en su secuencia de aminoácidos (Figura 7) en la cual cabe destacar las regiones hidrofóbicas las cuales fueron caracterizadas como un dominio involucrado en el control del crecimiento y tamaño de los órganos (Hu et. al. 2006) y la presencia de un característico motivo de prolinas.

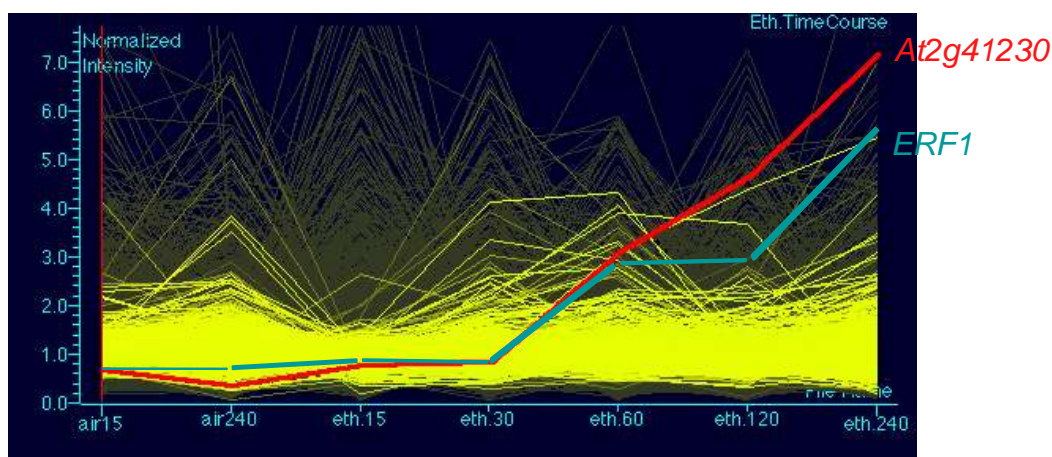
ARL	MIREFSSLQNDIINTIQEHYSLNNNHQVRCGNIRKIN	35
ARGOS	MDV-GRNIRKIN	10
ARL	TSFRGSAPAPIMGKQELFRTLSSQNSPRLISASY	70
ARGOS	MSFRSS---PEKSKQELRRSFSQK---RHHIPANY	40
ARL	FSLES [■] HVVLVGLTASLL [■] LPLILPPLPPPP [■] HILL	105
ARGOS	FSLES [■] LFLVGLTASLL [■] LPLVLPPLPPPP [■] HILL	75
ARL	IPIGIMVLLMVLA [■] FM [■] SSNSK-HVSSSSTFM	135
ARGOS	IPIGIMVLLVYLA [■] FM [■] SSHSNANTDVT [■] CMFM	108

Figura 7.- Alineamiento de ARGOS y ARGOS-Like. Resaltados las regiones hidrofóbicas y el motivo rico en prolinas (recuadro central). Tomado de Hu et. al. 2006

ANTECEDENTES:

Este trabajo parte de un estudio preliminar efectuado por Guzmán y col. en el cual se identificó un gen de respuesta temprana a etileno a través de un microarreglo de *Arabidopsis thaliana* en el cual se detectó la elevada expresión de un gen hasta ese entonces no descrito (Figura 8). Éste gen se identificó como At2g41230 y el cual presentó similitud con At3g59900 y At2g44080; los cuales posteriormente serían identificados como ARGOS y ARGOS-like respectivamente y relacionados con la regulación del crecimiento vegetal.

El transcrito de éste gen mostró la presencia de un dominio rico en prolina (PPxxPPPXXP) el cual corresponde con regiones de interacción proteína-proteína (Williamson 1994; Chen y Sudol 1995); debido a esto se realizó un ensayo preliminar de 2 híbridos en levadura con la intención de encontrar posibles proteínas



interactoras.

Figura 8.- Microarreglo genes de respuesta a etileno. Se observa la expresión de un gen de

respuesta a etileno que supera los niveles de expresión del Factor de Respuesta a Etileno (ERF 1).
Com. Pers. Plinio Guzmán.

Mediante un estudio de dos híbridos para detectar interactoras de la región rica en prolina del gen At2g41230 se detectó que las patelinas son las proteínas que presentan mayor interacción y debido a la función que éstas realizan en algunos de los procesos de citocinesis vegetal, sugieren que pudiera ser ésta la forma en que se afecta el crecimiento vegetal cuando la planta se ve expuesta al etileno.

El mecanismo propuesto consiste en que en presencia de etileno TAR es inducido, la proteína transcrita se localiza en las membranas e interactúa con patelinas bloqueando su función de transporte e inhibiendo la formación del plato celular, esto detiene el crecimiento y genera los síntomas que denominamos triple respuesta a etileno.

JUSTIFICACIÓN:

Debido a que el etileno tiene un efecto sobre el desarrollo vegetal, el cual se ha observado en diferentes plantas modelo y que es conocido como la triple respuesta, aunado a las evidencias encontradas por Guzmán y col., se considera relevante confirmar y ahondar los resultados encontrados con la zona interactora, utilizando una secuencia genómica más completa del gen At2g41230.

HIPOTESIS:

Existen copias del gen At2g41230 en las plantas superiores y éste presenta una interacción con las patelinas.

OBJETIVOS:

Analizar la distribución de la secuencia del gen At2g41230 en las plantas superiores y demostrar la interacción de la proteína con proteínas involucradas en el crecimiento vegetal.

Objetivos Particulares:

1.- Analizar la secuencia del gen At2g41230 mediante los datos obtenidos de SALK y PHYTOZOME; así como su expresión.

2.- Analizar la distribución de genes TAR en genomas vegetales utilizando aquellos reportados en la base de datos en PHYTOZOME.

3.- Genotipificación de 3 mutantes de *Arabidopsis thaliana* con inserciones disruptivas en los genes At2g41230, At2g41225 y At2g41233.

4.- Confirmar la interacción de la región rica en prolinas codificada por la secuencia genómica de TAR con patelinas y algunas otras regiones de otras proteínas ligadas al crecimiento vegetal, mediante la técnica de dos híbridos en levadura (2hy).

MATERIALES Y MÉTODOS:

BIOINFORMÁTICA:

El uso de inferencias estadísticas para analizar, comparar y discriminar datos que permitan entender procesos como la evolución y desarrollo de las especies, es un elemento que se observa en la taxonomía y en la filogenética.

Las herramientas bioinformáticas han dado un empuje sin precedentes a la investigación, los ordenadores han aportado la posibilidad de manejar cantidades exorbitantes de datos y generar simulaciones y aproximaciones basadas en modelos estadísticos que soporten éstas inferencias, así como comparaciones y búsquedas en bases de datos que de otra manera serían humanamente imposibles.

Por principio un concepto central en la inferencia filogenética es que «toda filogenia es en esencia una hipótesis», y la manera de inferir y soportar dicha hipótesis se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo. Las Matrices de sustitución de aminoácidos son un método que permite calcular la distancia evolutiva entre diferentes especies, basado en la probabilidad estadística de que ocurran ciertos cambios en la secuencia de aminoácidos (o en los codones que les codifican). Dichas matrices comparan y valoran las variaciones, reportando el grado de diferencia y transformándolo en un valor cuantitativo que permita la organización de nodos y ramas de un árbol filogenético.

La información del genoma de *Arabidopsis thaliana* y otras especies se obtuvo de las bases de datos de PHYTOZOME, (<http://phytozome.net>) y SALK (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress/>); se actualizaron los datos hasta el mes de Mayo del 2012. Fue analizada con el programa informático UGENE y se utilizó el programa SeaView para generar los alineamientos mediante el algoritmo de MUSCLE y los árboles filogenéticos mediante el método de parsimonia utilizando el algoritmo de PHYLIP. El programa informático en línea iTOL fue utilizado para ajustar la presentación de los árboles filogenéticos.

MATERIAL VEGETAL:

Para la genotipificación las semillas de *Arabidopsis thaliana* con las inserciones en los genes At2g41230, At2g41225 y At2g41233; se adquirieron en SALK (Tabla 2) . Para su germinación, se desinfectaron con hipoclorito de sodio y tween 20; se colocaron en medio sólido MS y se vernalizaron durante 3-4 días a 4°C antes de colocarse en una cámara de crecimiento a 19°C con fotoperiodo de 10 hrs durante 12-14 días para posteriormente trasplantar a una charola con mezcla peatmoss-agrolita 1:1 donde completaron su ciclo de vida en cámara de crecimiento con las mismas condiciones.

Tabla 2.- Semillas con inserciones disruptivas.

LINEA INSERCIONAL	GEN BLOQUEADO
GABY_436G04	At2g41230 (TAR 1)
SAIL_74D06	At2g41233 (TAR 3)
SALK_118678	At2g41225 (TAR 2)

La genotipificación se realizó extrayendo DNA de una hoja de roseta totalmente expandida mediante molienda en Nitrógeno líquido y extracción con CTAB 2%, precipitado con isopropanol y diluido en agua destilada estéril, según el método de Doyle y Doyle 1990; después se confirma por PCR con cebadores específicos de cada inserto contra los cebadores específicos del gen silvestre.

AISLAMIENTO DE GENES:

Se diseñaron cebadores (primers) para PCR con ayuda del programa UGENE, y éstos fueron adquiridos en SIGMA (Tabla 3). La serie prom fue diseñada para aislar y recuperar los promotores de los respectivos genes y con ellos generar construcciones de pBi 101.1 La serie OX se diseñó con la intención de aislar y recuperar el gen completo para generar construcciones en pFGC 5941. Por su parte la serie 2hy tiene por objetivo la región rica en prolinas con el objetivo de generar construcciones con pGBK-T7 (Ver Apéndice) para su uso en un ensayo de 2 híbridos en levadura.

Tabla 3.- Cebadores para PCR.

CEBADOR	SECUENCIA	TAMAÑO DE PRODUCTO (pb)	GEN
ttp25-fw-prom	TAAAGCTTGTGTGGCATATAATGCTCTT	1300	At2g41225
ttp25-rv-prom	TAGGATCCCGACGATCCTTTCGTATGTA		
ttp30-fw-prom	TAAAGCTTCACCAACAGAGTCTCATTAG	700	At2g41230
ttp30-rv-prom	TAGGATCCACTGTAGTTTATCAACT		
ttp33-fw-prom	TAAAGCTTCAACGCGAACATGGGTTGTG	1000	At2g41233
ttp33-rv-prom	TAGGATCCAGTCCCAATGAGGTCCTTTG		
ttp25-fw-OX	TACCATGGTGTGTTGTGATTGGAGTGGTGATG	450	At2g41225

CEBADOR	SECUENCIA	TAMAÑO DE PRODUCTO (pb)	GEN
ttp25-rv-OX	TAGGATCCTCACATTACATGCCTAGAAG		
ttp30-fw-OX	TACCATGGTTCATGATCAACGGCTGAGA	750	At2g41230
ttp30-rv-OX	TAGGATCCTCAGGGGTGAGAGGTTCAA		
ttp33-fw-OX	TACCATGGGATACAAACAGGAAAGTACATCA	120	At2g41233
ttp33-rv-OX	TAGGATCCTTACTGCAAGCAAAGAGAAA		
ttp25-fw-2hy	TAGGATCCTGGTGCTATTGGCGGTTCTT	120	At2g41225
ttp25-rv-2hy	TACTGCAGAATAAGCATTAGCATCAGCA		
ttp30-fw-2hy	TAGAATTCTCTCTGCTTCTTCTGATTCT	120	At2g41230
ttp30-rv-2hy	TAGGATCCAATGAGGAGAATCATGAGGA		
ttp80-fw-2hy	TAGAATTCACAGCATCTCTTGTGATCTT	120	At2g44880
ttp80-rv-2hy	TAGGATCCCATAAGCAAACCATAATCC		

Las digestiones fueron realizadas con las enzimas EcoRI, BamHI y PstI según recomendaciones del proveedor.

MODELACIÓN Y CONSTRUCCIONES GENÉTICAS:

En el estudio de expresión y función de los genes en ocasiones es necesario introducir un gen exógeno en un organismo, esto nos permite evaluar diferentes características de éste gen, en cuanto a su expresión, traducción y/o función dependiendo de las características del gen y del organismo donde se va a insertar.

Es útil en ocasiones subclonar un gen en vectores que permitan la obtención de un mayor número de copias, ya que esto nos provee de una fuente más confiable para la recuperación de material genético con el cual poder trabajar; la subclonación se realizó en el plásmido Blue-Script (pBS-KS) (Ver Apéndice).

La transformación de bacterias de *Escherichia coli* DH5-a se realizó mediante electroporación y recuperación en medios selectivos LB+antibiótico (Sambrook y Russell 2001).

La transformación de levaduras de *Sacharomices cerevisiae* AH-109 se realizó por el método de choque térmico con algunas modificaciones: Las células se cosecharon de una placa de medio YPAD de 2 a 3 días postsiembra, aproximadamente 50 microlitros de inóculo por alícuota; éstas se resuspendieron en 1ml de agua destilada estéril y se centrifugó a 1200rpm por 10 segundos. Se desechó el sobrenadante y se repitió el enjuague; Tras desechar todo resto de sobrenadante se resuspende en 100 microlitros de TEL para formar una alícuota. Para cada transformación se utilizaron 2 microlitros de DNA por cada plásmido, 4 microlitros de DNA carrier y 4 microlitros de agua destilada estéril, se agrega una alícuota de células y 1 ml de solución de polietilenglicol 40% en TEL; se mezcla perfectamente y se incuba 2 horas a 30°C; se añaden 70 microlitros de DMSO, se incuba 10 minutos a 42°C y se transfiere rápidamente a hielo por otros 5 minutos, se centrifuga 10 segundos a 12000rpm, se descarta el sobrenadante, se resuspende en 200microlitros de agua destilada estéril y se plaquea en medio selectivo. Se incuba de 2-4 días a 30°C.

ENSAYO DE DOS HÍBRIDOS EN LEVADURA (2HY):

La interacción de proteínas es un fenómeno recurrente en la biología, pero el observar dicha interacción no es fácil, de entre las estrategias, para dicho

propósito encontramos la coimmunoprecipitación, la fluorescencia bimolecular complementaria y el ensayo de dos híbridos en levadura (2HY), las cuales presentan sus propias ventajas y retos.

2HY es un sistema en el cual se generan proteínas fusionadas con factores de transcripción de ciertos genes reporteros y así, evaluando la expresión de esos genes podemos inferir el grado y tipo de interacción.

Para ello se generó una biblioteca de proteínas blanco en el plásmido pGAD-T7 (Ver Apéndice), las cuales están fusionadas con el factor activador de la transcripción del gen GAL4; las proteínas de interés se introducen en el plásmido pGBK-T7, en el cual se fusionan con el factor de unión al DNA del gen GAL4.

Ambas construcciones se introducen en una levadura (*Sacharomices cerevisiae* HA-109) mediante la técnica de choque térmico y se recuperan en medios selectivos; éstos son medios SD auxotróficos para diferentes aminoácidos. SD-T-L: sin Leucina ni Triptófano; SD-T-L-H: sin Leucina, Triptófano ni Histidina y SD-T-L-H-A: sin Leucina, Triptófano, Histidina ni Adenina. Debido a que la cepa *S. cerevisiae*. HA-109 carece de la capacidad para sintetizar Triptófano y Leucina; y al estar codificada dentro de los plásmidos, solo aquellas células que posean ambos plásmidos serán capaces de crecer en el medio SD-L-T; Los genes reporteros son ADE2, HIS3 y MEL1 involucrados en la síntesis de Histidina, Adenina y α -galactosidasa, por lo tanto la expresión de éste gen facultará a la levadura para

crecer en un medio que carezca de Histidina, también podrá desarrollarse en ausencia de Adenina. En nuestro ensayo no evaluamos la expresión de la α -galactosidasa.

Una vez se tienen cepas transformadas se evalúa por triplicado su eficiencia realizando una siembra serial desde el medio más auxotrófico (SD-T-L-H-A) hasta el menos auxotrófico (SD-T-L) y evaluando el crecimiento en éstos medios tras 2 días a 30°C.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA:

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador 2720 de applied biosystem automatizado. Las condiciones de trabajo fueron corridas de 30 ciclos con una etapa inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, después fueron ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72 grados por 1-2 minutos y una etapa final de extensión de 7 minutos a 72°C.

RESULTADOS:

ANÁLISIS DE SECUENCIA Y EXPRESIÓN DE TAR

Una revisión en el sitio de AtTOME: gene expresión atlas (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) mostró que éste gen es inducido de manera muy importante por etileno y por Ácido Indol Acético (IAA); éste último es un tipo de auxina; lo cual permite suponer que está involucrado en el control del crecimiento y desarrollo; y en la compleja red de regulación de dichos procesos.

Al realizar éste análisis también se detectó la presencia de 2 genes con alta homología (Figura 9) presentes en el genoma de *A. thaliana* y bastante próximos (Figura 10). Debido a éste posible tándem y la homología que conservan con los genes ARGOS se les denominó TAR (Tándem ARGOS) y se buscó estudiar los tres al mismo tiempo para entender sus funciones.

```

1
At2g41225 -----M FVIGVVMVLL AVLPVLPPL PPPMILMGI
At2g41230 MRVHDQRLRF DVTEKPMGLN GSSLITARSV ALLLFLSLLL LILPPFLPPL PPPATLLLL
At2g41233 -----M YNRKVHQPVP P-----VNL

61
At2g41225 PVVIMLMLIY LAIYYPPHQA HF-LSSSSFD TTSRHVM
At2g41230 PLLLMILLIF LA--FSPSNE PS-LAVEPLD P-----
At2g41233 PITSKKH--- ---WDVHAS TFSLCLQ--- -----
```

Figura 9.- Alineamiento de TARs del genoma de *A. thaliana*. (SEA-VIEW)



Figura 10.- Localización de los genes TAR en un fragmento del genoma de *Arabidopsis thaliana*. Se observan: TAR 1 (At2g41230), TAR 2 (At2g41225) y TAR 3 (At2g41233). Modificada de <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>

Cabe mencionar que los genes TAR no presentan intrones en sus secuencias y se encuentran codificados en el mismo sentido, aunque cada uno cuenta con suficiente espacio en su región promotora para ser regulado de forma independiente.

ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE TAR EN GENOMAS VEGETALES

Mediante el programa BLAST-P de la página web del phytozome, se realizó una búsqueda de las proteínas que presentaran algún grado de homología con el transcrito del gen TAR 1; realizando búsquedas recurrentes desde la versión 5.0 se obtuvieron 82 presuntos homólogos en una gran variedad de plantas, tanto monocotiledóneas y dicotiledóneas, así como la presencia de posibles tandems en varios de ellos (Tabla 4). Es importante mencionar que TAR2 y TAR3 están presentes entre éstos primeros homólogos y la búsqueda individual de proteínas homólogas para éstos TAR arroja casi las mismas especies, salvo alguna que fue añadida a la lista de resultados de la búsqueda original.

Tabla 4.- Muestra los homólogos encontrados en la base de phytozome.

ESPECIE	HOMÓLOGOS	POSIBLES TANDEM
<i>Physcomitrella patens</i>	1	-
<i>Ricinus communis</i>	2	-
<i>Arabidopsis lyrata</i>	4	2
<i>Zea mays</i>	10	2
<i>Eucalyptus grandis</i>	1	-
<i>Arabidopsis thaliana</i>	5	3
<i>Brachypodium distachyon</i>	4	2
<i>Manihot esculenta</i>	9	2 grupos de 3
<i>Cucumis sativus</i>	4	2
<i>Carica papaya</i>	2	-
<i>Glycine max</i>	7	-
<i>Oryza sativa</i>	7	-
<i>Medicago truncatula</i>	1	-
<i>Mimulus guttatus</i>	2	-
<i>Populus trichocarpa</i>	12	Uno de 6 y otro de 2
<i>Sorghum bicolor</i>	4	-
<i>Brassica rapa</i>	4	2
<i>Citrus clementina</i>	1	-
<i>Aquilegia coerulea</i>	1	-
<i>Malus domestica</i>	1	-

Tras realizar un alineamiento de éstos datos se generó un árbol filogenético (Figura 11) en el cual podemos observar la división de dos grandes familias de genes, en ambas se observa la presencia de monocotiledóneas y dicotiledóneas, se muestra además que existe una relación filogenética entre TAR, ARGOS y ARL, aunque al parecer TAR forman parte de una familia un poco diferente de la familia en la que se encuentran ARGOS y ARGOS-LIKE (Figura 11, en morado). Se aprecia además evidencia que los 3 TAR y probablemente ARGOS Y ARGOS-LIKE provienen de presuntas duplicaciones de algún gen ancestral.

Cabe destacar la presencia de un homólogo en *Physcomitrella patens*, éste es un musgo y su fisiología difiere considerablemente de la fisiología de las plantas, varias rutas metabólicas y hormonales no están presentes y sin embargo la existencia de un homólogo supone una evolución mediante duplicaciones y posterior

diversificación a partir de éste gen, por ello fue utilizado como referencia para enraizar el árbol filogenético.

GENOTIPIFICACION

En el estudio de las líneas con inserciones disruptivas todas las líneas tuvieron una buena germinación y excelente tasa de supervivencia con un aproximado de 21 sobrevivientes por cada 23 semillas, las condiciones de crecimiento fueron estándar y no hubo fenotipos notorios, aún cuando existían plantas homocigotas, queda pendiente comprobar el comportamiento de éstas líneas en retos con agentes abióticos, lo cual proveerá un panorama más amplio y detallado de las funciones y respuestas a etileno, así como de los tejidos en que suceden y el papel que juegan los genes TAR en cada uno de ellos.

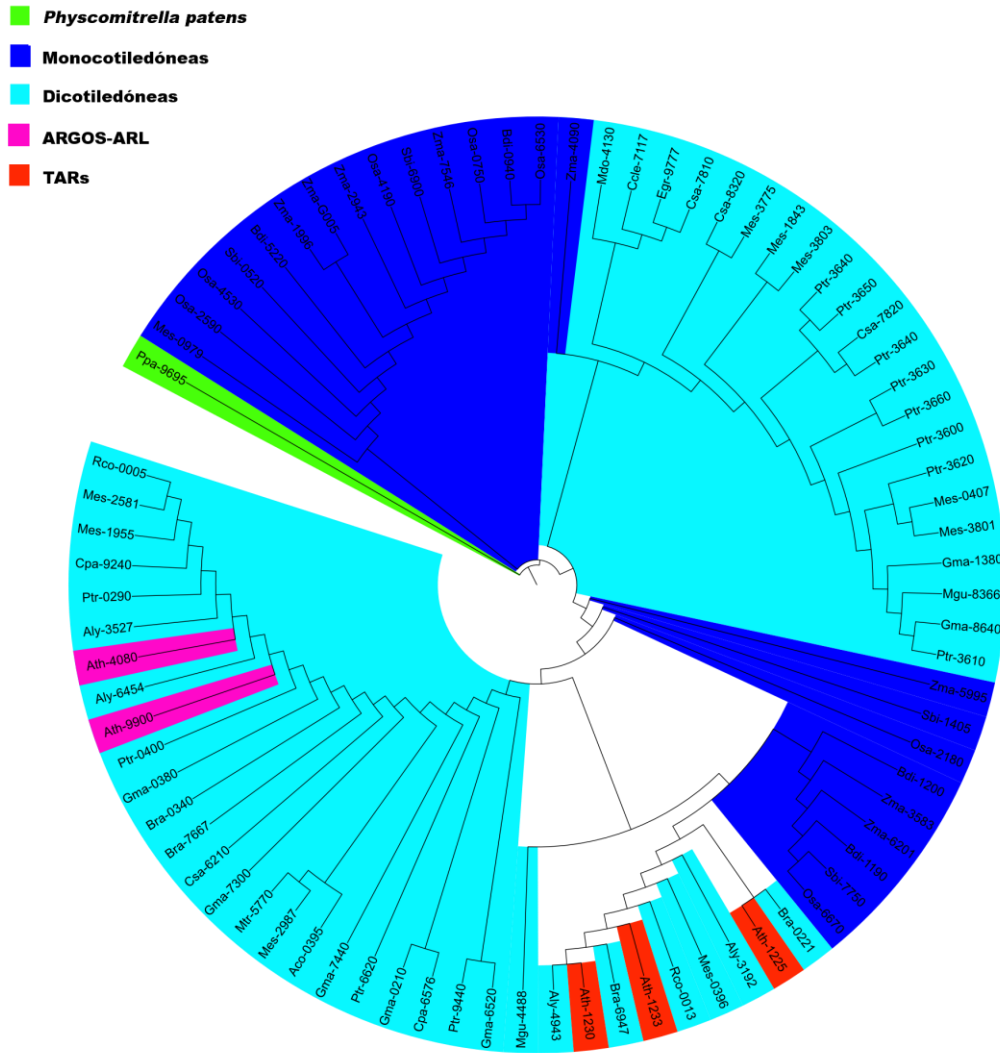


Figura 11.- Árbol filogenético de genes homólogos de TAR.

INTERACCIÓN TAR-PATELINA:

Se realizaron las construcciones genéticas en pGBK-T7 para el dominio rico en prolina de los los 3 genes TAR, así como para la misma región del gen At2g44880 (ARL), ésta última difiere en un solo aminoácido de la región presente en ARGOS, por lo tanto se le considera como representativa de ambos. Se comprobó la presencia del inserto mediante PCR con los cebadores del inserto de interés.

Estas construcciones se confrontaron con una biblioteca de 7 proteínas consideradas en el ensayo preliminar de Guzmán et al, entre ellas están patelinas, peroxidadas e isocitrato liasas. Se utilizaron transformaciones entre las construcciones y los vectores simples como control de fondo y se utilizaron las construcciones que Guzmán probó, usándolas nosotros como control positivo (K4;K12) (Tabla 5)

Tabla 5.- Diseño del experimento de 2hy. P= prueba, C= Control.

	TAR 1	TAR 2	TAR 3	ARL	pGBK
68 (peroxidasa)	P	P	P	P	C
69 (peroxidasa)	P	P	P	P	C
73 (deshidrogenasa)	P	P	P	P	C
74	P	P	P	P	C
75 (isocitrato liasa)	P	P	P	P	C
80 (patelina)	P	P	P	P	C
83 (patelina)	P	P	P	P	C
pGAD	C	C	C	C	C

Para limpiar los resultados se utilizaron concentraciones de 0.5 y 1 mM de 3AT (3-amino-1,2,4-triazol), éste es un inhibidor del producto del gen HIS 3, por lo cual es de ayuda para limpiar un poco los resultados y así poder interpretar mejor el crecimiento de la levadura.

El crecimiento fue evaluado por triplicado y las construcciones se verificaron por secuenciación. De ahí se obtuvo que solo TAR2 está en fase aún cuando ésta proteína no muestre interacción con ninguna de las 7 proteínas blanco(Figura 12). El estudio muestra además una fuerte interacción entre las construcciones de Guzmán y las patelinas (Figura 15); Confirmando los hallazgos reportados. Estos resultados aunados al marcado fondo observado entre el control de pGBK-T7 y las proteínas blanco (Figura 14), proveen una evidencia que sugiere la teoría de la diversificación en las funciones de los diferentes TAR, así el control positivo demuestra que la técnica fue realizada correctamente aunque al final solo un gen demostrara un resultado relevante.

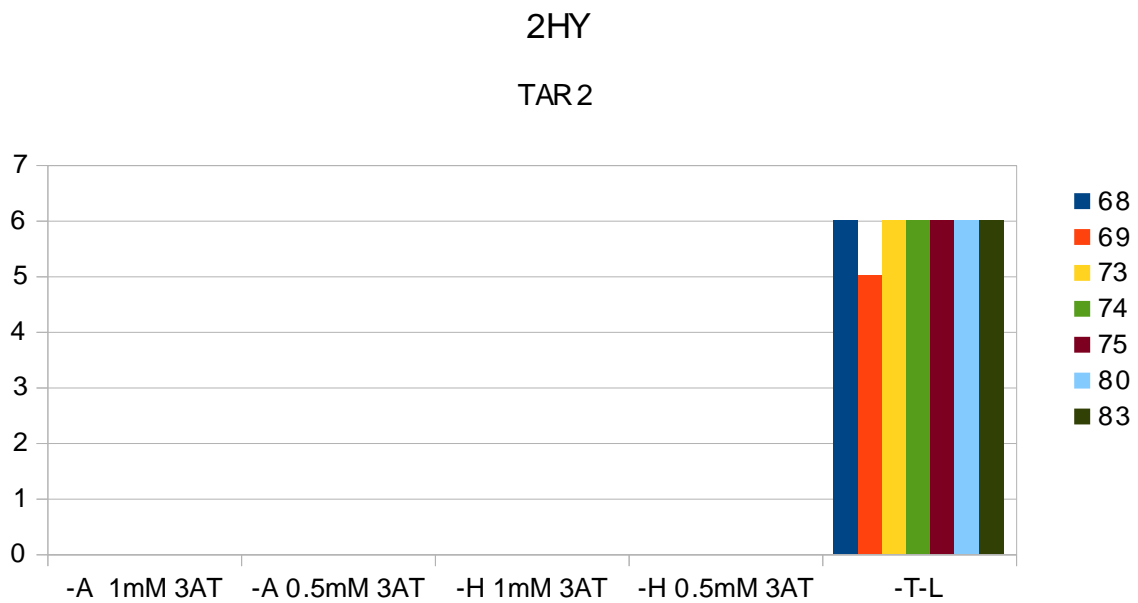


Figura 12.- 2HY de TAR2.- Una ausencia total de interacción, el único crecimiento se observa en el medio de recuperación (-T-L)

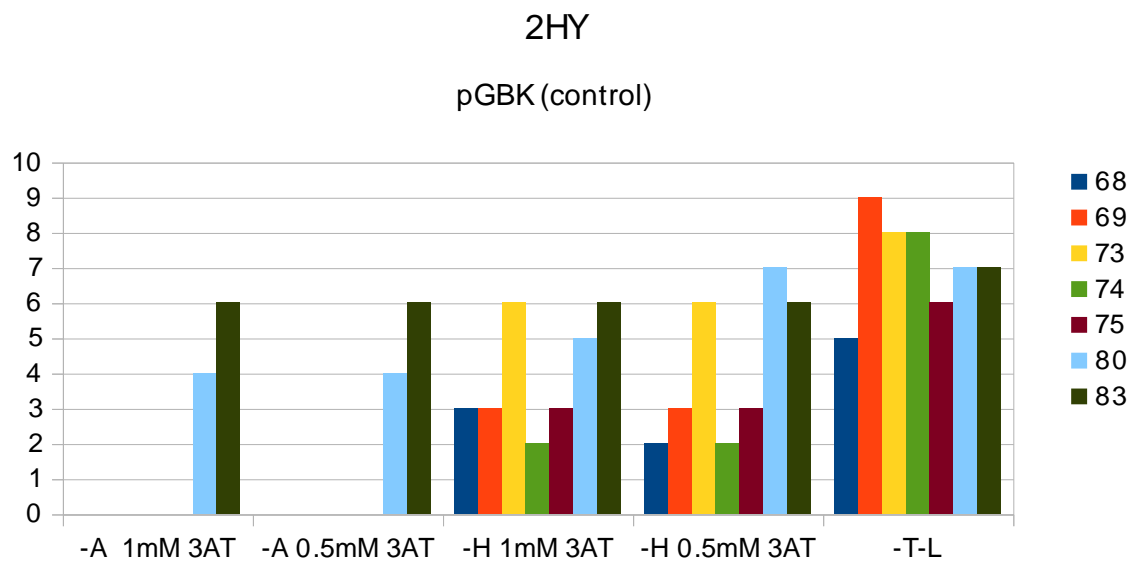


Figura 13.- Control de fondo 2HY. Se observa un marcado fondo con interacciones incluso en los medios más astringentes.

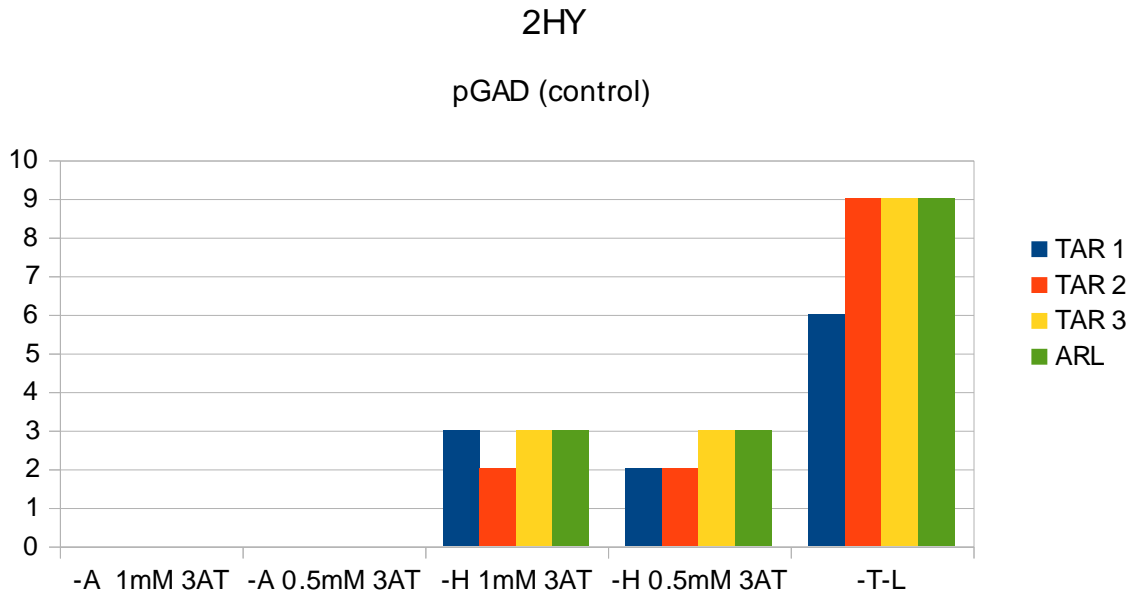


Figura 14.- Control positivo. Muestra un fondo moderado pero con interacciones notables dentro del rango del experimento.

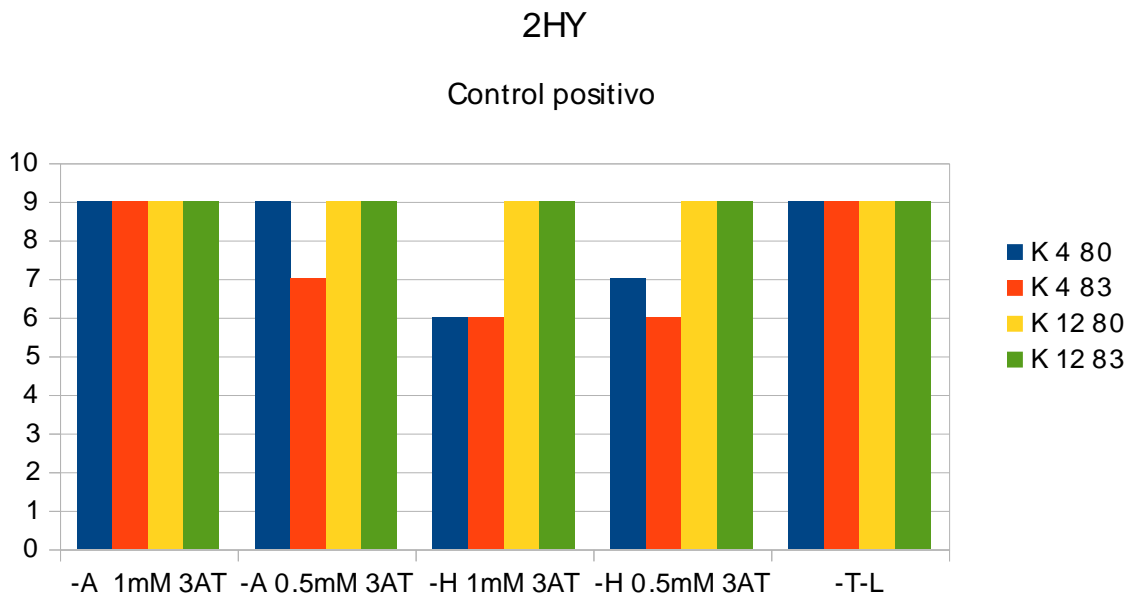


Figura 15.- Control positivo. Demuestra una fuerte interacción que supera el fondo.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y PERSPECTIVAS:

Dentro de los resultados cabe una breve discusión respecto al carácter e importancia de TAR. La presencia extendida entre diferentes especies, y la presencia de tándem en varias de ellas hace hincapié en la importancia de los procesos mediados por éstos genes. Las diferencias sutiles llevan a pensar que un gen que se duplicó al evolucionar desde el musgo *P. patens* y se fue diversificando ha generado la familia de ARGOS y ARL, Eketjall et. al. 2004 y Suyama et. al. 2006 hablan de la neofuncionalización y pseudogenización como procesos posibles de evolución tras una duplicación genética; es posible que ambas familias pasaran por ambos procesos tras diversas duplicaciones. Airoidi y Davies 2012 plantean que “La duplicación genética genera copias redundantes de genes que pueden evolucionar en diferentes formas a través de mutaciones en sus secuencias codificantes y/o regulatorias”. La presencia de dos grandes grupos bien diferenciados, así como la respuesta a diferentes hormonas sugiere que TAR, ARGOS y ARL son un claro ejemplo de éstos procesos; es posible que respondan también a más de una hormona que los regule positiva o negativamente y así controle su participación en ese orquestado proceso del crecimiento vegetal. Por ello se hace necesario estudiar de forma detallada si las familias y grupos que se observan en el estudio filogenético tienen estímulos comunes o no, lo cual nos permitiría comprender un poco mejor esta enorme familia ancestral de genes y tal vez darle una mejor organización filogenética, que nos permita entender el proceso de evolución que han seguido. Las

secuencias promotoras también son una importante fuente de información que puede ayudar a entender ésta línea evolutiva y ayudaría a arrojar un poco más de luz sobre las relaciones que comparten éstos genes. La conservación de al menos un homólogo en una variedad tan amplia de especies es indicador de la importancia del gen ya que “tras la duplicación la presión de selección favorece la retención de genes solo si la pérdida de un gen resulta en una reducción de la aptitud del organismo” (Airoidi y Davies 2012)

La ausencia de un fenotipo visible en condiciones estándar de crecimiento pudiese tener 2 explicaciones importantes. La primera que éste gen responda, no tanto a las condiciones normales de crecimiento y adaptación en las que el etileno tiene un papel más modesto, como a la batería de respuestas adaptativas al estrés biótico y abiótico, donde el etileno posee un papel más protagónico. Son necesarios estudios que evalúen la respuesta a estímulos, estrés e incluso su respuesta directa a etileno; ya que éstos nos darán una idea más completa de su función.

La segunda explicación posible consiste en la redundancia de la función de los 3 genes. Ya sea de forma directa o indirecta, es posible que otro TAR pueda cubrir las funciones del que falla. Para confirmar o rechazar ésta nueva hipótesis es necesario generar líneas que presenten un bloqueo en dos o incluso los tres TAR, y evaluar éstas en diferentes condiciones. Existen ejemplos que muestran que una cuantificación más rigurosa de los parámetros de crecimiento pueden revelar

fenotipos claros que son invisibles al ojo desnudo (Keiffer et. al. 2011). Por ello es indispensable ahondar en éstos análisis para poder asegurar la presencia o ausencia del fenotipo y sus características exactas.

Así pues es necesario aún mucho trabajo, los genes TAR solo han mostrado una pequeña parte de su potencial y aún tienen mucho que enseñarnos sobre su participación en el complejo mecanismo de respuesta a etileno.

En cuanto al ensayo de 2 HY, se obtuvo un resultado importante que evidenció las diferencias entre éstos genes, al demostrar que TAR 2 no interacciona con patelinas ni con otras proteínas cercanas. Los cambios en los genes duplicados pueden ser a nivel de la expresión genética, de la función de la proteína o en ambos (Airoldi y Davies 2012), Sin embargo el fragmento reportado por Guzmán y col. (K4, K12) muestra una fuerte y consistente interacción con patelinas, lo que nos genera un interesante misterio. Al comparar los motivos de prolina se observa la existencia de una prolina más en el motivo presente en K4, K12 y en TAR1 con respecto al motivo en TAR2, ésta diferencia pudiese tener una gran importancia para la interacción de proteínas. Además, mientras que K4 y K12 fueron diseñados mediante una extensión de 2 oligos diseñados para generar la región rica en prolinas, nuestras construcciones parten de la obtención de dicha región a partir de ADN genómico y al realizar ésta obtención los cebadores diseñados obtienen una importante fracción de los flancos hidrofóbicos que rodean el motivo de prolinas. La posibilidad de que el fragmento hidrofóbico de TAR se ancle en alguna membrana, la importancia no

aclarada de la prolina que diferenciá los motivos y la posibilidad de que existan otros factores involucrados en esa posible interacción; son elementos a considerar para poder dar una interpretación a éste resultado. De cualquier forma es posible que otras herramientas como la fluorescencia de complementación bimolecular (BIFC) que permiten un análisis in vivo e in situ de la función de la proteína, resulten más adecuadas para sanjar la discusión sobre la existencia de una interacción entre TAR – PATELINA.

En el número 191 de *New Phytologist* del 2011, Feng et. al. 2011 publican un artículo titulado “*Arabidopsis* ORGAN SIZE RELATED1 regulates organ growth and final organ size in orchestration with ARGOS and ARL”. El trabajo está enfocado en el mismo gen (At2g41230) que denominamos TAR1. Sin embargo el enfoque es un poco diferente al que planteamos.

Feng y col. Analizan los patrones de expresión, la sobreexpresión y la regulación encontrando que At2g41230 es coexpresado con ARGOS y difiere de la expresión de ARL. La sobreexpresión de éste gen muestra un incremento en el tamaño de los órganos como hojas y flores, encontrándose también un incremento en la longitud de las raíces y un retraso en la floración; el mecanismo responsable de dicho incremento parece ser una mezcla con predominancia de proliferación celular y con un incremento menos importante en la expansión celular. Otro hallazgo importante es una regulación coordinada, ya que la sobreexpresión de At2g41230 resulta en la supresión de ARGOS y ARL, así como la sobreexpresión de Argos

inhibe a ARL, lo cual sugiere que los tres genes son co-regulados durante el desarrollo de los órganos.

En el terreno que coincidimos con el trabajo de Feng y col. encontramos diferencias interesantes. A nivel de análisis filogenético ellos realizaron una búsqueda con parámetros más selectivos y obtuvieron solo 39 homólogos en 14 especies, contra los 82 homólogos de 20 especies que nosotros consideramos; ellos no consideran a At2g41233 como homólogo, sin embargo ambos coincidimos en que *P. patens* es un gen ancestral y tal vez el origen desde el cual se duplican y diversifican TAR /OSR y ARGOS/ARL.

En el análisis de líneas insercionales Feng y col. Reporta que GABI_436G04 no presenta una reducción obvia en el tamaño de órganos comparada con plantas silvestres, coincidiendo con el análisis de fenotipo que reportamos para la misma línea insercional.

En cuanto a la búsqueda de proteínas interactoras, Feng y colaboradores descartan la formación de homodímeros y heterodímeros entre TAR/OSR1, ARGOS y ARL, pero no buscan otras proteínas que pudiesen interactuar, aunque solo hemos descartado la interacción de TAR2 con las proteínas blanco, el resultado de las construcciones de Guzmán y col. Resulta bastante prometedor.

La coincidencia en estrategias, y en algunos de los resultados que se

comparten con Feng y col. Demuestran que el trabajo lleva una dirección coincidente con un equipo experimentado, en cuanto al enfoque nuestra propuesta de interacción es un paso en la búsqueda de los mecanismos moleculares por los cuales ejercen su efecto estos genes involucrados con el crecimiento.

RESUMEN DE RESULTADOS

1.- Analizar la secuencia del gen At2g41230 y su expresión: Se encontraron 2 presuntos genes en tándem, que aunado a la homología con ARGOS nos llevó a nombrarles TAR (Tándem ARGOS). Aunque éstos presentan algunas diferencias todavía por investigar. Solo existen datos sobre la expresión de TAR 1 (At2g41230) el cual es altamente inducido por etileno y por ácido indol- acético (IAA); éste último un tipo de auxina.

2.-Analizar la distribución de genes TARs en genomas vegetales: Se encontraron 82 presuntos homólogos en 20 diferentes especies, incluyendo un musgo; éstos forman un interesante árbol filogenético donde se observa una relación con ARGOS y ARL. Se plantea la posibilidad de que exista una familia de genes que se ha diversificado a lo largo del tiempo para responder a diferentes hormonas.

3.- No se observó fenotipo conspicuo en ninguna de las líneas mutantes, lo cual propone la hipótesis que exista una función redundante de los genes TAR.

4.- Confirmar la interacción TAR-PATL: Por desgracia solo obtuvimos resultados parciales. En éste momento se presume que TAR 2 No interacciona con patelinas. Es necesario confirmar con otras estrategias que permitan una evaluación más completa de esa presunta interacción.

CONCLUSIONES

1. Existen dos copias en tándem del gen At2g41230 , los tres carecen de intrones y conservan la región rica en prolinas.
2. El gen esta presente al menos en una copia en 20 especies de plantas superiores reportadas en el phytozome y su duplicidad sugiere un proceso evolutivo vegetal
3. Una inserción disruptiva en estos genes no muestra un fenotipo conspicuo en las plantas de *A. thaliana*
4. La construcción de dos híbridos del gen At2g41225, No mostró una interacción con las proteínas blanco, en comparación con el resultado obtenido cuando se prueba la región rica en prolinas aislada y por si sola.

BIBLIOGRAFIA:

- Abel Steffen, Theologis Athanasios. **1996**. "Early genes and auxin action". *Plant Physiology*. 111. 9-17.
- Abeles F. B., Morgan P. W., Saltveit M. E.. **1992**. "Ethylene in Plant Biology.". Academic Press. San Diego CA.. 1-398.
- Airoldi Chiara A., Davies Brendan. **2012**. "Gene Duplication and the Evolution of Plant MADS-box Transcription Factors". *Journal of Genetics and Genomics*. 39. 157-165.
- Amador V., Monte E., Garcia-Martinez J. L., Prat S.. **2001**. "Gibberellins signal nuclear import of PHOR1, a photoperiod-responsive protein with homology to *Drosophila armadillo*". *Cell*. 106. 343-354.
- Anastasiou Elena, Lenhard Michael. **2007**. "Growing up to one's standard". *Current Opinion in Plant Biology*. 10. 63-69.
- Anten N. P. R., Casado-Garcia R., Nagashima H.. **2005**. "Effects of mechanical stress and plant density on mechanical characteristics, growth, and lifetime reproduction of tobacco plants". *Am. Nat.* 166. 650-660.
- Ashikari M., Wu J. Z., Yano M., Sasaki T., Yoshimura A.. **1999**. "Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene Dwarf1 encodes the alpha-subunit of GTP-binding protein". *PNAS*. 96. 10284-10289.
- Ballaré C. L.. **1999**. "Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signalling mechanisms". *Trends Plant Science*. 4. 97-102.
- Biemelt S., Tschiersch H., Sonnewald U.. **2004**. "Impact of altered gibberelin metabolism on biomass accumulation, lignin biosynthesis, and photosynthesis in transgenic tobacco plants". *Plant Physiology*. 135. 254-265.
- Boller T., Kende H.. **1980**. "Regulation of wound ethylene synthesis in plants". *Nature*. 286. 259-260.
- Borch K., Bouma T. J., Linch J. P., Brown K. M.. **1999**. "Ethylene: a regulator of root architectural responses to soil phosphorus availability.". *Plant Cell Environment*. 22. 425-431.
- Braam J.. **2005**. "In touch: plant responses to mechanical stimuli". *New Phytologist*. 165. 373-389.
- Busov B. Victor, Brunner M. Amy and Strauss H. Steven. **2008**. "Genes for control of plant stature and form". *New Phytologist*. 177. 589-607.
- Busov V. B., Mellan R., Pearce D. W., Ma C., Rood S. B., Strass S. H.. **2003**. "Activation tagging of a dominant gibberellin catabolism gene (GA 2- oxidase) from poplar that regulates tree stature". *Plant Physiology*. 132. 1283-1291.
- Busov Victor, Meilan Richard, Pearce David W., Rood Stewart B, Ma Caiping, Tschaplinski Timothy J., Strauss Steven H.. **2006**. "Transgenic modification of gni or rgl1 causes dwarfing and alters gibberellins, root growth, and metabolite profiles in populus.". *Planta*. 224. 288-299.
- Cao X. F., Linstead P., Berger F., Kieber J., Dolan L.. **1999**. "Differential ethylene sensitivity of epidermal cells is involved in the establishment of cell pattern in the *Arabidopsis* root". *Physiol Plant*. 106. 311-317.
- Carrera E., Bou J., Garcia-Martinez J. L., Prat S.. **2000**. "Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants". *Plant Journal*. 22.

247-256.

- Chow Sunghwa, Fujioka Shozo, Noguchi Takahiro, Takatsuto Suguru, Yoshida Shigeo, Feldmann A. Kenneth. **2001**. "Overexpression of DWARF4 in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in Arabidopsis". *Plant Journal*. 26. 573-582.
- Colmer T. D.. **2003**. "Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots.". *Plant Cell Environment*. 26. 17-36.
- Cowling R. J., Kanya Y., Seto H., Harberd N. P.. **1998**. "Gibberellin dose-response regulation of GA4 gene transcript levels in Arabidopsis". *Plant Physiology*. 117. 1195-1203.
- Cox M. C. H., Benschop J. J., Vreeburg R. A. M., Wagemaker C. A. M., Moritz T.. **2004**. "The roles of ethylene, auxin, abscisic acid, and gibberellin in the hyponastic growth of submerged *Rumex palustris* petioles". *Plant Physiology*. 136. 2948-2960.
- David C. C., Otsuka K.. **1994**. "Modern rice technology and income distribution in Asia". Boulders. Lynne Rienner. 3-17.
- Davies J. Peter. **1995**. "Plant hormones; physiology, biochemistry and molecular biology.". Kluwer Academic Publishers. London UK. 6-7.
- Dong Jixin, Feldmann George, Huang Jianbin, Wu Shian, Zhang Nailing, Comerford Sarah A., Gayyed Mariana F., Anders Robert A., Maitra Anirban, Pan Duoqia.. **2007**. "Elucidation of a Universal Size-Control Mechanism in *Drosophila* and Mammals". *Cell*. 130. 1120-1133.
- Eketjall S., Jornvall H., Lonnerberg P., Kobayashi S., Ibanez C. F.. **2004**. "Recent evolutionary origin within the primate lineage of two pseudogenes with similarity to members of the transforming growth factor-beta superfamily". *Cellular and molecular life sciences*. 61. 488-496.
- Elliott R. C., Betzner A. S., Huttner E., Oakes M. P., Tucker W. Q., Gerentes D., Perez P., Smyth D. R.. **1996**. "AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth". *Plant Cell*. 8. 155-168.
- Emery R. J. N., Reid D. M., Chinnappa C. C.. **1994**. "Phenotypic plasticity of stem elongation in two ecotypes of *Stellaria longipes*: the role of ethylene and response to wind". *Plant Cell Environment*. 17. 691-700.
- Feldmann A. Kenneth. **2006**. "Steroid regulation improves crop yield". *Nature Biotechnology*. 24. 46-47.
- Feng Guanping, Quin Zhixiang, Yan Jingzhou, Zhang Xiaoran, Hu Yuxin. **2011**. "Arabidopsis ORGAN SIZE RELATED1 regulates organ growth and final organ size in orchestration with ARGOS and ARL". *New Phytologist*. 191. 635-646.
- Finlayson S. A., Jung I-J., Mullet J. E., Morgan P. W.. **1999**. "The mechanism of rhythmic ethylene production in sorghum. The role of phytochrome B and simulated shading". *Plant Physiology*. 119. 1083-1089.
- Foo E., Ross J. J., Davies N. W., Reid J. B., Weller J. L.. **2006**. "A role for ethylene in the phytochrome-mediated control of vegetative development". *Plant Journal*. 46. 911-921.
- Franklin K. A., Whitelam G. C.,. **2005**. "Phytochromes and shade-avoidance responses in plants". *Ann. Bot.* 96. 169-175.
- Friml Jirí, Palme Klaus. **2002**. "Polar auxin transport - old questions and new concepts". *Plant Molecular Biology*. 49. 273-284.

- Grebe Markus. **2005**. "Plant biology. Enhanced: growth by auxin: when a weed needs acid.". *Science*. 310. 60-61.
- Guzmán P., Ecker J. R., **1990**. "Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene - related mutants.". *Plant Cell*. 2. 513-523.
- He C-J., Morgan P.W., Drew M. C.. **1992**. "Enhanced sensitivity to ethylene in nitrogen -or phosphate-starved roots of *Zea mays* L. during aerenchyma formation". *Plant Physiology*. 98. 137-142.
- Helliwell C. A., Sheldon C. C., Olive M. R., Walker A. R., Zeevaart J. A. D., Peacock W. J., Dennis E. S.. **1998**. "Cloning of the *Arabidopsis* ent-kaurene oxidase gene GA3". *PNAS*. 95. 9019-9024.
- Hoffmann-Benning S., Kende H.. **1992**. "On the role of abscisic acid and gibberellin in the regulation of growth in rice". *Plant Physiology*. 99. 1156-1161.
- Hooley R.. **1994**. "Gibberellins perception transduction and responses.". *Plant Molecular Biology*. 26. 1529-1555.
- Hu Yuxin, Pho Huay Mei, Chua Nam-Hai. **2006**. "The *Arabidopsis* ARGOS-LIKE gene regulates cell expansion during organ growth". *The Plant Journal*. 47. 1-9.
- Hu Yuxin, Xie Qi, Chua Nam-Hai. **2003**. "The *Arabidopsis* Auxin-Inducible Gene ARGOS Controls Lateral Organ Size". *The Plant Cell*. 15. 1951-1961.
- Hua J., Chang C., Sun Q., Meyerowitz E. M., **1995**. **1995**. "Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis* ERS gene.". *Science*. 269. 1712-1714.
- Hynes L. W., Peng J., Richards D. E., Harberd N. P.. **2003**. "Transgenic expression of the *Arabidopsis* DELLA proteins GAI and gai confers altered gibberellin response in tobacco". *Transgenic Research*. 12. 707-714.
- Jaffe M. J., Forbes S.. **1993**. "Thigmomorphogenesis - the effect of mechanical perturbation on plants". *Plant Growth Regulation*. 12. 313-324.
- Keiffer M., Master V., Waites R., Davies B., **2011**. "TCP14 and TCP15 affect internode length and leaf shape in *Arabidopsis*". *Plant Journal*. 68. 147-158.
- Kende H., Van der Knaap E., Cho H-T.. **1998**. "Deepwater rice: a model plant to study stem elongation". *Plant Physiology*. 118. 1105-1110.
- Klucher K. M., CHow H., Reiser L., Fischer R. L.. **1996**. "The AINTEGUMENTA gene of *Arabidopsis* required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene APETALA2". *Plant Cell*. 8. 137-153.
- Kurepin L. V., Walton L. J., Reid D. M., Pharis R. P., Chinnappa C. C.. **2006**. "Growth and ethylene evolution by shade and sun ecotypes of *Stellaria longipes* in response to varied light quality and irradiance.". *Plant Cell Environment*. 29. 647-652.
- Leyser Ottoline, Berleth Thomas. **1999**. "A molecular basis for auxin action.". *Developmental Biology*. 10. 131-137.
- Li J., Yang H., Peer W. A., Richter G., Blakeslee J., Bandyopadhyay A., Titapiwantakun B., Undurraga S., Khodakovskaya M., Richards E. L., Krizek B., Murphy A. S., Gilroy S., Gaxiola R.. **2005**. "*Arabidopsis* H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development". *Science*. 310. 121-125.
- Lin Zhefeng, Silin Zhong, Grierson Don.. **2009**. "Recent advances in ethylene research". *Journal of*

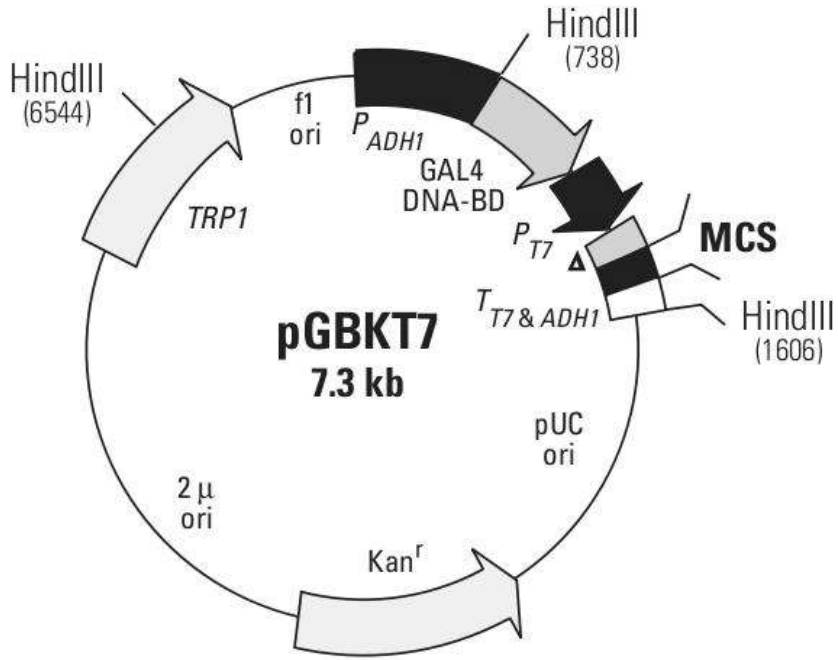
- Experimental Botany. 60. 3311-3336.
- Lynch J., Brown K. M.. **1997**. "Ethylene and plant responses to nutritional stress". *Physiol Plant*. 100. 613-619.
- Ma Z., Walk T. C., Marcus A., Lynch J. P.. **2001**. "Morphological synergism in root hair length, density, initiation and geometry for phosphorus acquisition in *Arabidopsis thaliana*: a modeling approach.". *Plant Soil*. 236. 221-235.
- Manavella P. A., Arce A. L., Dezar C. A., Bitton F., Renou J-P.. **2006**. "Cross-talk between ethylene and drought signalling pathways is mediated by the sunflower Hahb-4 transcription factor". *Plant Journal*. 48. 125-137.
- Martin D. N., Proebsting W. M., Hedden P.. **1999**. "The SLENDER gene of pea encodes a gibberellin 2-oxidase.". *Plant Physiology*. 121. 775-781.
- Millenaar F. F., Cox M. C. H., van Berkel Y. E. M., Welschen R. A. M., Pierik R.. **2005**. "Ethylene-induced differential growth of petioles in *Arabidopsis*. Analyzing natural variation, response kinetics, and regulation". *Plant Physiology*. 137. 998-1008.
- Mizukami Y., Fischer R.L.. **2000**. "Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis". *PNAS*. 97. 942-947.
- Mizukami Yukiko. **2001**. "A matter of size: developmental control of organ size in plants". *Current Opinion in Plant Biology*. 4. 533-539.
- Mommer L., Lenssen J. P. M., Huber H., Visser E. J. W., de Kroon H.. **2006**. "Ecophysiological determinants of plant performance under flooding: a comparative study of seven plant families". *Journal Ecology*. 94. 1117-1129.
- NAgel G. W., Lambers H.. **2002**. "Changes in the acquisition and partitioning of carbon and nitrogen in the gibberellin-deficient mutants A70 and W335 of tomato (*Solanum lycopersicum* L.)". *Plant Cell and Environment*. 25. 883-891.
- Okushima Yoko, Overvoorde J. Paul, Arima Kazunari, Alonso Jose M., Chan April, Chang Charlie, Ecker Joseph R., Hughes Beth, Lui Amy, Nguyen Diana, Onodera Courtney, Quach Hong, Smith Alison, Yu Guixia y Athanasios Theologis. **2005**. "Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*; unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19". *Plant Cell*. 17. 444-463.
- Peterman T Kaye, Sequeira Andrea S., Samia Julie A., Lunde Erin E.. **2006**. "Molecular cloning and characterization of patellin1, a novel sec14-related protein, from zucchini (*Cucurbita pepo*)". *Journal of Plant Physiology*. 163. 11501158.
- Peterman T. Kaye, Ohoi Yamini M., McReynolds Lisa J., and Luna Elizabeth J.. **2004**. "Patellin1, a Novel Sec14-Like Protein, Localizes to the Cell Plate and Binds Phosphoinositides". *Plant Physiology*. 136. 3080-3094.
- Pierik R., Cuppens M. L. C., Voesenek L. A. C. J., Visser E. J. W.. **2004**. "Interactions between ethylene and gibberellins in phytochrome-mediated shade avoidance responses in tobacco". *Plant Physiology*. 136. 2928-2936.
- Pierik R., Visser E. J. W., de Kroon H., Voesenek L. A. C. J.. **2003**. "Ethylene is required in tobacco to successfully compete with proximate neighbours". *Plant Cell Environment*. 26. 1229-1234.
- Pierik R., Voesenek L. A. C. J. de Kroon H., Visser E. J. W.. **2004**. "Density-induced plant size

- reduction and size inequalities in ethylene-sensing and ethylene-insensitive tobacco". *Plant Biol.* 6. 201-205.
- Pierik R., Whitelam G. C., Voesenek L. A. C. J., de Kroon H., Visser E. J. W.. **2004**. "Canopy studies on ethylene-insensitive tobacco identify ethylene as a novel element in blue light and plant-plant signalling". *Plant Journal*. 38. 310-319.
- Pierik Ronald, Sasidharan Rashmi, y Voesenek Laurentius A. C. J.. **2007**. "Growth Control by Ethylene: Adjusting Phenotypes to the Environment". *Journal of Plant Growth Regulation*. 26. 188-200.
- Rashoote Aaron M., Mason Michael G., Hutchison Claire E., Ferreira Fernando J., Schaller G. Eric, Kieber Joseph J.. **2006**. "A subset of Arabidopsis AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway". *PNAS*. 29. 11081-11085.
- Riefler Michael, Novak Ondrej, Strnad Miroslav, Schmülling Thomas. **2006**. "Arabidopsis Cytokinin Receptor Mutants Reveal Functions in Shoot Growth, Leaf Senescence, Seed Size, Germination, Root Development, and Cytokinin Metabolism". *American Society of Plant Biologists*. 18. 40-54.
- Sakamoto T., Kobayashi M., Itoh H., Tagiri A., Kayano T., Tanaka H., Iwahori S., Matsuoka M.. **2001**. "Expression of a gibberellin 2-oxidase gene around the shoot apex is related to phase transition in rice". *Plant Physiology*. 125. 1508-1516.
- Sakamoto T., Morinaka Y., Ishiyama K., Kobayashi M., Itoh H., Kayano T., Iwahori S., Matsuoka M., Tanaka H.. **2003**. "Genetic matipulation of gibberellin metabolism in transgenic rice.". *Nature Biotechnology*. 21. 909-913.
- Sakamoto Tomoaki. **2006**. "Phytohormones and rice crop yield: strategies and opportunities for genetic improvement". *Transgenic Research*. 15. 399-404.
- Sambrook Joseph, Russell David. **2001**. "Molecular Cloning. A laboratory Manual". Cold Spring Harbor. 3a Ed.. .
- Skoog F., Miller C. O.. **1957**. "Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro". *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11. 118-131.
- Smalle J., Haegman M., Kurepa J., Van Montagu M., Van der Straeten D.. **1997**. "Ethylene can stimulate Arabidopsis hypocotyl elongation in the light". *PNAS*. 94. 2756-2761.
- Sun T. P., Kamiya Y.. **1994**. "The Arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis". *Plant Cell*. 6. 1509-1518.
- Suyama M., Harrington E., Bork P., Torrents D.. **2006**. "Identification and analysis of genes and pseudogenes within duplicated regions in the human and mouse genomes.". *PLoS Comput. Biol.* ..
- Tholen D. J. H., Voesenek L. A. C. J., Poorter H.. **2004**. "Ethylene insensitivity does not increase leaf area or relative growth rate in Arabidopsis, Nicotiana tabacum, and Petunia x hybrida.". *Plant Physiology*. 134. 1803-1812.
- Tsukaya Hirokazu. **2005**. "Leaf shape: genetic controls and environmental factors". *The International Journal of Developmental Biology*. 49. 547-555.
- Tsukaya Hirokazu. **2003**. "Organ shape and size: a lesson from studies of leaf morphogenesis". *Current Opinion in Plant Biology*. 6. 57-62.
- Tsukaya Hirokazu, Beemster Gerrit. **2006**. "Genetics, cell cicle and cell expansion in organogenesis in

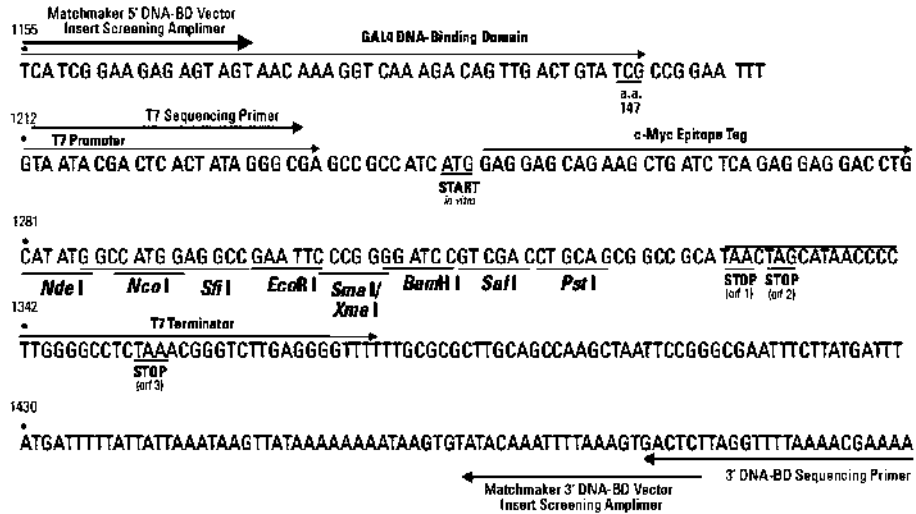
- plants". *Journal of Plant Research*. 119. 1-4.
- Ullah H., Cheng J. G., Young J. C., Im K. S., Sussman M. R., Jones A. M.. **2001**. "Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis*". *Science*. 292. 2066-2069.
- Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T. J.. **1997**. "ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements.". *Science*. 276. 1865-1868.
- Van Eck W. H. J. M., Lenssen J. P. M., Van der Steeg H. M., Blom C. W. P. M., de Kroon H.. **2006**. "Seasonal dependent effects of flooding on plant species survival and zonation: a comparative study of 10 terrestrial grassland species". *Hydrobiologia*. 565. 59-69.
- Van Staden y Wareing 1972: Van Staden J., Wareing P. F., The effect of photoperiod on level of endogenous cytokinins in *Xanthium strumarium*, 1972
- Visser E. J. W., Nabben R. H. M., Blom C. W. P. M., Voesenek L. A. C. J.. **1997**. "Elongation by primary lateral roots and adventitious roots during conditions of hypoxia and high ethylene concentrations". *Plant Cell Environment*. 20. 647-653.
- Voesenek L. A. C. J., Benschop J. J., Bou J., Cox M. C. H., Groeneveld H. W.. **2003**. "Interactions between plant hormones regulate submergence-induced shoot elongation in the flooding-tolerant dicot *Rumex palustris*". *Ann. Bot.*. 91. 205-211.
- Voesenek L. A. C. J., Colmer T. D., Pierik R., Millenaar F. F., Peeters A. J. M.. **2006**. "How plants cope with complete submergence". *New Phytologist*. 170. 213-226.
- Wang Bao, Sang Yalin, Song Jian, Gao Xin-Qi, Zang Xiansheg. **2009**. "Expression of a rice OsARGOS gene in *Arabidopsis* promotes cell division and expansion and increases organ size". *Journal of Genetics and Genomics*. 36. 31-40.
- Xu K. N., Mackill D. J.. **1996**. "A major locus for submergence tolerance mapped on rice chromosome 9.". *Mol. Breed.*. 2. 219-224.
- Yamaguchi S., Sun T., Kawaide H., Kamiya Y.. **1998**. "The GA2 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes ent-kaurene synthase of gibberellin biosynthesis". *Plant Physiology*. 116. 1271-1278.
- Zhang X. L., Zhang Z. J., Cheng J., Cheng Q., Wang X. C.. **2005**. "Expressing TERF1 in tobacco enhances drought tolerance and abscisic acid sensitivity during seedling development". *Planta*. 222. 494-501.

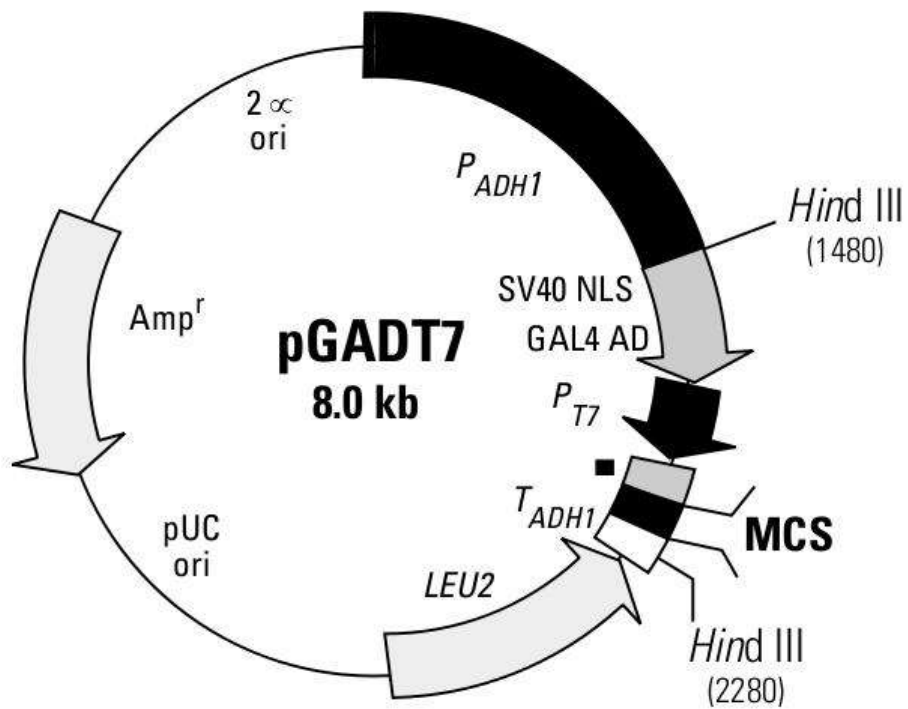
APENDICE:

VECTORES DE CLONACIÓN UTILIZADOS.



Δ c-Myc epitope tag





■ HA epitope tag

