

Mecanismos moleculares de respuesta a distintos tipos de estrés abiótico en las plantas

Jorge Ignacio Giacomelli, Julieta Virginia Cabello, Agustín Lucas Arce, Carlos Alberto Dezar, Federico Damián Ariel y Raquel Lía Chan

Laboratorio de Biotecnología Vegetal- Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (IAL)- Conicet-UNL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas- Ciudad Universitaria-Paraje El Pozo S/N- 3000 Santa Fe – Argentina

Factores abióticos que causan estrés en las plantas. Efectos sobre los cultivos de interés agronómico

Los cambios desfavorables en el ambiente, provocados por factores climáticos, edáficos y por la actividad del hombre, generan estrés en las plantas afectando severamente su productividad. Los estreses abióticos constituyen la principal causa de pérdidas en los cultivos. Estas pérdidas de productividad superan a veces, según cálculos estimativos, el 50% (Bray y col., 2000) y es por eso que los mejoradores se han dedicado, y lo hacen continuamente a elaborar estrategias de mejoramiento.

Existen numerosos factores abióticos naturales causantes de estreses para las plantas. Las actividades del hombre han agravado esta problemática. Como resultado global, el 22 % de los suelos cultivados es salino (FAO, 2004) y las áreas sometidas a déficit hídrico se expanden continuamente (Burke y col., 2006). Al estrés causado por estos factores hay que sumarle el motivado por las altas y bajas temperaturas, por la presencia de compuestos tóxicos en el suelo ya sean naturales o generados por el hombre, y el daño mecánico producido por cuestiones climáticas.

Las plantas son organismos sésiles; obtienen su energía de la luz solar y son capaces de transformar esta energía en energía química en forma de carbohidratos gracias al proceso de fotosíntesis. Los animales cuando se enfrentan a condiciones adversas migran hacia lugares con condiciones más benignas gracias al movimiento. Por su parte y como alternativa, las plantas han adquirido durante su evolución la capacidad de modificar eventos específicos del desarrollo como respuesta a los cambios en las condiciones ambientales y de este modo optimizar la utilización de los nutrientes disponibles. Es notorio que la mayoría de los factores que causan estrés y amenazan la supervivencia, generan en las plantas una floración temprana que asegura la descendencia, aunque ésta sea escasa porque no se completa el ciclo de vida normal y por lo tanto no se acumulan los productos de la fotosíntesis necesarios para una buena productividad de semillas. De alguna forma y siguiendo mecanismos moleculares y fisiológicos complejos, escapan limitadamente al estrés, produciendo una menor descendencia. Para los cultivos de interés agronómico, esto implica en forma directa una pérdida en la productividad.

Entender los mecanismos moleculares que llevan a esta respuesta es fundamental para poder cambiar el rumbo.

Vías de señalización de las distintas respuestas. Regulación de la expresión génica

Las plantas perciben las señales del medio ambiente y las transmiten a la maquinaria celular. De esta forma activan procesos utilizando mecanismos complejos que les permiten aclimatarse. La respuesta consiste, en general, en cambios en el tipo, cantidad o actividad de determinadas proteínas de la planta, generando componentes útiles para las nuevas condiciones y eliminando los superfluos. Esto implica la activación o inactivación de los genes a partir de los cuales estas proteínas son sintetizadas (Figura 1). Los procesos de activación e inactivación suelen estar gobernados por un lado, por factores de transcripción y por otro por la presencia de elementos presentes en las regiones promotoras de los genes regulados. Además de este nivel de regulación de la expresión génica (transcripcional), existen otros puntos de regulación que incluyen las vías de procesamiento de los ARN mensajeros, el transporte de los mismos una vez maduros, su traducibilidad, y por último el procesamiento y transporte, cuando ha lugar, de las proteínas sintetizadas. Más recientemente se han descrito mecanismos de silenciamiento de genes mediados por micro ARNs, ya sean éstos codificantes o no, como un punto importante de regulación de la expresión génica (para una revisión ver Balcombe, 2004; Sunkar y col., 2007).

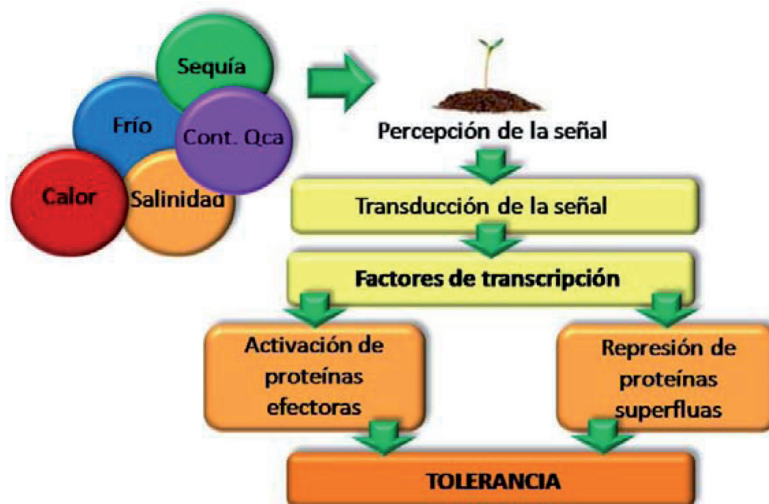


Figura 1- Esquema representativo de las respuestas generadas en las plantas por los distintos efectores de estrés abiótico.

Obtención de plantas transgénicas con tolerancia mejorada a distintos tipos de estrés de origen abiótico como estrategia de mejoramiento

Cada vez más, con la intención de mejorar las especies de interés agronómico para que puedan tolerar mejor las condiciones ambientales adversas, las herramientas moleculares y el conocimiento sobre genómica y expresión génica toman un mayor protagonismo. Este protagonismo se da tanto en el mejoramiento clásico asistido por marcadores moleculares como en la obtención de plantas transgénicas en las que un solo gen confiere la característica deseada.

Como comentamos más arriba, los mecanismos de adaptación a condiciones ambientales adversas son controlados por redes moleculares involucradas en la percepción del estrés, transducción de señales, y regulación de la expresión de genes efectores (Shinozaki y col., 2003; Vinocur y Altman, 2005; Umezawa y col., 2006; Vij y Tyagi, 2007). Estas cascadas activan mecanismos protectores para restablecer la homeostasis y proteger y reparar biomoléculas y membranas dañadas. En consecuencia, la manipulación de genes que ayudan a mantener las funciones de células y componentes puede, en principio, incrementar la tolerancia a estrés, y la mayor parte de las estrategias empleadas para mejorar el rendimiento de plantas bajo condiciones adversas se han basado en el fortalecimiento de estos sistemas endógenos. En los últimos años se realizaron numerosos estudios detallados sobre el desarrollo de tolerancia a estrés abiótico, muchos de ellos involucrando la determinación de perfiles de transcritos a amplitud genómica (Vinocur y Altman, 2005; Vij y Tyagi, 2007), proporcionando el conocimiento indispensable para el desarrollo racional de tolerancia a estrés.

Las diferentes fuentes de estrés (sequía, heladas, salinidad) disparan una respuesta en cierto modo única, que posee a la vez elementos comunes e idiosincrásicos respecto a otras respuestas y a vías metabólicas y morfogenéticas del organismo. Existe una significativa conversación (del inglés *crossstalk*) entre tales redes de decisiones, que puede ser sinérgica o antagónica (Mittler, 2006). Aunque esta observación abre posibilidades de obtener tolerancia cruzada a diferentes fuentes de estrés mediante una única intervención transgénica, también limita el número de intervenciones útiles, y a menudo requiere una regulación sofisticada del transgén para prevenir impactos indeseables en el crecimiento y desarrollo vegetal (Gutterson y Zhang, 2004).

Las estrategias de Ingeniería Genética empleadas para incrementar la supervivencia bajo condiciones de estrés han intentado fortalecer la expresión de cuatro grandes grupos de genes: *a*) genes involucrados en la transmisión de señales; *b*) reguladores transcripcionales; *c*) genes que codifican proteínas involucradas en la tolerancia, como proteínas del shock térmico (HSP) y enzimas antioxidantes; y *d*) genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de metabolitos protectores. Nos referiremos particularmente a los reguladores transcripcionales ya que constituyen el objeto del presente trabajo y de nuestro pequeño aporte a la comprensión de este tema.

Los factores de transcripción

Los factores de transcripción (FTs) juegan un papel central en la elaboración de la respuesta ambiental y el programa morfogénico de la planta. Son proteínas que actúan en *trans*, capaces de reconocer secuencias específicas de ADN (elementos que actúan en *cis*) localizadas en las regiones promotoras de determinados genes que actúan como sus blancos (Figura 2). La regulación de la expresión génica está gobernada en gran medida por la interacción de los factores de transcripción con los elementos que actúan en *cis*, de forma positiva o negativa, induciendo o reprimiendo distintas vías de transducción de señales en cascadas a través de un efecto dominó.

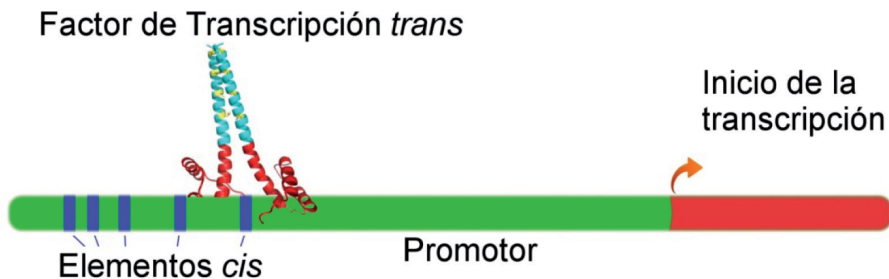


Figura 2- Esquema que representa la estructura de un gen que se transcribirá regulado por los elementos que actúan en *cis* presentes en su región promotora y los elementos que actúan en *trans*, representados por los factores de transcripción.

En plantas como *Arabidopsis thaliana* (AT) y *Oryza sativa* (arroz), cuyos genomas fueron secuenciados totalmente, se identificaron unos 1500 genes que codificarían FTs. Esta identificación se hizo en base a la presencia de dominios o motivos conservados y caracterizados funcionalmente en factores de transcripción de otros reinos. Sin embargo, en plantas, no más de un 10 % de estas secuencias han sido aisladas y estudiadas fehacientemente para poder asignarles la función de FT a las proteínas codificadas. Además, está bastante aceptado, en base a evidencias experimentales, que no necesariamente las proteínas que contienen dominios o motivos idénticos en distintos reinos están involucradas en la regulación de los mismos tipos de eventos (Immick y Angenent, 2002).

Los cientos de FTs vegetales fueron clasificados en distintas familias y subfamilias de acuerdo a la conservación de la secuencia de aminoácidos dentro y fuera de los dominios conservados, a su tamaño, a la composición estructural de los genes que los codifican que incluyen la presencia y ubicación de intrones y exones (Riechmann, 2002).

Algunos FTs vegetales fueron caracterizados funcionalmente y en casi todos los casos se ha observado que intervienen en varias vías de señalización. En los experimentos en los que los FTs vegetales han sido sobreexpresados, expresados ectópicamente o silenciados, se obtuvieron plantas con respuestas alteradas a las condiciones medioambientales, tanto por factores bióticos como abióticos. En algunos casos, éstas han sido respuestas mejoradas al mismo tiempo a distintos tipos de estrés, lo que corrobora la hipótesis de que los factores de transcripción actúan simultáneamente en diferentes vías de señalización.

Dentro de los FTs específicamente vinculados a respuestas ambientales, existe un grupo de genes que codifica proteínas de tipo HD-Zip. Estas proteínas se caracterizan por presentar un homeodominio (HD, dominio proteico de unión a ADN de 60 aminoácidos conservado en los reinos animal y fungi) asociado a un cierre de leucinas (LZ), que actúa como dominio de dimerización. Si bien estos dos dominios están presentes en muchos factores de transcripción de otros reinos, la asociación de los dos en una única proteína, es exclusiva del reino vegetal. Por este motivo es que varios autores plantearon que la función probable de estos FTs debía estar relacionada con el desarrollo en respuesta a factores ambientales, característica de las plantas. Durante los quince años posteriores al aislamiento del primer gen que codifica una proteína de esta familia, se identificaron numerosos miembros de distintas especies, lo que motivó la subdivisión en cuatro subfamilias de acuerdo al tamaño, el patrón de expresión, la estructura de los genes codificantes y la función asignada (Chan y col., 1998). Las proteínas de la subfamilia I poseen alrededor de 300 aminoácidos y se unen como dímeros a la secuencia CAAT(A/T)ATTG mientras que las de la subfamilia II son apenas más grandes y unen como dímeros una secuencia muy similar que varía sólo en la posición central con respecto a la secuencia unida por los miembros de la subfamilia I (CAAT(C/G)ATTG, Sessa y col., 1997; Palena y col., 1999).

Nuestro grupo de investigación viene trabajando hace algunos años en la identificación y caracterización de factores de transcripción pertenecientes a la familia HD-Zip de las plantas de girasol. Nuestro interés radica en la adquisición de conocimiento sobre estas proteínas y su funcionalidad en esta especie poco estudiada a nivel molecular, con respecto a las especies utilizadas como modelos experimentales (Arabidopsis, Medicago, arroz).

Estrategia experimental para asignarles la función a los factores de transcripción de girasol.

En plantas como girasol, en las cuales las herramientas genómicas son muy limitadas, no existen bancos de mutantes ni se conoce la secuencia genómica completa, la asignación de función a un gen dado se convierte en un proceso complejo en el cual es indispensable utilizar un sistema modelo para cumplir los objetivos. Esencialmente nuestra estrategia para la caracterización funcional de genes que codifican factores de transcripción en girasol se basa en la utilización de una serie de técnicas moleculares, fisiológicas y bioquímicas. En primer lugar

se aísla la secuencia del gen elegido a partir de bancos genómicos y/o de ADNc (ADN copia) utilizando los conocimientos sobre homología de secuencias. En paralelo, analizamos cuál es el patrón de expresión en los distintos tejidos y órganos del gen seleccionado así como cuáles son los factores externos que cambian esos niveles de expresión, incluyendo factores bióticos, abióticos y hormonales. El ADNc se clona bajo el control de un promotor constitutivo como el 35S del virus del mosaico de la coliflor y la región promotora, por separado, dirigiendo la expresión de un gen reportero como el *GUS*. Ambos clonados en uno o más pasos se hacen en vectores adecuados para la transformación de bacterias *Agrobacterium tumefaciens* capaces a su vez de transferir segmentos de ADN a las plantas por la metodología de *floral dip*. Con estos clones transformamos plantas de *Arabidopsis thaliana*, seleccionamos en una tercera generación líneas independientes homocigotas que se examinan desde distintos puntos de vista. Las plantas que expresan ectópicamente el ADNc son caracterizadas fenotípicamente en condiciones normales de crecimiento o sometidas a distintos tipos de estrés. Además hacemos ensayos de microarreglos que nos permiten identificar qué genes son regulados positiva o negativamente por el factor de transcripción. Las plantas que expresan el gen reportero bajo el control del promotor en estudio se analizan por histoquímica (patrón de expresión), fluorometría (efecto de factores externos), RT-PCR en tiempo real (expresión), *northern blot* (expresión) y mutagénesis dirigida para identificar los elementos actuantes en *cis*. En paralelo, la expresión de las proteínas codificadas en forma recombinante en bacterias nos permite determinar por la técnica de selección de oligonucleótidos de secuencia al azar, la secuencia de ADN unida por el factor de transcripción. Los resultados obtenidos *in vitro* y con las plantas transgénicas constituyen la herramientas fundamentales para volver a la planta de girasol y aplicando la metodología de transformación transitoria, puesta a punto en nuestro laboratorio, determinar si los mecanismos fisiológicos y moleculares se encuentran conservados entre especies. Los resultados obtenidos hasta la fecha utilizando esta estrategia pueden apreciarse en forma detallada en las publicaciones recientes del grupo de trabajo (Dezar y col., 2005a, 2005b; Rueda y col., 2005; Manavella y col., 2006; Cabello y col., 2007; Ariel y col., 2007; Manavella y col., 2008a, 2008b, 2008c).

Obtención de plantas transgénicas tolerantes a estrés hídrico, estrés salino, estrés por bajas temperaturas, ataque de insectos y de organismos patógenos.

La caracterización funcional de factores de transcripción de la familia HD-Zip de girasol nos ha llevado durante estos años a la conclusión de que éstas son proteínas con funciones múltiples y cruzadas, y sobre todo que ellas actúan de nexos en esas relaciones complejas que existen entre las distintas vías de transducción de señales en las cuales intervienen también las fitohormonas vegetales. Algunos ejemplos que ilustran estos fenómenos los constituyen los genes *HAHB4*, *HAHB10* y *HAFT* caracterizados en nuestro laboratorio.

La hipótesis inicial cuando se descubrieron estas proteínas en plantas, en el año 1992, planteaba que su función estaría relacionada con el desarrollo vegetal en respuesta a condiciones ambientales de tipo abiótico. Si bien hemos corroborado esta hipótesis con experimentos que describimos a continuación, también hemos comprobado que las respuestas al estrés de tipo abiótico están totalmente interconectadas con las respuestas al ataque de insectos y organismos patógenos como bacterias y hongos bio y necrotróficos. Justamente las conexiones entre estas distintas respuestas están dadas por estos factores de transcripción (Figura 3).

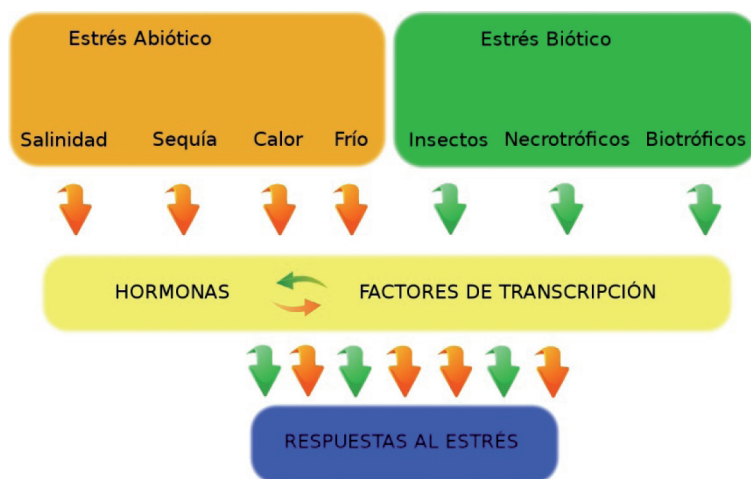


Figura 3- Esquema representativo de los cruces entre las respuestas a estreses de origen biótico o abiótico mediados por hormonas y factores de transcripción.

En este sentido la expresión de *HAHB4*, uno de los genes de esta familia de FTs, es regulada positivamente por estrés hídrico, salino y la presencia de las hormonas ABA, etileno y ácido jasmónico. La expresión ectópica de este gen bajo el control de un promotor constitutivo fuerte en plantas de *Arabidopsis*, genera líneas notoriamente más tolerantes a condiciones de sequía y/o salinidad (Gago y col., 2002; Dezar y col., 2005; Manavella y col., 2006; Figura 4A). Cuando las transformaciones se hicieron con construcciones en las que el promotor era el del propio gen *HAHB4*, también se observó la misma tolerancia al estrés generado por sequía (Cabello y col., 2007; Figura 4B). Pero además, estas plantas transgénicas de *Arabidopsis* y maíz son más tolerantes que sus pares salvajes al ataque de insectos o al daño mecánico producido por vientos u otros efectores aunque acompañada por una hipersensibilidad al ataque de bacterias patógenas (Manavella y col., 2008; Figura 5). Todos estos efectos se ven notoriamente incrementados cuando en lugar de condiciones de laboratorio controladas, se utilizan suelos de nuestro país considerados poco cultivables por sus contenidos salinos.

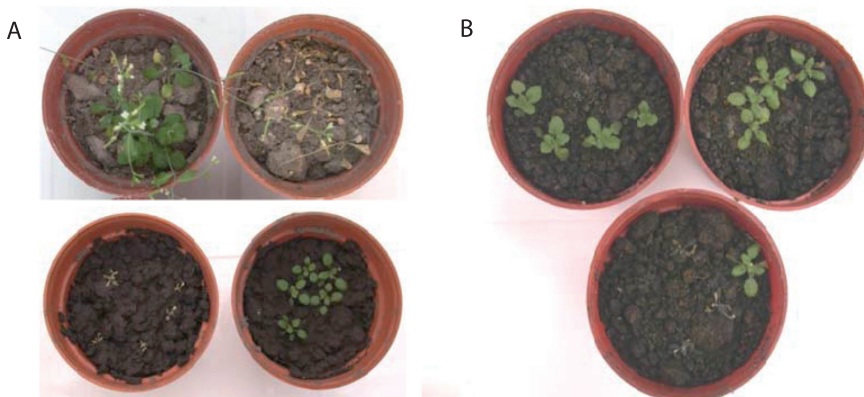


Figura 4- Las plantas transgénicas que expresan en forma ectópica *HAHB4* son más tolerantes a estrés hídrico.

A: a la izquierda arriba, plantas de 5 semanas transformadas con la construcción *35S:HAHB4* y a la derecha, plantas transformadas con una construcción utilizada como control. A la izquierda abajo, plantas salvajes y a la derecha transgénicas de 3 semanas. Las plantas fueron sometidas a estrés hídrico severo y vueltas a regar utilizando suelos salinos de nuestro país, tomados de la provincia de Entre Ríos. La foto fue tomada 24 hs después del riego.

B: arriba dos genotipos de plantas transgénicas con promotores inducibles dirigiendo la expresión de *HAHB4*, abajo, plantas sin transformar. En todos los casos se sembraron cuatro plantas por maceta y se sometieron a estrés hídrico severo.



Figura 5- Las plantas transgénicas que expresan en forma ectópica *HAHB4* son más tolerantes al ataque de insectos.

HAHB10 por su parte, otro miembro de la familia, cuya expresión es regulada por las condiciones de iluminación, confiere a las plantas transgénicas que lo expresan ectópicamente, tolerancia al herbicida *paraquat* con una morfología y desarrollo particulares. Las plantas de *Arabidopsis* que expresan ectópicamente este gen, presentan un ciclo de vida acortado en un 25 % comparadas con sus pares sin transformar y toleran mucho mejor la falta de nutrientes, luz y el hacinamiento. Notoriamente, hacen esto sin desmedro de su productividad. Por otro lado, y como en el caso de *HAHB4*, las vías de producción y percepción de ácido jasmónico (hormona relacionada con la defensa frente a herbívoros) y ácido salicílico (hormona relacionada con la respuesta frente a patógenos) se encuentran alteradas notoriamente, lo que produce respuestas diferenciales al ataque de insectos y organismos patógenos (Figura 6; Dezar y col, 2009, resultados no publicados).

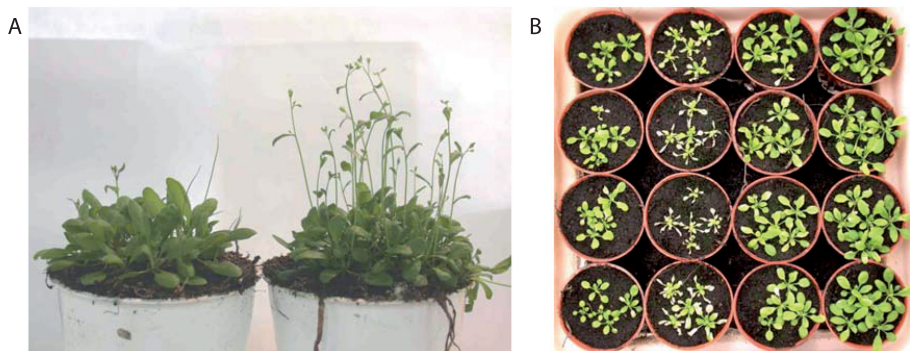


Figura 6- Las plantas transgénicas que expresan ectópicamente *HAHB10* son más tolerantes al hacinamiento y falta de iluminación así como al tratamiento con el herbicida *paraquat*.

A: a la izquierda plantas salvajes, a la derecha plantas transformadas con la construcción *35S:HAHB10*. En ambos casos se sembraron 20 plantas por maceta y se hicieron crecer en idénticas condiciones durante 5 semanas.

B: plantas tratadas con el herbicida *paraquat*. En la segunda columna, plantas salvajes, en las otras tres columnas tres líneas independientes de plantas transgénicas transformadas con la construcción *35S:HAHB10*.

HAFT, el tercer miembro de la familia caracterizado en el período más reciente genera en plantas transgénicas en las que se lo expresa constitutivamente, una respuesta mejorada a las bajas temperaturas (Figura 7). El mecanismo molecular por el que cursa esta respuesta involucra la activación de proteínas capaces de impedir la formación de cristales de hielo en el apoplasto celular. Notoriamente, algunas de estas proteínas producidas bajo estrés por bajas temperaturas o por la expresión de este gen participan a su vez en la respuesta de la planta frente al ataque por organismos patógenos. Asimismo, las plantas transgénicas presentan una respuesta mejorada frente a condiciones de estrés hídrico y salinidad, demostrando una vez más, un cruzamiento entre las vías de respuesta a los distintos tipos de estrés abiótico y de origen biológico..

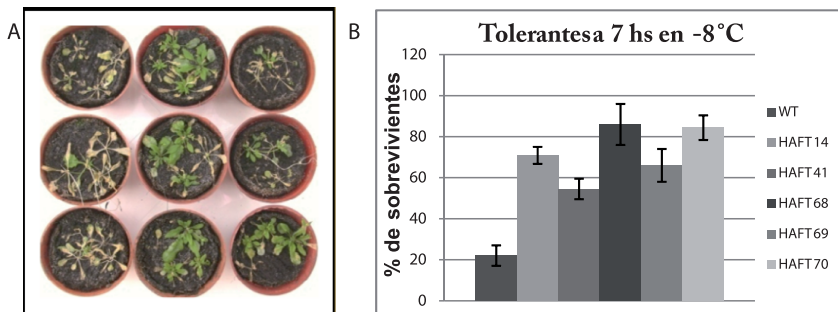


Figura 7- Las plantas transformadas que expresan el gen *HAFT* son más tolerantes al tratamiento con bajas temperaturas.

A: Primera columna: plantas salvajes; segunda columna: plantas de una de las líneas transformadas; tercera columna: plantas transformadas de baja expresión. En todos los casos las plantas fueron tratadas seis horas a -8°C y luego puestas en condiciones de temperatura normal.

B: porcentaje de plantas de cada genotipo que sobrevivieron al tratamiento por frío.

Conclusiones y perspectivas futuras

En un mundo en el cual la actividad humana ha reducido y deteriorado significativamente la tierra disponible para la agricultura, el desarrollo de cultivos tolerantes a estreses abióticos constituye un objetivo fundamental para continuar satisfaciendo las necesidades alimenticias de una población en continuo crecimiento.

Por un lado, el mejoramiento llamado «clásico» por cruzamiento y selección así como el asistido por marcadores moleculares de distintas generaciones, aportan a diario y seguirán aportando herramientas fundamentales para el desarrollo de cultivos con características beneficiosas en cuanto a productividad y tolerancia. Por el otro, la identificación de genes únicos que confieran características particulares deseadas tanto para ser utilizados como marcadores como por transgénesis, es la otra herramienta esencial con la que contamos para lograr el objetivo. Este objetivo es dinámico ya que las actividades del hombre producen cambios en distintos niveles que de formas diversas afectan la disponibilidad de suelos y por ende, las áreas cultivables.

En este sentido, los factores de transcripción caracterizados funcionalmente han demostrado ser las llaves de encendido de los mecanismos de defensa naturales de las plantas frente a las condiciones adversas. Obtener cultivos con estas respuestas aumentadas permitirá en un futuro aumentar la productividad aún con recursos naturales limitados, ensanchando los límites de las áreas cultivables.

El camino a recorrer es largo, muchas veces tortuoso y abre nuevas preguntas y bifurcaciones a diario. Sin embargo, creemos que las respuestas están de alguna forma en los años de evolución y adaptación por los que las plantas ya han pasado. Entenderlos, poder describirlos, conocer sus escapes son desafíos que sin dudas nos darán las respuestas adecuadas.

Bibliografía citada en el texto

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

Baulcombe D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* **16**, 356-363.

Bray E.A., Bailey-Serres J. and Weretilnyk E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: Gruissen W., Buchannan B., Jones R. (ed.) *American Society of Plant Biologists Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Rockville MD, pp 1158-1249.

Cabello J.V., Dezar C.A., Manavella P.A. and Chan R.L. 2007. The intron of the *Arabidopsis thaliana* COX5c gene is able to improve the drought tolerance conferred by the sunflower Hahb-4 transcription factor. *Planta* **226**, 1143-1154.

Chan R.L., Gago G.M., Palena C.M. and Gonzalez D.H. 1998. Homeoboxes in plant development. *Biochim. Biophys. Acta* **1442**, 1-19.

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

Dezar C.A., Gago G.M., González D.H. and Chan R.L. 2005a. *Hahb-4*, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants. *Transgenic Res.*, **14**, 429-440

Dezar C.A., Fedrigo G.V. and Chan R.L. 2005b. The promoter of the sunflower HD-Zip protein gene *Hahb4* directs tissue-specific expression and is inducible by water stress, high salt concentrations and ABA. *Plant Sci.* **169**, 447-459.

FAO (Food Agriculture Organization of the United Nations). 2004. *FAO Production Yearbook*. FAO, Rome.

Gago G.M., Almoguera C., Jordano J., González D.H. and Chan R.L. 2002. *Hahb-4*, a homeobox-leucine zipper gene potentially involved in ABA-dependent responses to water stress in sunflower. *Plant Cell Environ.* **25**, 633-640.

Immink R.G.H. and Angenent G.C. 2002. Transcription factors do it together: the hows and whys of studying protein-protein interactions. *Trends Plant Sci.* **7**, 531-535.

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

Manavella P.A., Dezar C.A. and Chan R.L. 2008a. Two ABREs, two redundant root-specific and one W-box *cis*-acting elements are functional in the sunflower *HAHB4* promoter. *Plant Physiol. Biochem.* **46**, 860-867.

Manavella P.A., Dezar C.A., Ariel F.D., Drincovich M.F. and Chan R.L. 2008b. The sunflower HD-Zip transcription factor HAHB4 is up regulated in

darkness acting as a repressor of photosynthesis related genes transcription. *J. Exp. Bot.* **59**, 3143-3155.

Manavella P.A., Dezar C.A., Bonaventure G., Baldwin I.T., Chan R.L. 2008c. HAHB4, a sunflower HD-Zip protein, integrates signals from the jasmonic acid and ethylene pathways during wounding and biotic stress responses, *Plant Journal*, **56**, 376-388.

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

Riechmann J.L. 2002. Transcriptional regulation: a genomic overview. *The Arabidopsis book*. Ed: American Society of Plant Biologists.

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

Sessa G., Ruberti I., and Morelli G. 1997. DNA-binding specificity of the homeodomain-leucine zipper domain. *J. Mol. Biol.* **5**,:303-309.

Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. and Seki M. 2003. Regulatory networks of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 410-417.

Sunkar R., Chinnusamy V., Zhu J. and Zhu J.K. 2007. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci.*, **12**, 301-309.

Umezawa T., Fujita M., Fujita Y., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. 2006. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr. Op. Biotechnol.*, **17**, 113-122.

Vij S. and Tyagi A.K. 2007. Engineering trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnol. J.*, **5**, 361-380.

Vinocur B. and Altman A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 123-132