

Chuyển gen tăng chiều dài sợi gỗ (*EcHB1*) vào cây thuốc lá và đánh giá biểu hiện gen

Đỗ Thị Thực*, Đỗ Thị Thu, Trần Thị Thu Hà, Trần Hồ Quang

Viện Nghiên cứu giống và Công nghệ sinh học lâm nghiệp

Ngày nhận bài 2.3.2015, ngày chuyển phản biện 6.3.2015, ngày nhận phản biện 11.5.2015, ngày chấp nhận đăng 14.5.2015

Trong nghiên cứu này, các tác giả sử dụng cây thuốc lá như là cây mô hình để phục vụ các nghiên cứu cho chuyển gen tăng chiều dài sợi gỗ và làm cơ sở cho các nghiên cứu chuyển gen vào các loài cây trồng rừng quan trọng như bạch đàn và keo. Biến nạp gen tăng chiều dài sợi gỗ *EcHB1* vào cây thuốc lá thông qua *A. tumefaciens* chủng GV3101 mang vector nhị thể pGWB2/35S/*EcHB1*/NOS. Kết quả đã tạo được 69 dòng thuốc lá chuyển gen và kiểm tra ngẫu nhiên 8 dòng cây chuyển gen bằng phương pháp PCR đều cho kết quả dương tính. Sau 3 tháng trồng cây tại vườn ươm trong khu vực cách ly, 32 dòng cây thuốc lá chuyển gen có chiều cao trung bình (31,88 cm) lớn hơn 87,5% so với dòng thuốc lá đối chứng (17 cm) và chiều dài sợi gỗ của cây chuyển gen lớn hơn so với cây đối chứng 12%.

Từ khoá: *A. tumefaciens*, chiều dài sợi gỗ, chuyển gen, gen *EcHB1*, thuốc lá.

Chỉ số phân loại 4.6

STUDY ON GENETIC TRANSFORMATION OF FIBER LENGTH GENE (*EcHB1*) INTO TOBACCO AND EVALUATION OF GENE EXPRESSION

Summary

In this study, the authors have used tobacco as model plant for studying the expression of fiber length gene (*EcHB1*), and the results of this study are the fundamental basis for transferring genes into some important forest trees such as *Eucalyptus* and *Acacia* so far. The *EcHB1* gene has been transferred into Tobacco by *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 with binary vector pGWB2/35S/*EcHB1*/NOS. Sixty-nine Tobacco transgenic lines have been produced, and PCR tests for 8 randomized transgenic lines have shown positive. After three months in nursery, thirty-two transgenic lines have reached the average height of 31.88 cm, while the control is only 17 cm in height. The fiber length of transgenic clones is also 12% higher than that of the control.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, *EcHB1* gene, fiber length, tobacco, transgenic.

Classification number 4.6

Đặt vấn đề

Chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium* được nghiên cứu từ những năm 60-70 của thế kỷ trước. Việc phát hiện *A. tumefaciens* có khả năng chuyển gen vào thực vật vào đầu những năm 80 đã biến loài này trở thành một trong những công cụ quan trọng nhất của công nghệ chuyển gen thực vật với những ưu điểm nổi trội như số bản sao của gen biến nạp được chuyển vào tế bào thấp (khoảng 1-2 bản sao), trong khi sử dụng súng bắn gen là nhiều hơn, do vậy giảm thiểu sự không biểu hiện của gen được chuyển, tăng khả năng chuyển gen bền vững, hiệu quả chuyển gen cao; tránh được sự hình thành cây chuyển gen thể khảm. Ngoài ra, phương pháp chuyển gen nhờ *A. tumefaciens* có kỹ thuật đơn giản, dễ thực hiện, không đòi hỏi thiết bị đắt tiền.

Ở thực vật, các gen liên quan đến nhân tố phiên mã (transcription factor genes) có chức năng kiểm soát quá trình biểu hiện các gen mã hoá cho các enzyme trong con đường sinh tổng hợp thành tế bào. Đây là các gen chia khoá có tác dụng tăng cường hoặc kìm hãm các hoạt động của các gen khác [1].

Protein HD-Zip là nhân tố phiên mã có

*Tác giả chính: Tel: 0913010902; Email: dothithuc@gmail.com

trong thực vật. HD-Zip có cấu tạo gồm miền ADN có chức năng liên kết chặt chẽ với motif khóa kéo leucine (leucine zipper motif) trong việc hình thành dimmer. Hai chuỗi polypeptide ở khóa kéo leucine được giữ với nhau bởi tương tác kỵ nước giữa axit amin leucine và sự lồng vào của 2 vòng xoắn α . Đây là loại homeodomain (miền đồng hình) chỉ có mặt trong thực vật và được coi là gen HD-Zip có nguồn gốc từ thực vật bằng cách trao đổi giữa một gen exon của miền đồng hình với một chuỗi khóa kéo leucine [2].

Protein HD-Zip bao gồm 4 phân nhóm (từ I đến IV) dựa trên 4 đặc điểm: (1) sự bảo thủ của domain HD-Zip mà xác định vị trí ADN gắn kết, (2) cấu trúc gen, (3) các motif bảo thủ phụ thêm (additional conserved motif) và (4) chức năng [3].

Mỗi nhân tố phiên mã kiểm soát sự hoạt động và phát triển của một vùng thực vật đặc biệt. Nhân tố phiên mã ATHB5 thuộc HD-Zip phân nhóm I có chức năng kiểm soát sự hình thành trụ dưới lá mầm và kéo dài rễ sơ cấp [4], ATHB2 thuộc HD-ZIP phân nhóm II có chức năng kiểm soát việc kéo dài tế bào liên quan đến chất lượng ánh sáng [5], ATHB8 thuộc phân nhóm III có chức năng kiểm soát sự phát triển của tượng tầng trong quá trình biệt hóa tế bào [6], ATHB10/GLABRA 2 thuộc phân nhóm IV có chức năng kiểm soát sự biệt hóa các dạng khác nhau của tế bào trichomes trên lá và thân, và tế bào lông rễ [7].

Gen *EcHB1* có chức năng chính trong việc hình thành và phát triển sợi gỗ và có ảnh hưởng đến quá trình hình thành xylem ở cây. Gen *EcHB1* thuộc nhóm nhân tố phiên mã HD-zip nhóm 2 (homeodomain leucine zipper) và có chức năng chính trong việc hình thành và phát triển sợi gỗ [8].

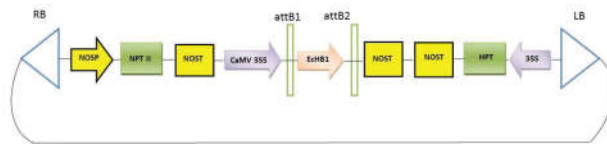
Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành biến nạp gen *EcHB1* vào cây thuốc lá thông qua *A. tumefaciens* với mục đích đánh giá biểu hiện của gen *EcHB1* trong cây. Kết quả nghiên cứu về biểu hiện của gen này trong cây thuốc lá là cơ sở để tiến hành các nghiên cứu chuyển gen tiếp theo cho các loài cây trồng rừng hiện nay như bạch đàn và keo để nâng cao chất lượng gỗ phục vụ ngành công nghiệp chế biến giấy và sản xuất đồ mộc...

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Chủng *A. tumefaciens* (GV3101) có chứa vector

nhị thể (pGWB2) mang gen làm tăng chiều dài sợi gỗ (*EcHB1*) được phân lập từ bạch đàn trắng (*Eucalyptus camaldulensis*) và được thiết kế cấu trúc vector chuyển gen pGWB2/35S/*EcHB1*/NOS tại phòng thí nghiệm của Viện Nghiên cứu RIKEN (Nhật Bản).



Hình 1: sơ đồ cấu trúc đoạn T-ADN trong vector pGWB2/35S/*EcHB1*/NOS

Ghi chú: RB: right T-ADN border, LB: left T-ADN border, NPT: gen kháng kanamycin, NOSP: promoter nopaline synthase gene là vị trí khởi động phiên mã gen nptII, NOS: terminator nopaline synthase gene là vị trí kết thúc phiên mã gen, 35S: promoter CaMV 35S, *EcHB1*: gen liên quan đến tăng chiều dài sợi gỗ, HPT: gen kháng hygromycin

Dòng thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) SNN do Phòng Công nghệ tế bào thực vật - Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Cặp môi đặc hiệu để xác định sự có mặt của gen *EcHB1* trong cây chuyển gen được mua của Công ty Biosystems [9].

Ký hiệu môi	Trình tự nucleotide của môi (5'-3')
EcHB1-F	ATGTGCCCTATCGATTCGG
EcHB1-R	TTAACAAGCGGCTGATGGATGAGC

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chuyển gen vào cây thuốc lá nhờ *A. tumefaciens*: dùng lá có kích thước vừa phải ở các cây con khỏe mạnh 2 tuần tuổi. Dùng dao cắt 4 cạnh mép lá để gây tổn thương, tạo thành các mảnh lá có kích thước khoảng 1 cm². Các mảnh lá được sử dụng để lây nhiễm và đồng nuôi cấy với *A. tumefaciens* được bổ sung thêm Acetosyringone (AS) với nồng độ 200 μ M. Đồng nuôi cấy ở nhiệt độ 25°C, trong buồng tối với thời gian 48 giờ theo phương pháp của Topping có cải tiến [10].

Các mẫu sau khi đồng nuôi cấy tiến hành rửa khuẩn bằng dung dịch 1/2 MS bổ sung 500 mg/l cefotaxime trong 10 phút và được cấy sang môi trường tái sinh gồm MS + 1 mg BAP. Sau 4 tuần thu được các cụm chồi, tiến hành tách các cụm chồi cấy chuyển sang môi trường chọn lọc (MS + 1 mg BAP + 50 mg/l kanamycin). Các chồi chọn lọc thu được tiến hành cấy chuyển sang môi trường ra rễ chọn lọc (MS + 0,1 mg NAA + 50 mg/l kanamycin).

Phương pháp xác định sự có mặt của gen *EcHB1* bằng PCR:

Tiến hành phản ứng nhân gen *EcHB1* theo bộ kit Kapa 3G Plant PCR (Kapa biosystems). Cắt mảnh lá mới sau 3 tháng trồng tại nhà lưới của 8 dòng thuốc lá chuyển gen và dòng đối chứng (không chuyển gen) cho vào ống PCR có thành phần như sau: 25 µl Kapa 2x; 0,5 µl MgCl₂; 1,5 µl *EcHB1*-F 10 pM; 1,5 µl *EcHB1*-R 10 pM; 0,5 µl Enhancer; 0,5 µl *Taq* ADN polymerase thêm nước khử ion đến thể tích 50 µl. Chu trình nhiệt: 95°C 10 phút; 35 chu kỳ (95°C 30 giây, 56°C 30 giây, 72°C 1 phút), 72°C trong 7 phút và sau đó duy trì ở 12°C.

Sản phẩm PCR được điện di trong gel agarose 1%, sau đó nhuộm bằng Ethidium bromide và phát hiện các băng ADN dưới tia sáng của đèn cực tím.

Phương pháp đánh giá biểu hiện của gen *EcHB1*:

Đánh giá biểu hiện của gen dựa vào tốc độ sinh trưởng của cây thuốc lá: sau khi chuyển ra bầu đất cây được chăm sóc, theo dõi tại vườn ươm trong khu vực cách ly rồi tiến hành đo chiều cao của các dòng thuốc lá đối chứng và dòng chuyển gen bằng thước sau 1, 2 và 3 tháng.

Đánh giá biểu hiện của gen dựa vào tiêu bản sợi gỗ: sau 3 tháng, cây thuốc lá đã hình thành 1 lớp gỗ mỏng. Chọn 7 dòng thuốc lá và đánh dấu theo số thứ tự. Trong đó có 6 dòng thuốc lá chuyển gen (gồm 3 dòng sinh trưởng tốt, 3 dòng sinh trưởng kém) và 1 cây đối chứng, ở mỗi dòng cắt 1 đoạn nhỏ dài 1,5 cm và cách gốc 5 cm. Sau đó tước lớp vỏ và chẻ làm 4 phần bằng nhau theo chiều dọc. Mẫu được phân tích chiều dài sợi gỗ theo phương pháp FUJI 2003. Chiều dài sợi gỗ được đo bằng phần mềm Optika Vision pro 1.5.

Số liệu phân tích được thống kê và xử lý bằng phần mềm SPSS: phân tích phương sai một nhân tố, vẽ biểu đồ.

Kết quả và thảo luận

Kết quả tạo dòng thuốc lá chuyển gen

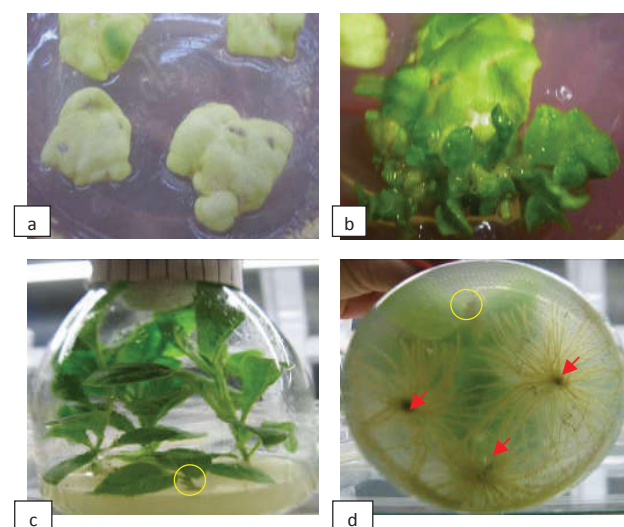
Sau 4 tuần chuyển gen, từ những khối mô viền quanh mép lá đã tạo ra một số lượng lớn cụm chồi. Lần biến nạp đầu tiên thu được 76 cụm chồi, lần 2 thu được 69 cụm chồi và lần 3 thu được 81 cụm chồi. Kết quả thí nghiệm cho thấy, số cụm chồi phát sinh trên mẫu dao động từ 2 đến 3, tuy nhiên, không phải tất cả các chồi này có mang gen cần chuyển. Để loại bỏ các chồi không được chuyển gen, trong cấu trúc vector đã

sử dụng gen chọn lọc là kanamycin và hygromycin. Trong nghiên cứu này, để loại bỏ các chồi không được chuyển gen, tiến hành tách các cụm chồi và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc (MS + 1 mg BAP + 50 mg/l kanamycin), quá trình chọn lọc này được thực hiện 3 lần. Kết quả đã thu được tất cả 226 cụm chồi.

Sau 3 tuần, các chồi trên cụm chồi của các mẫu chuyển gen sống sót sau chọn lọc được tách ra và nuôi cấy trên môi trường kéo dài chồi, ra rễ... Với tổng số 181 chồi cấy trên môi trường chọn lọc, chỉ thu được 106 chồi ra rễ. Như vậy có thể đánh giá bước đầu rằng, một trong những nguyên nhân chính của việc gây chết và không ra rễ là các chồi không mang gen được chuyển hoặc ở dạng thể khảm. Kết quả cho thấy, hiệu quả biến nạp gen *EcHB1* vào giống thuốc lá SNN khá tốt (đạt 58,56%).

Bảng 1: kết quả theo dõi khả năng tái sinh, chọn lọc của quá trình chuyển gen *EcHB1*

Lần thí nghiệm	Số mảnh lá biến nạp	Số cụm chồi thu được	Số chồi cấy trên môi trường chọn lọc	Số chồi ra rễ	Tỷ lệ (%)
1	30	76	68	41	60,29
2	30	69	50	28	56
3	30	81	63	37	58,73
Tổng số	90	226	181	106	58,56



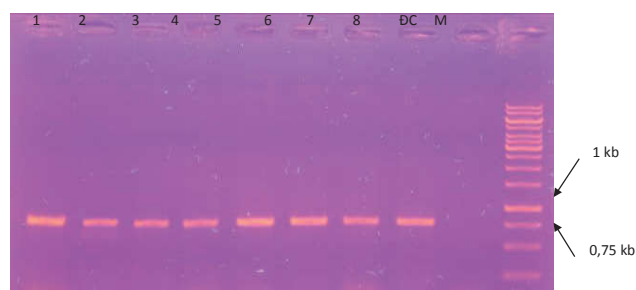
Hình 2: chồi thuốc lá chuyển gen tái sinh và ra rễ trên môi trường chọn lọc

Ghi chú: mũi tên màu đỏ chỉ cây chuyển gen, vòng tròn màu vàng chỉ cây không chuyển gen; mẫu biến nạp (a); chồi phát sinh sau biến nạp (b); chồi trên môi trường chọn lọc (c); chồi trên môi trường ra rễ (d)

Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen bằng PCR

PCR là kỹ thuật được sử dụng để xác định sự có mặt của gen chuyển trong cây chuyển gen. Trong nghiên cứu này, 8 dòng cây thuốc lá chuyển gen *EcHB1* đã được phân tích PCR nhân gen *EcHB1* với cặp mồi đặc

hiệu. Lá mới của 8 dòng này được thu và sau đó được nhân gen *EcHb1* bằng bộ kit Kapa 3G Plant PCR của hãng Biosystems và được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% để xác định sự có mặt của gen *EcHb1*.

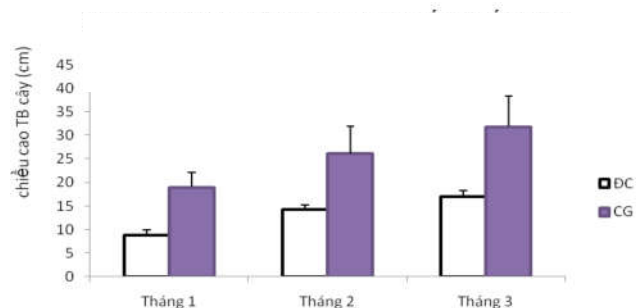


Hình 3: sản phẩm PCR nhân gen *EcHb1* điện di trên gel agarose 1%
Ghi chú: giếng M: marker ADN 1 kb; giếng 1-8: sản phẩm PCR nhân gen *EcHb1* từ 8 dòng chuyển gen; giếng DC: sản phẩm PCR nhân gen *EcHb1* từ dòng đối chứng

Kết quả điện di trên hình 3 cho thấy, cả 8 dòng chuyển gen đều xuất hiện một băng ADN duy nhất với kích thước khoảng 750 bp tương ứng với kích thước lý thuyết về thiết kế cặp mồi nhân gen *EcHb1*, còn dòng đối chứng không xuất hiện băng ADN. Điều này chứng tỏ sự có mặt của gen *EcHb1* trong 8 dòng cây thuốc lá chuyển gen.

Kết quả về sinh trưởng của cây thuốc lá chuyển gen

32 dòng thuốc lá chuyển gen và 30 cây đối chứng được trồng và theo dõi sinh trưởng tại vườn ươm. Sinh trưởng của các dòng thuốc lá chuyển gen và đối chứng được theo dõi sau 1, 2 và 3 tháng trồng. Kết quả sinh trưởng được trình bày trong hình 4.



Hình 4: sinh trưởng của dòng thuốc lá đối chứng và chuyển gen sau 3 tháng
Ghi chú: cột màu trắng là các cây đối chứng không mang gen chuyển, cột màu xanh là cây mang gen chuyển *EcHb1*

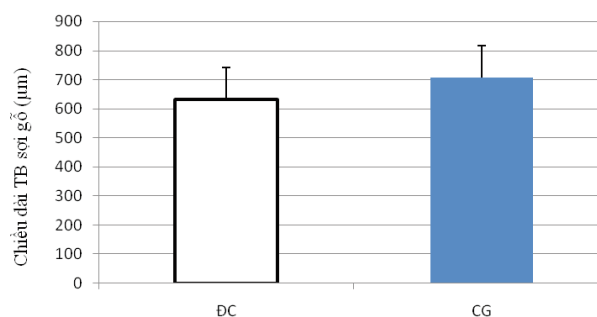
Kết quả ở hình 4 cho thấy, chiều cao của dòng đối chứng thấp hơn so với dòng chuyển gen và có sự sai khác về tốc độ sinh trưởng giữa dòng thuốc lá đối chứng và chuyển gen. Sau 3 tháng, chiều cao trung bình của dòng thuốc lá chuyển gen là 31,88 cm, lớn hơn 87,5% so với dòng thuốc lá đối chứng (17 cm).

Phân tích phương sai một nhân tố cho kết quả $F_1 = 299,01$; $F_2 = 122,23$; $F_3 = 143,06 > F_{crit} = 4,001$ chứng tỏ có sự sai khác về sinh trưởng giữa dòng thuốc lá đối chứng và dòng chuyển gen. Điều này cho thấy gen *EcHb1* đã biểu hiện rất rõ rệt trong quá trình biệt hóa xylem làm tăng chiều dài sợi gỗ.

Nghiên cứu về ảnh hưởng của các gen thuộc nhân tố phiên mã (transcription factors) đến quá trình tổng hợp thành tế bào của cây và ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây đã được chứng minh trên cây ngô [11], cây *Arabidopsis* [12]. Các nghiên cứu này cho thấy, khi các gen thuộc nhóm nhân tố phiên mã hoạt động mạnh thì mức độ tổng hợp thành tế bào tăng lên, số lượng tế bào được hình thành nhiều hơn... và sinh trưởng của cây cũng tăng lên.

Kết quả về phân tích chiều dài sợi gỗ

Sau 3 tháng, cây thuốc lá đã hình thành 1 lớp gỗ mỏng. Chọn 7 dòng thuốc lá, gồm 6 dòng thuốc lá chuyển gen (3 dòng sinh trưởng tốt, 3 dòng sinh trưởng kém) và 1 cây đối chứng, lấy mẫu đo chiều dài sợi gỗ trên kính hiển vi. Số liệu thu được được thể hiện trên hình 5.



Hình 5: chiều dài sợi gỗ của dòng thuốc lá đối chứng và chuyển gen

Qua số liệu thu được cho thấy, chiều dài trung bình sợi gỗ của cây đối chứng là 631,25 μm và cây chuyển gen là 707,53 μm. Chiều dài sợi gỗ của dòng thuốc lá chuyển gen dài hơn 12% so với dòng đối chứng. Phân tích phương sai một nhân tố cho kết quả $F = 7,77 > F_{crit} = 3,9$ chứng tỏ sai khác có ý nghĩa. Như vậy, gen *EcHb1* sau khi chuyển vào cây thuốc lá đã có biểu hiện khá tốt trong việc biệt hóa các tế bào xylem làm tăng chiều dài sợi gỗ. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Sonoda và CTV [9]. Các tác giả này khi phân tích chiều dài sợi gỗ của dòng thuốc lá chuyển gen *EcHb1* thấy dài hơn các dòng đối chứng 1,2 lần.

Kết quả nghiên cứu trên khẳng định cấu trúc vector chuyển gen pGWB2/35S/EcHB1/NOS thiết kế hoạt động tốt và cấu trúc này là nguồn vật liệu di truyền để chuyển vào các đối tượng cây lâm nghiệp như keo, bạch đàn... tạo giống sinh trưởng nhanh, chất lượng gỗ tốt.



Dòng thuốc lá đối chứng

Dòng thuốc lá chuyển gen

Hình 6: tiêu bản chiều dài sợi gỗ của dòng thuốc lá đối chứng và chuyển dưới độ phóng đại 40x

Kết luận

1) Đã chuyển thành công cấu trúc gen tăng chiều dài sợi gỗ (gen *EcHB1*) vào dòng thuốc lá SNN thông qua *A. tumefaciens* và thu được 69 dòng chuyển gen ra rễ trên môi trường chọn lọc.

2) Đã kiểm tra sự có mặt gen *EcHB1* ở đại diện ngẫu nhiên 8 dòng thuốc lá chuyển gen bằng PCR, kết quả cả 8 dòng đều dương tính với gen *EcHB1*.

3) Các dòng thuốc lá chuyển gen *EcHB1* sinh trưởng cao hơn 87,5% so với cây đối chứng sau 3 tháng tuổi.

4) Các dòng thuốc lá chuyển gen có chiều dài sợi gỗ lớn hơn 12% so với dòng đối chứng sau 3 tháng tuổi.

Lời cảm ơn

Công trình được hoàn thành bởi kinh phí của đề tài “Nghiên cứu tạo giống bạch đàn lai biến đổi gen cho chiều dài sợi gỗ ở Việt Nam” thuộc Chương trình trọng điểm ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ của đề tài và Chương trình.

Tài liệu tham khảo

[1] Rueda E.C, Dezar C.A, Gonzalez D.H, Chan R.L (2005), “Hahb-10, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is regulated by light quality and quantity, and promotes early flowering when

expressed in Arabidopsis”, *Plant and cell physiology*, **46**, pp.1954-1963.

[2] Schena M, Davis R.W (1994), “Structure of homeobox-leucine zipper genes suggests a model for the evolution of gene families”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**, pp.8393-8397.

[3] Haake V, Cook D, Riechmann J, Pineda O, Thomashow M.F, Zhang J.Z (2002), “Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis”, *Plant Physiology*, **130**, pp.639-648.

[4] Johannesson H, Wang Y, Engström P (2001), “DNA-binding and dimerization preferences of Arabidopsis homeodomain-leucine zipper transcription factors in vitro”, *Plant Molecular Biology*, **45**, pp.63-73.

[5] Carabelli M, Morelli G, Whitelam G, Ruberti I (1996), “Twilight-zone and canopy shade induction of the Athb-2 homeobox gene in green plants”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, pp.3530-3535.

[6] Baima S, Nobili F, Sessa G, Lucchetti S, Ruberti I, Morelli G (1995), “The expression of the Athb-8 homeobox gene is restricted to provascular cells in Arabidopsis thaliana”, *Development*, **121**, pp.4171-4182.

[7] Di Cristina M, Sessa G, Dolan L, Linstead P, Baima S, Ruberti I, Morelli G (1996), “The Arabidopsis Athb-10 (GLABRA2) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development”, *The Plant Journal*, **10**, pp.393-402.

[8] Ariel F.D, Manavella P.A, Dezar C.A, Chan R.L (2007), “The true story of the HD-Zip family”, *Trends in Plant Science*, **12**, pp.419-426.

[9] Sonoda T, Koita H, Nakamoto-Ohta S, Kondo K, Suezaki T, Kato T, Ishizaki Y, Nagai K, Lida N, Sato S, Umezawa T, Hibino T (2009), “Increasing fiber length and growth in transgenic tobacco plants overexpressing a gene encoding the Eucalyptus camaldulensis HD-Zip class II transcription factor”, *Plant Biotechnology*, **26**, pp.115-120.

[10] Topping J (1998), “Tobacco Transformation”, In Foster G, Taylor S (Ed.) (Eds.) *Plant Virology Protocols*. ed. Humana Press, **81**, pp.365-372.

[11] Bosch M, Mayer C.D, Cookson A, Donnison I.S (2011), “Identification of genes involved in cell wall biogenesis in grasses by differential gene expression profiling of elongating and non-elongating maize internodes”, *Journal of Experimental Botany*, **62**, pp.3545-3561.

[12] Baima S, Possenti M, Matteucci A, Wisman E, Altamura M.M, Ruberti I, Morelli G (2001), “The Arabidopsis ATHB-8 HD-zip protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems”, *Plant Physiology*, **126**, pp.643-655.