

Consorci



IRTA



Consorci CSIC-IRTA

Laboratori de Genètica Molecular Vegetal
Departament de Genètica Molecular

Universitat de Barcelona

Facultat de Biologia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

**CONTROL MOLECULAR I FISIOLÒGIC
DE LA SÍNDROME DE FUGIDA DE L'OMBRA
EN *ARABIDOPSIS THALIANA***

Irma Roig i Villanova
Barcelona, Juny de 2007

3. RESULTATS

Capítol I. Estudi dels gens regulats primerencament pels fitocroms en el procés de la síndrome de fugida de l'ombra (SAS)

1. Identificació de gens regulats primerencament pels fitocroms en la SAS

El primer objectiu concret d'aquest treball va ser identificar gens diana primerencs dels fitocroms en resposta a la inducció de la SAS en plàntules d'arabidopsis cultivades en llum. La nostra hipòtesi de partida era que alguns dels gens regulats ràpidament pels fitocroms en altres processos fotomorfogènics, com ara la desetioliació de la plàntula, també ho estarien en aquest procés. Vam observar que alguns dels gens que ja havien estat descrits com a ràpidament induïts per la SAS (*ATHB2*, *ATHB4*) (Carabelli i col., 1993;1996) també estaven ràpidament reprimits durant la desetioliació de la plàntula per llum FR (Tepperman i col., 2001) (**figura R.1A, B**).

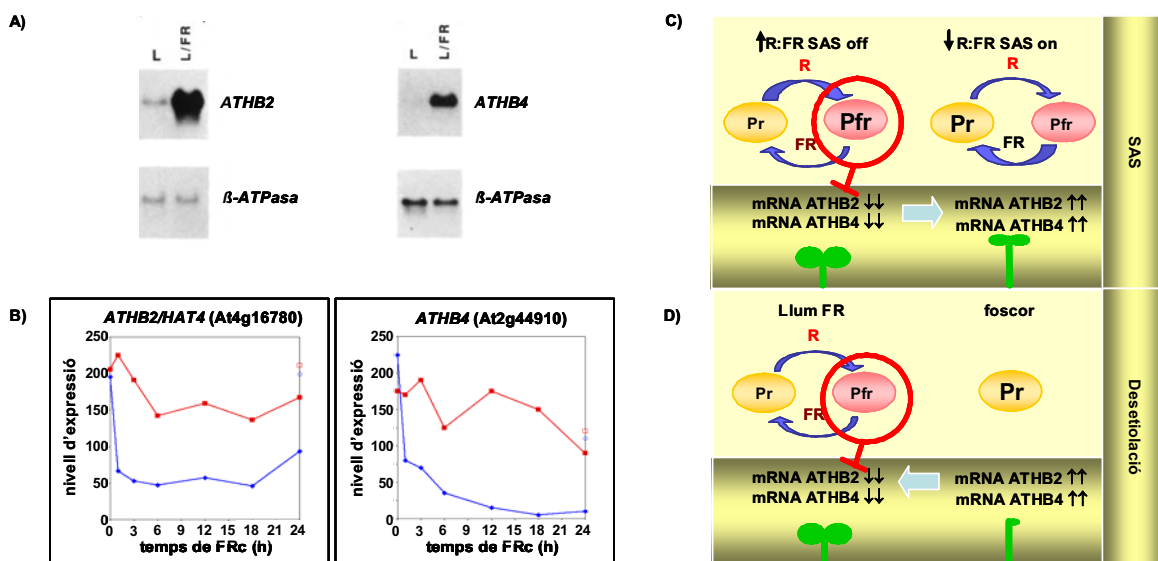


Figura R.1. Canvis en l'expressió dels gens *ATHB2* i *ATHB4* als tractaments de desetioliació i SAS, i la seva correlació amb els nivells de la forma activa Pfr dels fitocroms. A, inducció de l'expressió d'*ATHB2* i *ATHB4* en plantes de 5 setmanes sotmeses a 1h de llum incandescent (baixa raó R:FR, L/FR), comparat amb les plantes control sense tractar (L) (Carabelli i col., 1993). Inducció de l'expressió d'*ATHB4* en plantes de 5 setmanes per 1h de llum incandescent (L/FR), comparat amb plantes control sense tractar (L). **B,** evolució de l'expressió d'*ATHB2* i *ATHB4* durant la desetioliació de plàntules per llum FR (Tepperman i col., 2001). En vermell, nivells d'expressió del gen en plantes mutants *phyA*. En blau, nivells d'expressió en plantes silvestres. **C,** en condicions de SAS apagada (esquerra), la forma més abundant del fitocrom és la forma activa Pfr, que es troba repriment l'expressió d'*ATHB2* i *ATHB4*. Quan la SAS s'activa (dreta) el fotoequilibri dels fitocroms es desplaça cap a la forma inactiva Pr, alliberant la repressió d'*ATHB2* i *ATHB4*. **D,** quan la planta es troba etiolada (dreta) el fitocrom està en la forma inactiva, i *ATHB2* i *ATHB4* no es troben reprimits. Quan la planta es desetioli (esquerra) apareix la forma activa del fitocrom, que reprimeix l'expressió d'*ATHB2* i *ATHB4*.

Tot i que la llum FR aplicada regula l'expressió d'aquests gens durant la desetiolació i durant la SAS en direccions oposades (repressió i activació, respectivament), en tots dos casos els nivells baixos d'expressió es correlacionen amb alts nivells de Pfr, el que suggereix que l'expressió d'aquests gens està reprimida per l'acció de la forma activa dels fitocroms (**figura R.1C, D**). Per tal d'identificar altres gens que presentaren aquest patró d'expressió durant tots dos processos, vam buscar en la bibliografia gens que fossin ràpidament reprimits durant la desetiolació de la plàntula sota llum FRc (Tepperman i col., 2001). A més d'*ATHB2* i *ATHB4*, vam trobar gens que codificaven un factor desconegut (At2g42870; que a partir d'ara anomenarem *PAR1*, veure més endavant), un factor de transcripció del tipus bHLH (At2g46970; *PIL1*), una putativa pectinesterasa (At4g25260; *RIP*), una β -expansina (At2g20750; *β -EXP*), i quatre factors de transcripció i/o reguladors del creixement originalment classificats com a tardanament reprimits, però que mostraven una clara repressió tan sols 1 hora després de la irradiació: una proteïna DELLA (At1g14920; *GAI*), *HAT2* (At5g47370), *HAT7* (At5g15150) i *SCL1* (At2g04890) (**figura R.2**). Més recentment, aquesta llista s'ha ampliat a un altre gen, *HFR1* (Sessa i col., 2005). Per això, en alguns pocs experiments hem analitzat també l'expressió d'aquest gen.

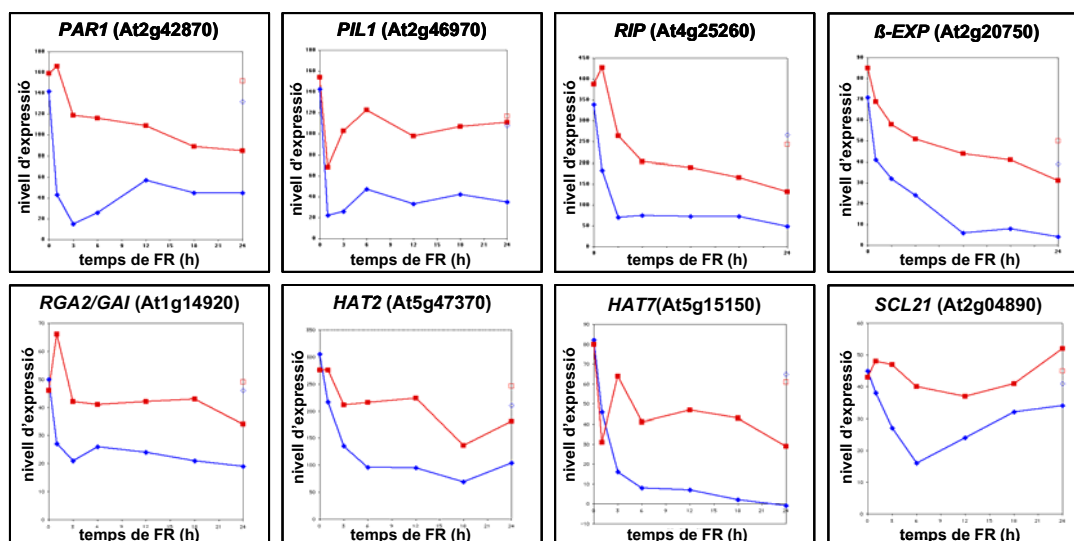


Figura R.2. Evolució de l'expressió del conjunt de gens ràpidament reprimits durant la desetiolació per llum FR (Tepperman i col., 2001). En vermell, nivells d'expressió del gen en plantes mutants *phyA*. En blau, nivells d'expressió en plantes silvestres.

Vam estudiar l'expressió dels gens seleccionats mitjançant anàlisis *northern-blot* en plàntules cultivades durant 7 dies (7d) sota llum blanca continua (d'ara en endavant Wc), abans (0) i 1 hora (1) després d'enriquir-la amb llum FR (W+FR=ombra simulada) en els ecotips silvestres d'*arabidopsis* Col-0, No-0 i Ler (**figura R.3**).

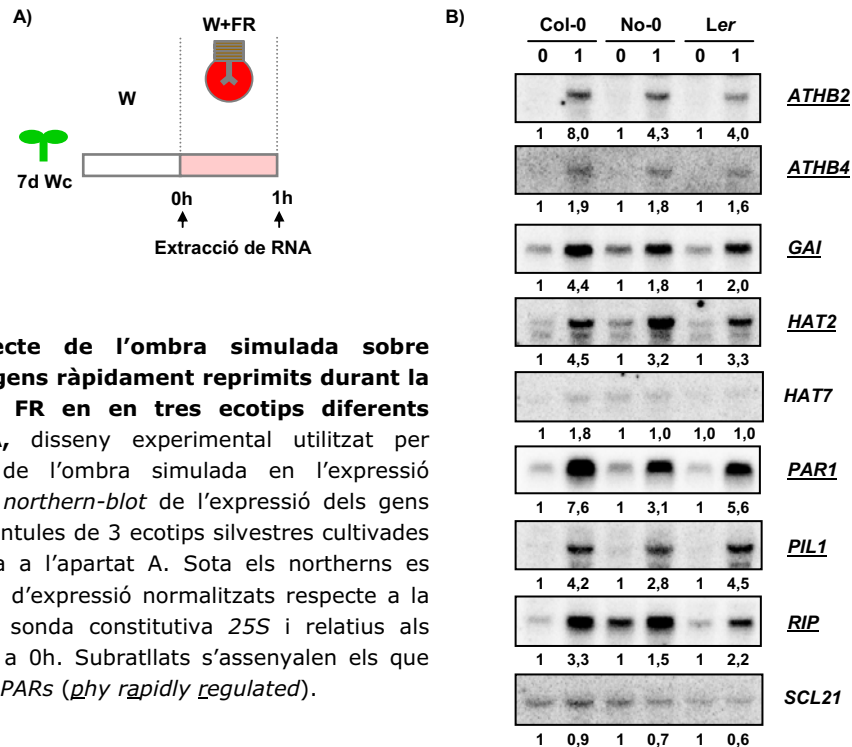


Figura R.3. Efecte de l’ombra simulada sobre l’expressió dels gens ràpidament reprimits durant la desetiolació per FR en en tres ecotips diferents d’arabidopsis. **A**, disseny experimental utilitzat per estudiar l’efecte de l’ombra simulada en l’expressió gènica. **B**, anàlisi *northern-blot* de l’expressió dels gens seleccionats en plàntules de 3 ecotips silvestres cultivades tal i com s’explica a l’apartat A. Sota els northerns es mostren els valors d’expressió normalitzats respecte a la hibridació amb la sonda constitutiva 25S i relatius als valors d’expressió a 0h. Subratllats s’assenyalen els que considerem com a *PARs* (*phy rapidly regulated*).

Com calia esperar, l’expressió d’*ATHB2* i *ATHB4*, els 2 gens ja descrits com a implicats en les respostes de la SAS, estava induïda per ombra simulada en els tres ecotips utilitzats. L’ombra simulada també induí l’expressió de *GAI*, *HAT2*, *PAR1*, *PIL1* i *RIP*. Per contra, els canvis en la raó R:FR no afectaren l’expressió de *HAT7* i *SCL21*, mentre que l’expressió de *β-EXP* no era detectable en les plàntules utilitzades en aquest estudi (dades no mostrades). Als 7 gens identificats en aquests experiments com a ràpidament induïts per l’ombra simulada (*ATHB2*, *ATHB4*, *GAI*, *HAT2*, *PAR1*, *PIL1* i *RIP*) els vam anomenar conjuntament gens *PAR* (de l’anglès *phytochrome rapidly regulated* genes), i van ser els gens escollits per continuar els estudis sobre la SAS utilitzant-los en posteriors experiments. A la proteïna codificada pel gen At2g42870, per la qual no s’havia descrit cap funció fins al moment, vam anomenar-la *PAR1*, prenent el nom general del grup.

Durant la realització d’aquesta tesi va ser publicada la implicació de *PIL1* en la SAS (Salter i col., 2003). Amb posterioritat a l’inici d’aquest treball altres grups han mostrat, mitjançant anàlisis de micromatrius de RNA, que alguns d’aquests gens candidats que nosaltres havíem escollit estaven induïts per ombra simulada (Devlin i col., 2003).

2. Efecte de la qualitat de la llum sobre l’expressió dels *PARs*

Per estudiar si els canvis en la expressió dels gens *PAR* depenien realment de la qualitat de la llum, vam exposar plàntules silvestres (ecotip No-0) cultivades 7d en Wc a

diferents raons R:FR, i vam analitzar l'expressió dels *PARs* just abans (0h) i 1h després del tractament (**figura R.4**).

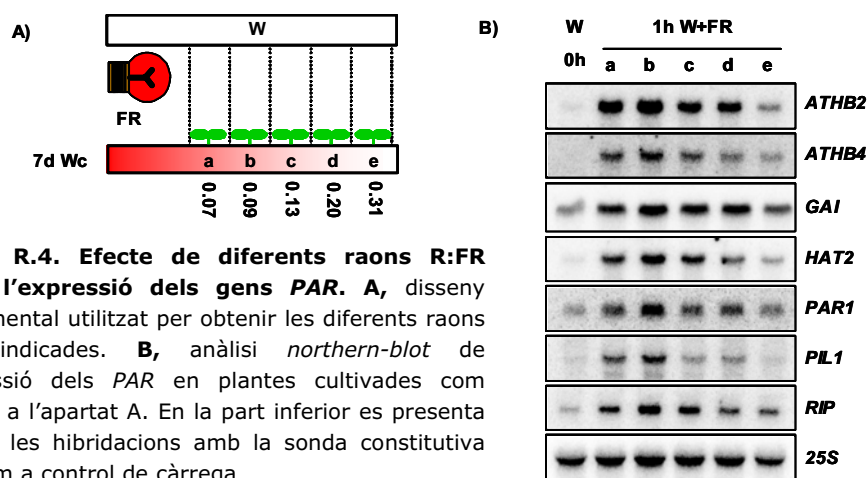


Figura R.4. Efecte de diferents raons R:FR sobre l'expressió dels gens *PAR*. **A**, disseny experimental utilitzat per obtenir les diferents raons R:FR indicades. **B**, anàlisi *northern-blot* de l'expressió dels *PAR* en plantes cultivades com s'indica a l'apartat A. En la part inferior es presenta una de les hibridacions amb la sonda constitutiva *25S* com a control de càrrega.

Els nivells d'inducció variaven des d'una resposta màxima per a les raons R:FR més baixes (0.07-0.09) a un menor efecte per a la raó R:FR més alta (0.31). Això ho vam observar per a tots els gens *PAR*. Aquests resultats confirmen que la ràpida inducció d'*ATHB2*, *ATHB4*, *GAI*, *HAT2*, *PAR1*, *PIL1* i *RIP* és realment dependent de l'ombra simulada, i inversament proporcional a aquesta (és a dir, a raons R:FR més baixes, major inducció de l'expressió).

3. Efecte dels diferents fotoreceptors sobre l'expressió dels *PARs*

Es va estudiar la participació dels diferents fotoreceptors en la regulació dels gens *PAR* durant la SAS. El paper dels fitocroms es va analitzar utilitzant línies transgèniques que sobreexpressen el *phyA* de civada (*Avena sativa*) (línia AOX, Boylan i Quail, 1991), o el *phyB* d'arabidopsis (línia ABO, Wagner i col., 1991). A l'inici d'aquest treball els tractaments d'ombra simulada que feiem per analitzar les respostes fisiològiques de la SAS eren idèntics als ja descrits per altres autors (Devlin i col., 2003), i consistien en cultivar plantes 7d en Wc i mantenir-les en W o bé transferir-les a W+FR durant 24h, després de les quals es mesurava la llargada dels seus hipocòtils. Posteriorment en el nostre laboratori s'ha optimitzat el tractament d'ombra simulada (apartat 7 del capítol I), és per això que al llarg d'aquest treball es presenten els dos tipus de tractament. Així, plàntules silvestres i AOX, ABO cultivades 7d en Wc van ser mantingudes en W o bé transferides a W+FR durant 24h, i es va mesurar la llargada dels seus hipocòtils (**figura R.5A, B**).

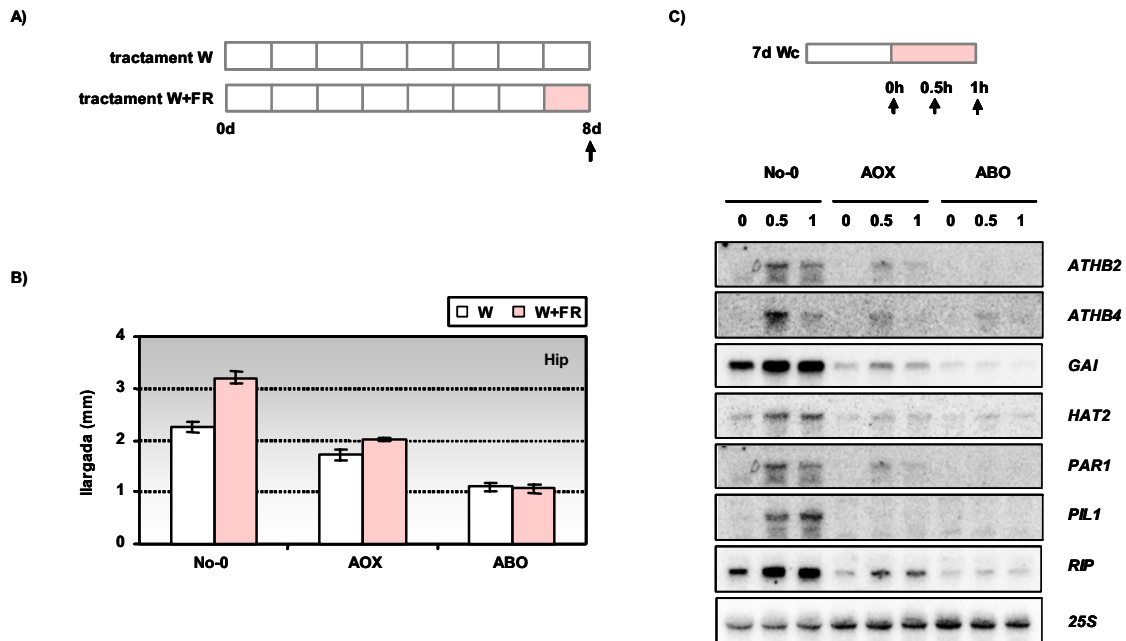


Figura R.5. Efecte d'alts nivells de *phyA* (AOX) i *phyB* (ABO) sobre l'allargament de l'hipocòtil i la inducció de l'expressió dels *PARs* per l'ombra simulada. **A**, disseny experimental utilitzat per estudiar els efectes de l'ombra simulada en el fenotip de la plàntula. **B**, mesura de la llargada dels hipocòtils en plàntules silvestres (No-0), AOX i ABO, cultivades tal i com s'indica a l'apartat A. **C**, anàlisi *northern-blot* de l'expressió dels gens *PAR* en plàntules silvestres, AOX i ABO, cultivades tal i com s'indica a l'esquema superior. Com a control de càrrega es mostra la hibridació amb la sonda constitutiva 25S.

Les plàntules silvestres tractades amb ombra simulada mostraven hipocòtils més llargs que les plàntules mantingudes sota W, la qual cosa evidencia la resposta de la SAS. Aquesta resposta estava atenuada en les plàntules de sobreexpressió dels fitocroms, essent les de la línia ABO les que mostraven una inhibició més forta de la resposta. Aquests resultats suggereixen la participació dels fotoreceptors fitocroms en la resposta fisiològica de la SAS. Es va analitzar l'expressió dels gens *PAR* mitjançant *northern-blot* en plàntules de les línies No-0, AOX i ABO cultivades 7d en Wc abans (0h), 0.5h i 1h després del tractament d'ombra simulada (**figura R.5C**). L'expressió dels gens *PAR* estava afectada en ambdues línies de sobreexpressió, detectant-se nivells reduïts de tots els *PARs* abans i després del tractament d'ombra simulada comparat amb el silvestre.

Anàlisis similars es van realitzar en el mutant *phyB*. Aquest mutant presenta un fenotip allargat similar a una resposta de la SAS constitutiva (Devlin i col., 1992; Lopez-Juez i col., 1992; Tian i col., 2002), tot i que encara és capaç de respondre a tractaments d'ombra simulada (Whitelam i Smith, 1991). Vam analitzar l'expressió dels gens *PAR* en mutants *phyB* i el seu ecotip silvestre en plàntules d'*arabidopsis* sotmeses a un tractament de llum idèntic a l'aplicat en les línies de sobreexpressió (**figura R.6**).

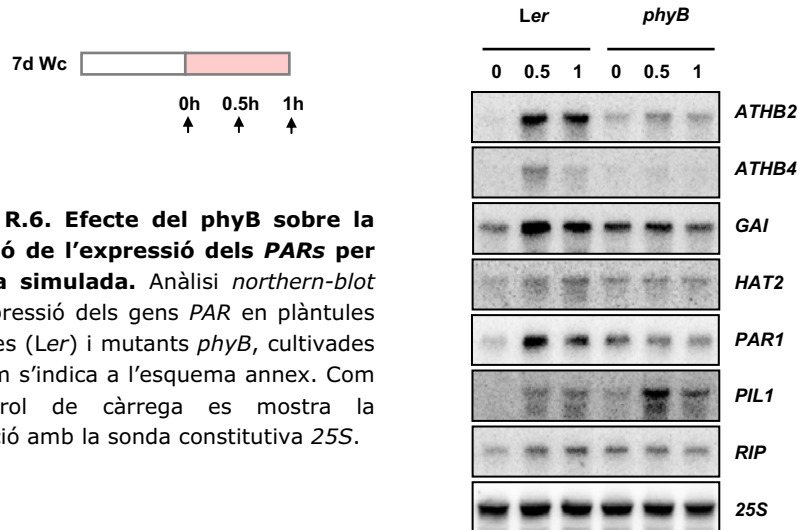


Figura R.6. Efecte del *phyB* sobre la inducció de l'expressió dels *PARs* per l'ombra simulada. Anàlisi *northern-blot* de l'expressió dels gens *PAR* en plàntules silvestres (*Ler*) i mutants *phyB*, cultivades tal i com s'indica a l'esquema annex. Com a control de càrrega es mostra la hibridació amb la sonda constitutiva 25S.

A les 0h, s'observa que l'expressió de tots els *PARs* és lleugerament més alta en les plàntules mutants *phyB* que en les silvestres. Això podria estar indicant que la manca de *phyB* suposaria una desrepressió de l'expressió dels *PARs* en W. Pel que fa a l'expressió dels *PARs* durant el tractament d'ombra simulada, no podem concloure un patró de comportament comú per a tots ells, ja que per alguns la inducció de l'expressió per ombra simulada és més forta que en la línia silvestre (com seria el cas de *PIL1*), mentre que en d'altres pràcticament no varia (*RIP*), o està clarament reduïda (*ATHB2*, *ATHB4*, *PAR1*). Conjuntament, aquests resultats indiquen que nivells elevats de fitocroms mantenen una forta repressió de l'expressió dels gens *PAR* en plàntules cultivades en llum, en consistència amb la nostra hipòtesi de partida (**figura R.1C, D**).

Per tal d'analitzar l'especificitat d'aquestes respostes moleculars, és a dir, per determinar si la regulació de l'expressió dels *PARs* depenia exclusivament dels fotoreceptors fitocroms, es va estudiar el paper d'altres fotoreceptors utilitzant un mutant del receptor criptocrom *CRY1* (línia *hy4-1*, Yang i col., 2001; Lin i Shalitin, 2003) que, com el mutant *phyB*, també presenta hipocòtils llargs. Es va analitzar l'expressió dels gens *PAR* mitjançant *northern-blot* en plàntules silvestres i *hy4-1* sotmeses a un tractament de llum idèntic a l'aplicat en el mutant *phyB* (**figura R.7**). L'expressió dels gens *PAR* no estava afectada en el mutant comparat amb el silvestre. Aquest resultat indica que el fotoreceptor *CRY1* no participa en la regulació de l'expressió dels gens *PAR* per ombra simulada.

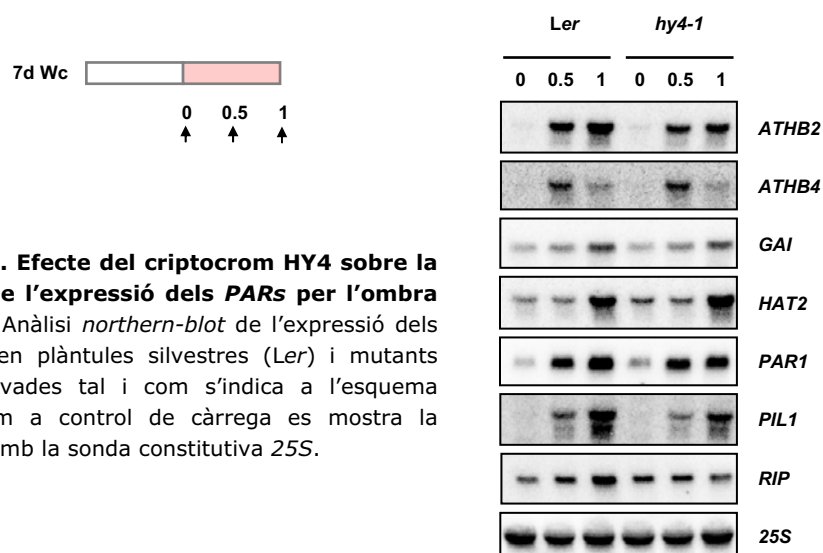


Figura R.7. Efecte del criptocrom HY4 sobre la inducció de l'expressió dels PARs per l'ombra simulada. Anàlisi *northern-blot* de l'expressió dels gens *PAR* en plàntules silvestres (*Ler*) i mutants *hy4-1* cultivades tal i com s'indica a l'esquema annex. Com a control de càrrega es mostra la hibridació amb la sonda constitutiva 25S.

4. Identificació dels gens *PAR* diana primaris de l'acció dels fitocroms durant la SAS

La rapidesa dels canvis en l'expressió gènica induïts per l'ombra simulada és consistent amb la hipòtesi de que els fitocroms transmeten el senyal de llum ràpidament als promotors dels gens fotoregulats (Martinez-Garcia i col., 2000; Quail, 2002b). No obstant, els ràpids canvis observats en l'expressió dels gens *PAR* no impliquen que tots ells siguin necessàriament diana primaris (és a dir, directes) de l'acció dels fitocroms. Per esbrinar si algun dels gens *PAR* identificats era un gen diana primari dels fitocroms es va utilitzar l'inhibidor de síntesi de proteïnes cicloheximida (CHX). La nostra hipòtesi era que la resposta a l'ombra dels gens diana primaris dels fitocroms no estaria afectada per la CHX, ja que no es requeriria síntesi *de novo* de proteïnes per aquesta resposta. En canvi, per als gens diana secundaris (o indirectes) de l'acció dels fitocroms, la CHX bloquejaria la seva regulació per llum, ja que les proteïnes que regulen la seva expressió no s'estarien traduïnt (**figura R.8**).

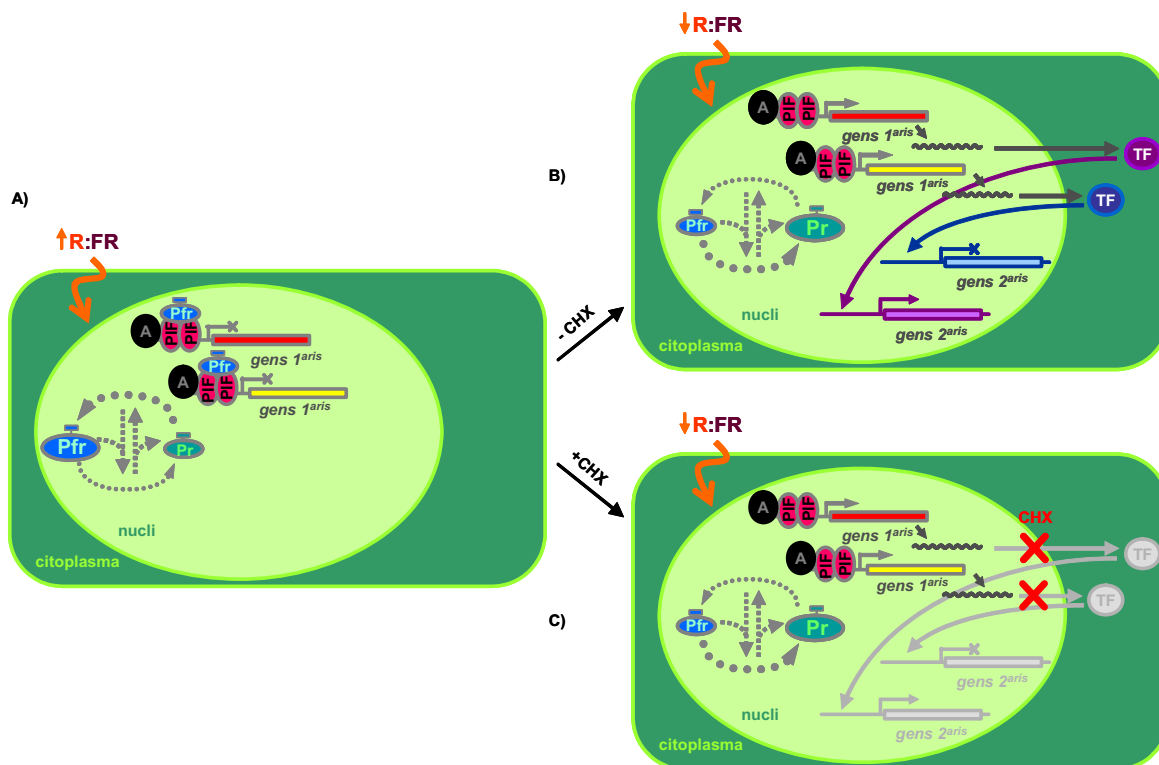


Figura R.8. Esquema de l'efecte de la cicloheximida sobre la transducció del senyal lumínic.

A, a altes raons R:FR, la forma activa dels fitocroms es troba unida als promotors d'un conjunt de gens via PIFs, inhibint la seva transcripció. Quan la raó R:FR baixa, **B**, en absència de CHX, els fitocroms alliberen la repressió dels gens fotoregulats i els gens diana primaris de l'acció dels fitocroms es transcriuen i tradueixen, i les proteïnes resultants regulen l'expressió de gens secundaris. **C**, en presència de CHX, els gens diana primaris de l'acció dels fitocroms es transcriuen però la seva traducció està bloquejada, no podent regular l'expressió dels gens secundaris.

Per validar les nostres condicions experimentals, ens vam valer de la línia LhGR-N(4c) prèviament caracteritzada, en la què el gen reporter *GUS* és una diana directa del factor de transcripció LhGR (Craft i col., 2005). La localització nuclear (és a dir, l'activitat transcripcional) del factor LhGR és dependent del tractament amb el glucocorticoide sintètic dexametasona (DEX) (**figura R.9A**). En absència de CHX (-CHX) i com era d'esperar, les plàntules LhGR-N(4c) mostren una forta tinció GUS depenent de DEX (**figura R.9B**). En canvi, quan s'aplica alhora CHX 50 μ M (+CHX) i DEX 5 μ M (+DEX), la CHX bloqueja completament l'activitat GUS després de 24h, indicant que el tractament de CHX inhibeix eficientment la síntesi *de novo* de la proteïna GUS (**figura R.9B**).

La inhibició de la síntesi de GUS per CHX es va observar ja a les 2h després de l'aplicació conjunta de CHX i DEX. Malgrat això, si aplicàvem DEX 1h abans que la CHX obteníem resultats molt més reproduïbles (**figura R.9C**), indicant que el tractament de plàntules amb CHX durant només 2h bloquejava eficientment la síntesi *de novo* de la proteïna GUS, i per extensió, de totes les proteïnes cel·lulars. En subsegüents experiments vam tractar les plàntules amb 50 μ M CHX durant 2h abans d'iniciar els tractaments d'ombra simulada per analitzar els gens diana dels fitocroms *in planta*.

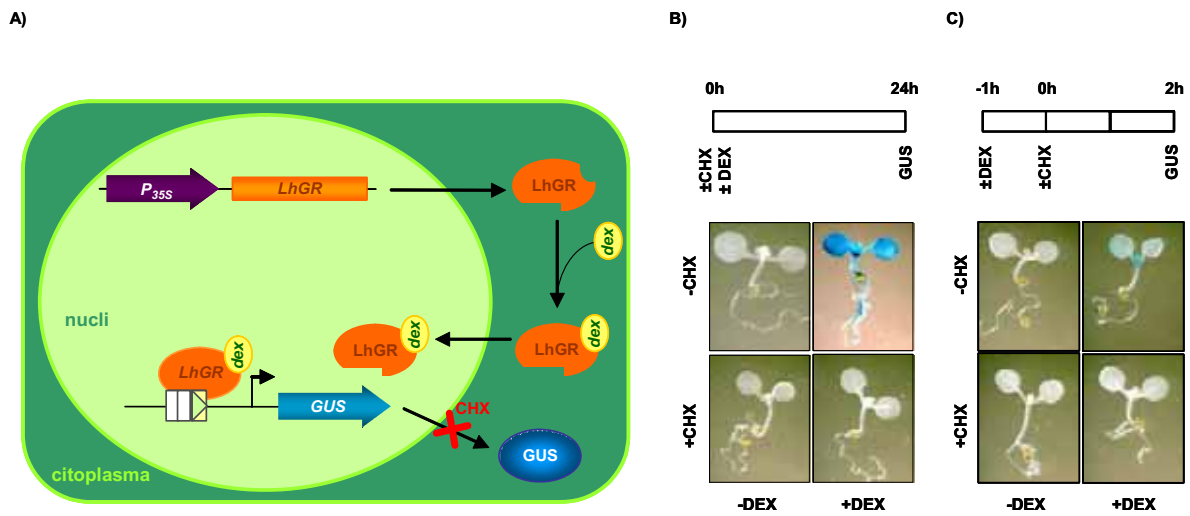


Figura R.9. Efecte de la CHX sobre l'activitat GUS de plàntules de la línia LhGR-N(4c) induïble per DEX. **A**, esquema del funcionament de la línia LhGR-N(4c). **B**, activitat GUS de les plàntules 24h després de l'aplicació simultània de ±CHX i ±DEX, tal i com s'explica a l'esquema superior. **C**, activitat GUS de les plàntules 2h després de l'aplicació de ±CHX i 3h després de l'aplicació de ±DEX, tal i com s'indica a l'esquema superior.

Així, plàntules cultivades 7d en Wc van ser pretractades amb o sense CHX 2h abans de transferir-les a W+FR per 1h, retornant-les a W per 1h més i analitzar l'expressió dels *PARs* per *northern-blot* (**figura R.10**).

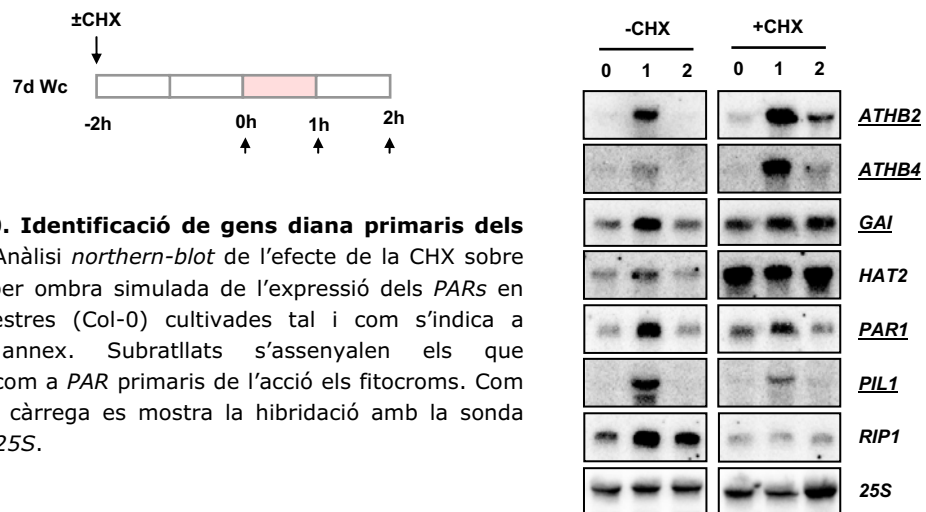


Figura R.10. Identificació de gens diàna primaris dels fitocroms. Anàlisi *northern-blot* de l'efecte de la CHX sobre la inducció per ombra simulada de l'expressió dels *PARs* en plantes silvestres (Col-0) cultivades tal i com s'indica a l'esquema annex. Subratllats s'assenyalen els que considerem com a *PAR* primaris de l'acció dels fitocroms. Com a control de càrrega es mostra la hibridació amb la sonda constitutiva 25S.

En -CHX, els nivells de mRNA dels *PARs* s'incrementaven després del tractament d'ombra simulada i es reduïen al transferir les plàntules a W, confirmant de nou que l'expressió dels *PARs* està ràpidament i reversiblement regulada per canvis en la qualitat de la llum. En +CHX, els nivells d'expressió d'uns determinats gens *PAR* estaven alterats fins i tot abans del tractament d'ombra simulada. L'efecte més fort era un clar increment en l'expressió de *HAT2*, un gen prèviament descrit com a induït per CHX (Sawa i col., 2002).

Els nivells de transcripció de *HAT2* i *RIP* estaven inalterats per l'ombra simulada en les plàntules +CHX. Al contrari, la inducció de l'expressió d'*ATHB2* i *ATHB4* per l'ombra simulada estava clarament incrementada en les plàntules +CHX, mentre que es detectava un lleuger increment en la inducció de *GAI*, *PAR1* i *PIL1* comparat amb el tractament -CHX. A més, la resposta reversible i fotoregulada dels últims 5 gens citats era qualitativament independent de CHX. D'aquests experiments es conclou que la inducció per ombra simulada d'un conjunt de gens *PAR* (*ATHB2*, *ATHB4*, *GAI*, *PAR1* i *PIL1*) no requereix síntesi *de novo* de proteïnes, indicant que són dianes directes de l'acció dels fitocroms en la SAS. *RIP* és un gen diana indirecte, mentre que en el cas de *HAT2*, l'alta sensibilitat de la seva expressió a la CHX no ens permet dir si és una diana directa dels fitocroms o no.

5. Estudi de la regió promotora dels gens *PAR*

Es va estudiar si els canvis en l'expressió dels *PARs* es devien a una regulació a nivell transcripcional, és a dir, si hi havia alteracions en l'activitat del seu promotor. Al no disposar d'informació prèvia en la bibliografia de cap dels promotors dels gens *PAR*, es va escollir sistemàticament una regió de 1 kb corrent amunt de l'inici de traducció de diferents gens *PAR* i la vam fusionar als gens reporters *GFP-GUS* ja presents en el vector binari pCAMBIA1304 (apartat 1.3.2 del material i mètodes). Amb les construccions resultants es van transformar plantes d'arabidopsis (apartat 2.4.3.1 del material i mètodes), que hem anomenat $P_{ATHB2}:GFP-GUS$, $P_{ATHB4}:GFP-GUS$, $P_{GAI}:GFP-GUS$, $P_{PAR1}:GFP-GUS$ i $P_{RIP}:GFP-GUS$. Com a controls s'utilitzaren línies $P_{35S}:GUS$ i $P_{35S}:GUS-GFP$. Es van obtenir diverses línies transgèniques per a cada construcció. A la generació T_2 , quan les plantes estaven encara segregant per a la presència del transgen, es feren assajos histoquímics GUS seleccionant aquelles línies que presentaven plàntules amb activitat GUS per a posteriors anàlisis. La **figura R.11** mostra un exemple d'aquesta preselecció.

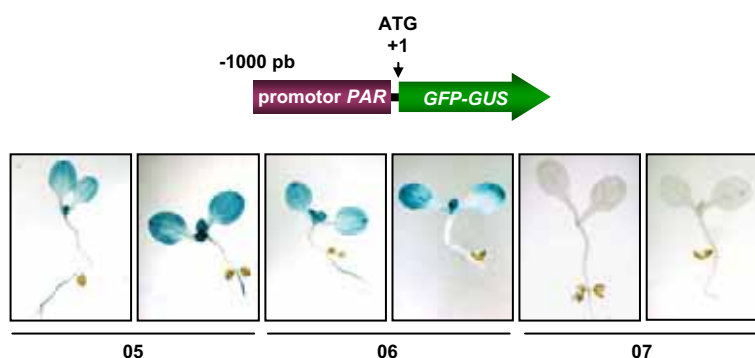


Figura R.11. Exemple de tinció GUS de plàntules transgèniques T_2 per a l'estudi de promotors. Es mostren 3 línies que contenen el mateix transgen però presenten diferents nivells d'activitat GUS.

Plàntules T₂ de 4-6 línies preseleccionades de cada construcció van ser cultivades 7d en Wc i l'expressió del gen *GUS* va ser analitzada per *northern-blot* abans (0h) i 1h després de simular ombra, excepte en el cas de les línies P_{ATHB4}:GFP-GUS, per a les que l'anàlisi es va fer a les 0 i 0.5h ja que experiments anteriors indiquen que l'expressió del gen *ATHB4* és més alta a les 0.5h que a 1h d'ombra simulada. La quantificació d'aquestes anàlisis es mostra a la **figura R.12A**.

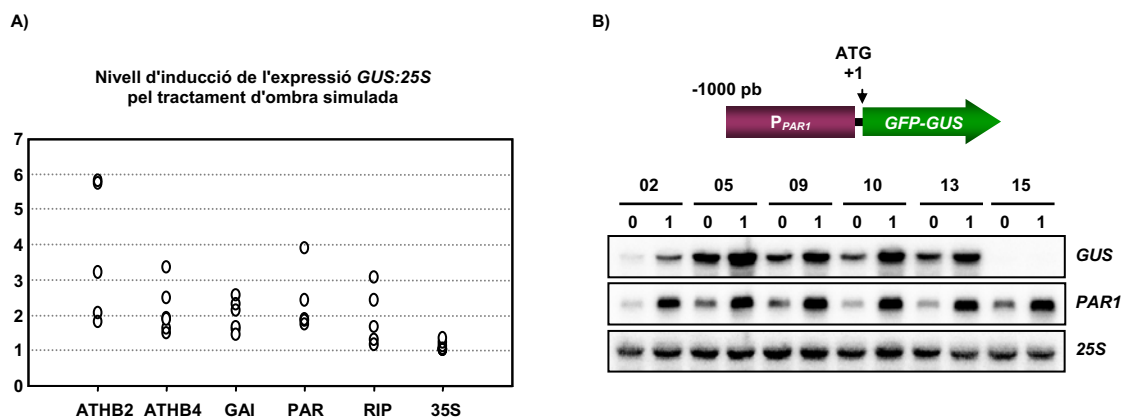


Figura R.12. Anàlisi de la regulació per ombra simulada de l'expressió del gen *GUS* sota el control de 1 kb del promotor de diferents *PARs*. **A**, anàlisi de l'expressió *GUS* en plàntules de 7d utilitzant de 5 a 8 línies transgèniques independents per a cada construcció. Els valors que es mostren representen la inducció de la expressió després del tractament de W+FR relativa a l'expressió a 0h. **B**, anàlisi *northern-blot* de l'expressió de *GUS* i de *PAR1* en diferents línies transgèniques de la construcció P_{PAR1}:GFP-GUS. Com a control de càrrega es mostra la hibridació amb la sonda constitutiva 25S. Les plàntules han estat cultivades tal i com s'indica a la figura R.3.

Tot i que les diferents línies presenten diferents nivells d'expressió de *GUS* a 0h, totes les línies excepte la P_{35S}:GUS mostren una clara inducció dels nivells de mRNA de *GUS* després de 1h d'ombra simulada (**figura R.12A**). Al analitzar l'expressió del gen *PAR* endogen corresponent en cada línia, en tots els casos aquesta presentava una fotoregulació normal. Un exemple es mostra a la **figura R.12B**. Aquestes dades mostren que les regions promotores dels *PARs* seleccionades (1 kb) són suficients per conferir resposta a l'ombra simulada a un gen reporter. Aquesta observació ens permet dir també que la regulació dels *PARs* es dona, almenys parcialment, a nivell transcripcional.

Es va fer una anàlisi més exhaustiva del promotor d'*ATHB2*, ja que es tractava del *PAR* per al que millor s'havia caracteritzat el seu paper en les respostes de la SAS fins al moment. Es va deletar de manera seriada el seu promotor, de nou fusionant-lo als gens reporters *GFP-GUS*. Ens referirem a les línies transgèniques resultants com a 500 pb P_{ATHB2}:GFP-GUS, 250 pb P_{ATHB2}:GFP-GUS, 200 pb P_{ATHB2}:GFP-GUS, 150 pb P_{ATHB2}:GFP-GUS i 100pb P_{ATHB2}:GFP-GUS. Les línies es van preseleccionar mitjançant la tinció GUS tal i com s'ha explicat anteriorment. Plàntules T₂ de 3-6 línies de cada construcció van ser cultivades 7d en Wc i l'expressió del gen *GUS* va ser analitzada per *northern-blot* abans (0h) i 1h després de simular ombra (**figura R.13**).

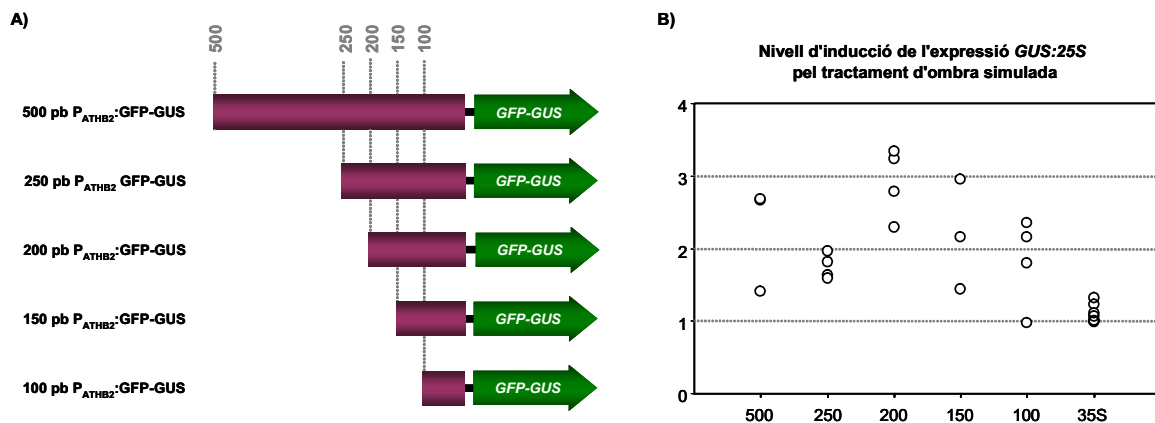
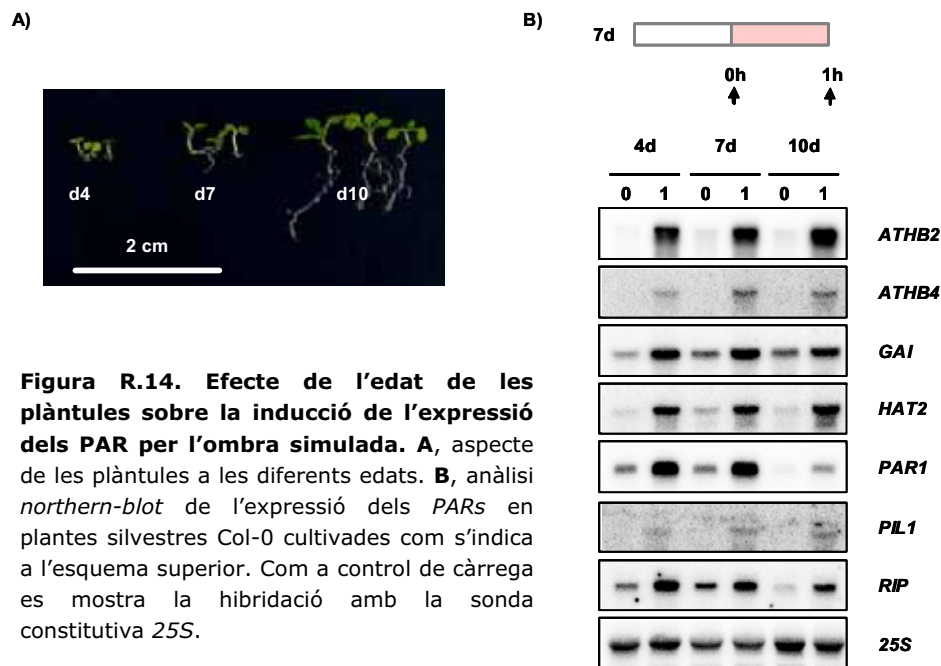


Figura R.13. Anàlisi de la regulació per ombra simulada de l'expressió del gen *GUS* sota el control de diferents fragments del promotor d'*ATHB2*. **A**, esquema de les diferents construccions utilitzades. **B**, anàlisi de l'expressió *GUS* en plàntules de 7d utilitzant de 3 a 6 línies transgèniques independents per a cada construcció. Els valors que es mostren representen la inducció de la expressió després de 1h de W+FR relativa a l'expressió a 0h.

Les anàlisis d'expressió del gen *GUS* en plantes transgèniques per aquestes construccions revelaren que 100 pb encara són capaces de fotoregular l'expressió d'*ATHB2*.

6. Estudi de l'expressió dels *PARs* durant el desenvolupament de la plàntula

Es va analitzar l'expressió dels gens *PAR* en resposta a la SAS en diferents moments del desenvolupament de la plàntula: 4, 7 i 10d d'edat. Als 4d d'edat les plàntules són petites i ja tenen els cotilèdons expandits (**figura R.14A**). Als 7d, les plàntules són més grans que a 4d ja que l'hipocòtil s'ha allargat, l'àrea dels cotilèdons s'ha incrementat i les fulles primàries comencen a ser visibles. Als 10d d'edat la llargada de l'hipocòtil de les plàntules és molt similar a la seva llargada als 7d, però el fenotip de les plàntules és clarament diferent degut a que aquestes ja presenten fulles primàries clarament desenvolupades (**figura R.14A**). Plàntules Col-0 de 4, 7 i 10d cultivades en Wc es van sotmetre a un tractament d'ombra simulada, analitzant l'expressió dels *PARs* just abans (0h) i 1h després del tractament (**figura R.14B**). L'expressió dels *PARs* a 0h canvia lleugerament en els diferents estadis de desenvolupament, essent subtilment més alta als 7d i més baixa als 10d. La inducció de l'expressió dels *PARs* 1h després del tractament d'ombra simulada era semblant en tots els estadis de desenvolupament analitzats, excepte en el cas de *PAR1* i *RIP*, que era més suau als 10d. Aquests resultats indiquen que els 7d és un estadi de desenvolupament òptim per estudiar els canvis d'expressió dels gens *PARs* en plàntules d'arabidopsis en resposta a l'ombra simulada.



7. Caracterització de les respostes fisiològiques a l'ombra simulada en plantes silvestres

Per caracteritzar, a més de l'allargament de l'hipocòtil, altres respostes fisiològiques de la SAS en plàntules d'*Arabidopsis thaliana*, hem dut a terme tractaments d'ombra simulada més prolongats (apartat 2.4.5.1 dels materials i mètodes). Essencialment, consisteix en cultivar les plàntules 2d en Wc. En aquest moment, un grup de plàntules es manté en W i un altre grup es sotmet a W+FR. Als 7d de cultiu s'analitza el fenotip de les plàntules (**figura R.15A**). Les respostes fisiològiques més aparents que es donen a nivell de plàntula davant l'ombra simulada són l'allargament de l'hipocòtil, cotilèdons i fulles primàries. Aquests tres paràmetres van ser els mesurats després dels tractaments d'ombra simulada (**figura R.15B**). Vam observar que les plàntules tractades amb ombra simulada eren més pàl·lides que les control. Per això en alguns experiments concrets es van realitzar anàlisis bioquímiques, quantificant els nivells de clorofil·les i carotenoides de les plàntules per HPLC (**figura R.15C**). Plantes silvestres Col-0 sotmeses a ombra simulada presenten un major allargament de l'hipocòtil, cotilèdons i fulles primàries que les cultivades en W, així com una menor acumulació de clorofil·les i carotenoides.

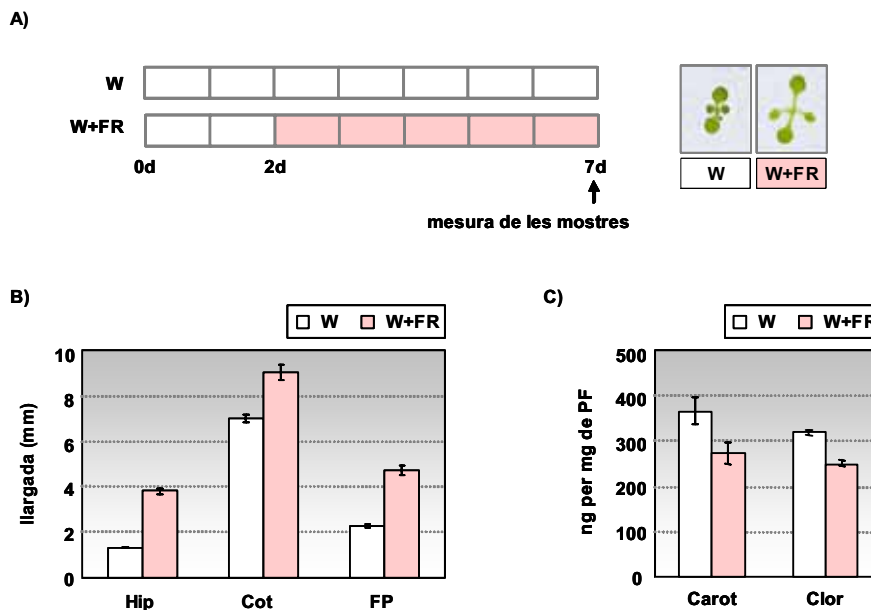


Figura R.15. Fenotip de plàntules silvestres Col-0 en resposta al tractament d'ombra simulada. **A**, disseny experimental utilitzat per estudiar l'efecte de l'ombra simulada en el fenotip fisiològic de la plàntula, i aspecte típic de plàntules sotmeses a aquest tractament. **B**, llargada de l'hipocòtil (Hip), cotilèdon (Cot) i fulles primàries (FP). **C**, nivells de carotenoides (Carot) i clorofil·les (Clor) presents en aquestes plàntules. En B i C les plantes han estat cultivades tal i com s'indica en l'apartat A.

El fet que el tractament d'ombra simulada provoqui una disminució dels nivells de clorofil·les i carotenoides en plàntules silvestres ens va plantejar la qüestió de si els canvis en els nivells d'aquests pigments també estaven reflectint canvis en els orgànuls cel·lulars que els contenen: els cloroplasts. Vam observar l'estructura subcel·lular de plàntules silvestres tractades i no tractades amb ombra simulada mitjançant microscòpia electrònica de transmissió (**figura R.16**), comparant la primera capa cel·lular per sota de l'epidermis als cotilèdons. Els cloroplasts de les plantes silvestres cultivades en Wc presenten un major nombre de grans de midó. El fet que els grans de midó en les plantes tractades amb ombra simulada no siguin més grans podria indicar que el contingut de midó en aquestes plantes és menor. A més, en W les plantes presenten més plastoglòbuls. En canvi, aquestes plantes semblen tenir menys grana apilada als tilacoïdes que les plantes tractades amb ombra simulada.

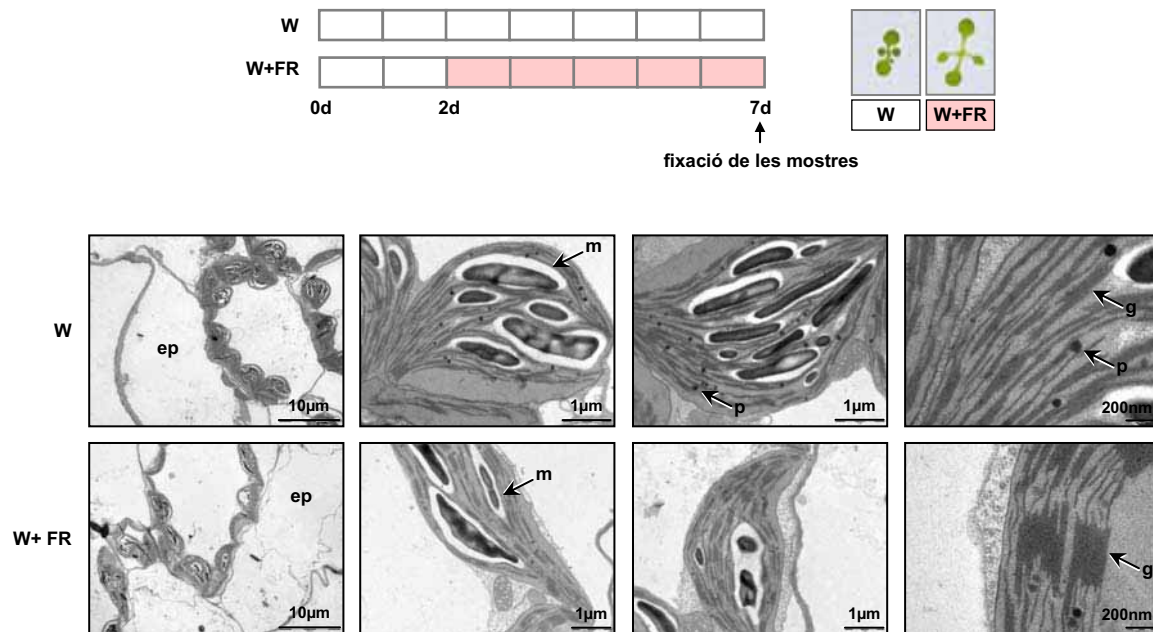


Figura R.16. Estructura subcel·lular de plantes silvestres Col-0 en resposta al tractament d'ombra simulada. Les plàntules han estat cultivades tal i com s'indica a l'esquema superior. ep, epidermis; g, grana; m, midó; p, plastoglòbuls.

8. Caracterització de les respostes fisiològiques a l'ombra simulada en diferents espècies del gènere *Arabidopsis*

Ens vam plantejar si altres espècies d'*Arabidopsis* també compartien les mateixes respostes fisiològiques i moleculars de la SAS. Per això es van analitzar les respostes fisiològiques a l'ombra simulada en plàntules d'*Arabidopsis thaliana* i d'altres 3 espècies del gènere *Arabidopsis*: *A. griffithiana*, *A. korshinskyi* i *A. pumila*. A la **figura R.17** es mostra l'aspecte d'aquestes plàntules, així com la mesura de l'allargament dels hipocòtils, cotilèdons i fulles primàries. Com s'observa, les plàntules de les espècies *A. griffithiana*, *A. korshinskyi* i *A. pumila* responen clarament al tractament d'ombra simulada, tant o més acusadament que *A. thaliana*. Aquests resultats indiquen que les plàntules de diferents espècies del gènere *Arabidopsis* responen fisiològicament de la mateixa manera davant la SAS.

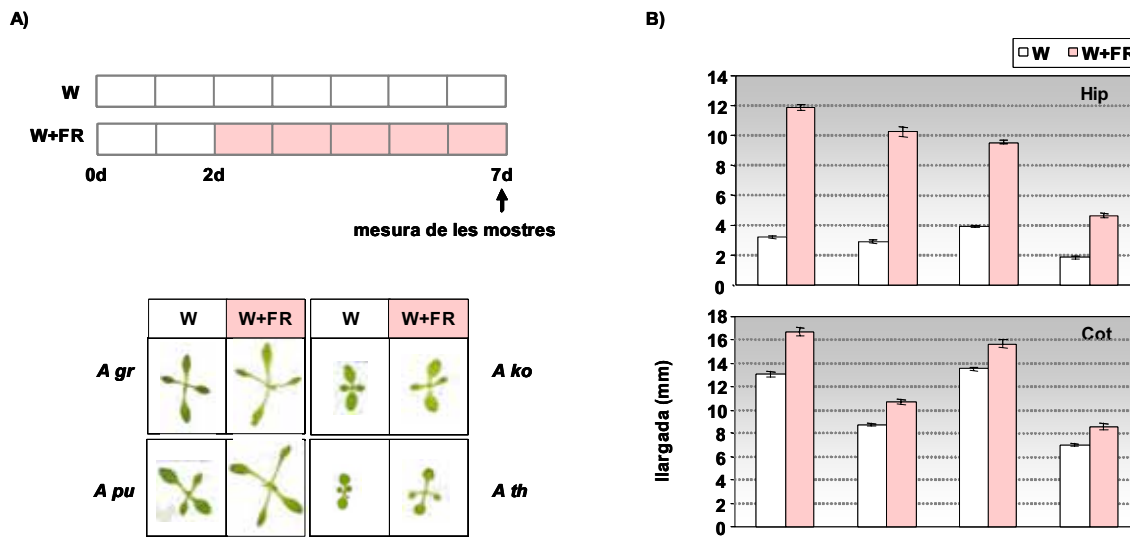


Figura R.17. Fenotip de plàntules de diferents espècies d'arabidopsis en resposta al tractament d'ombra simulada. A, disseny experimental utilitzat i aspecte de les plàntules *Arabidopsis griffithiana* (*A gr*), *Arabidopsis korshinskyi* (*A ko*) *Arabidopsis pumila* (*A pu*) i *Arabidopsis thaliana* (*A th*) sotmeses a aquest tractament. **B**, llargada de l'hipocòtil (Hip), cotilèdons (Cot) i fulles primàries (FP) de plàntules de les 4 espècies cultivades tal i com s'indica a l'apartat A.

A continuació vam analitzar mitjançant *northern-blot* l'expressió d'alguns dels *PARs* identificats en aquestes quatre espècies del gènere *Arabidopsis* (**figura R.18A**).

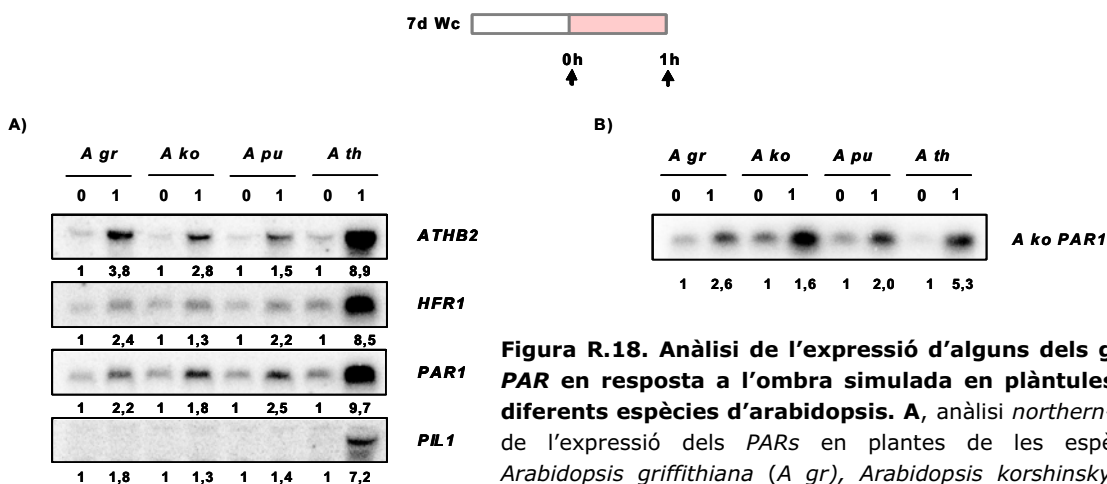


Figura R.18. Anàlisi de l'expressió d'alguns dels gens PAR en resposta a l'ombra simulada en plàntules de diferents espècies d'arabidopsis. A, anàlisi *northern-blot* de l'expressió dels *PARs* en plantes de les espècies *Arabidopsis griffithiana* (*A gr*), *Arabidopsis korshinskyi* (*A ko*), *Arabidopsis pumila* (*A pu*) i *Arabidopsis thaliana* (*A th*) amb sondes obtingudes a partir d'*A th*. **B**, Anàlisi *northern-blot* de l'expressió de *PAR1* utilitzant una sonda obtinguda d'*A ko*. En A i B les plantes van ser cultivades com s'indica a l'esquema superior.

Mentre que l'expressió de *PIL1* només es detectava en les mostres corresponents a *A. thaliana*, les sondes per la detecció d'*ATHB2*, *HFR1* i *PAR1* d'*A. thaliana* eren capaces de reconèixer els gens homòlegs a aquests en les espècies *A. griffithiana*, *A. korshinskyi* i *A.*

pumila. Per tal de veure si aquestes diferències en el grau d'inducció eren degudes a diferències en l'expressió gènica o si es devien a què la sonda generada en *A. thaliana* era més específica per a aquesta espècie, es va decidir detectar l'expressió de *PAR1* mitjançant una sonda obtinguda en una de les altres tres espècies. Es van clonar els gens *PAR1* per PCR utilitzant els mateixos encebadors que es van utilitzar per clonar *PAR1* en *A. thaliana*. Els clons obtinguts es van seqüenciar i es van comparar les seqüències de 2 clons individuals de cada espècie amb la seqüència de *PAR1* d'*A. thaliana* (**figura R.19**).

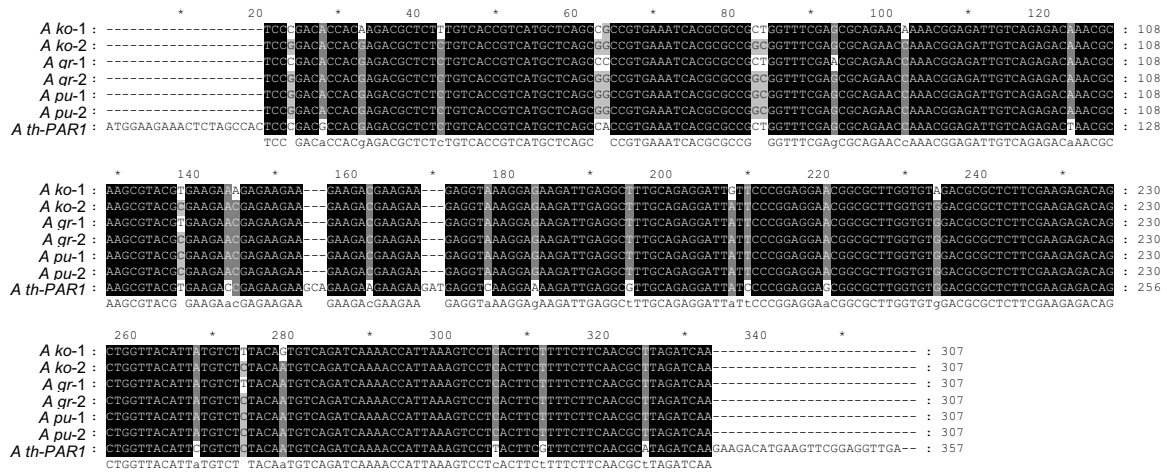


Figura R.19. Alineament de les seqüències de *PAR1* de 4 espècies diferents d'arabidopsis. Per a les espècies *Arabidopsis griffithiana* (*A gr*), *Arabidopsis korshinskyi* (*A ko*) i *Arabidopsis pumila* (*A pu*) s'empraren les seqüències de 2 clons independents, que a l'alineament s'indiquen com a 1 i 2. Per a *Arabidopsis thaliana* (*A th*) s'emprà la seqüència ja coneguda de *PAR1* (At2g42870).

Totes les seqüències eren molt similars (més del 79%), essent la seqüència 1 de *PAR1* d'*A. korshinskyi* la que presentava menor similitud amb la d'*A. thaliana*, i per aquest motiu va ser l'escollida per a utilitzar-la com a sonda i analitzar de nou l'expressió de *PAR1* (**figura R.18B**). L'anàlisi de l'expressió de *PAR1* utilitzant aquesta sonda va ser capaç de reconèixer els gens homòlegs a *PAR1* en les espècies *A. griffithiana*, *A. pumila* i *A. thaliana*, i va donar un senyal més fort en *A. korshinskyi*, tal i com esperàvem. No obstant, la inducció de l'expressió de *PAR1* per ombra continuava sent més alta en *A. thaliana*.

Aquest conjunt d'experiments ens porten a afirmar que en diferents espècies d'arabidopsis s'activen els mateixos *PARs* en resposta a la SAS. A més, *A. thaliana* sembla ser l'espècie que mostra una major inducció per ombra de l'expressió de *PAR1* i probablement d'altres *PARs*.

Capítol II. Estudi del paper de factors de la transducció de la llum en la regulació de l'expressió dels gens *PAR*

La transducció de la llum ha estat àmpliament estudiada genèticament durant el procés de la desetiolació, on s'han descrit els factors COP1, DET1 i HY5 com a integradors del senyal lumínic captat per diferents fotoreceptors (**figura I.13**). Ens vam plantejar l'estudi del paper d'aquests factors ja descrits per altres autors com a implicats en la transducció del senyal lumínic en la inducció de l'expressió dels *PARs* diana primaris dels fitocroms per l'ombra simulada.

1. Paper de COP1 sobre la regulació de l'expressió dels *PARs*

Per investigar si COP1 té un paper en la regulació dels gens *PAR* durant la SAS, hem utilitzat els al·lels mutants de pèrdua de funció no letals *cop1-4* i *cop1-6* (Deng i col., 1992). L'estudi del possible control de COP1 sobre les respostes fisiològiques de la SAS es va realitzar cultivant plàntules silvestres i mutants *cop1-4* i *cop1-6* 7d en Wc i posteriorment mantenint-les en W o transferint-les a W+FR durant 24h, després de les quals mesurà la llargada dels seus hipocòtils (**figura R.20A**).

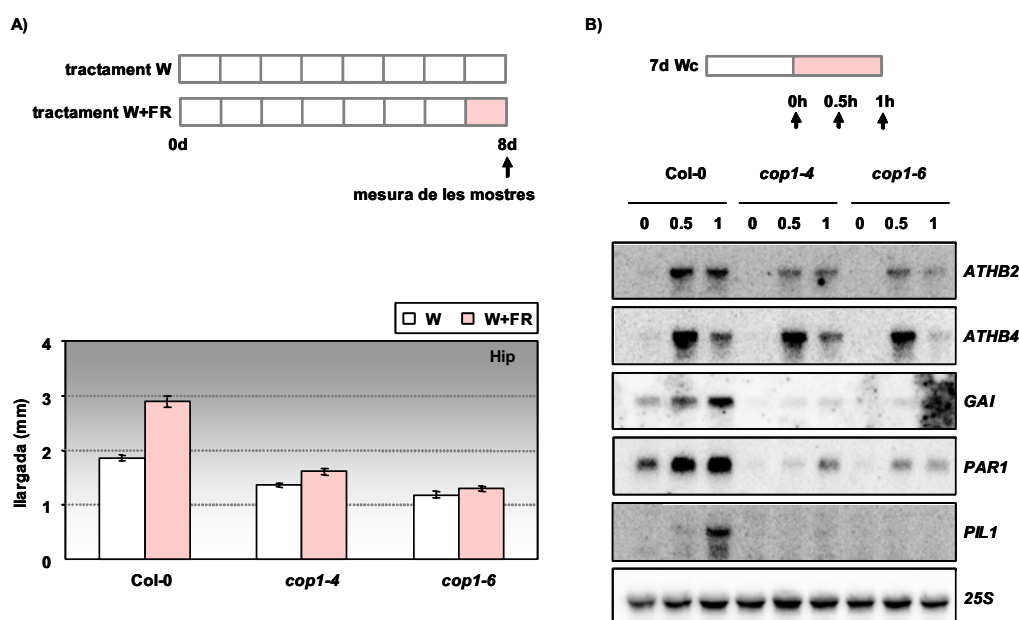


Figura R.20. Efecte de COP1 sobre les respostes fisiològiques i moleculars de la SAS. A, mesura de la llargada dels hipocòtils en plàntules silvestres (Col-0) i mutants *cop1-4* i *cop1-6* cultivades tal i com s'indica a l'esquema superior. **B,** anàlisi *northern-blot* de l'expressió dels *PARs* en plantes silvestres i mutants *cop1-4* i *cop1-6* cultivades tal com s'indica a l'esquema superior. Com a control de càrrega es mostra la hibridació amb la sonda constitutiva 25S.

Les plàntules silvestres mostren la resposta de la SAS d'allargament de l'hipocòtil ja descrita anteriorment. En les plàntules mutants *cop1-4* i *cop1-6*, que en W són més curtes que les silvestres, aquesta resposta de la SAS estava atenuada, sent la línia amb l'al·lel mutant *cop1-6* la que mostrava una inhibició més forta de la resposta. Aquests resultats suggereixen la participació de COP1 en la resposta fisiològica de la SAS. Per estudiar el possible control de COP1 sobre les respostes moleculars de la SAS, es va analitzar l'expressió dels *PARs* primaris per *northern-blot* en plàntules silvestres, *cop1-4* i *cop1-6* cultivades 7d en Wc just abans (0h), 0.5 i 1h després de l'ombra simulada (**figura R.20B**). S'observà que *GAI*, *PAR1* i *PIL1* tenen una fotomodul·lació reduïda en ambdós mutants *cop1* analitzats, comparada amb l'expressió en plàntules silvestres. El mateix s'observà per *ATHB2* i *ATHB4*, però l'efecte era més suau. Aquests resultats revelen que COP1 participaria en la regulació de l'expressió en resposta a l'ombra dels gens diana primaris dels fitocroms prèviament identificats.

Per avaluar si la regulació de l'expressió d'aquests gens pels fitocroms era també afectada per COP1 durant la desetioliació, es va analitzar l'expressió dels *PARs* per *northern-blot* en plàntules silvestres i *cop1-6* cultivades 4d en fosc (D, de l'anglès *dark*) i després desetiolades en llum FRC, just abans (0h) i 1h després del tractament amb FRC (**figura R.21**).

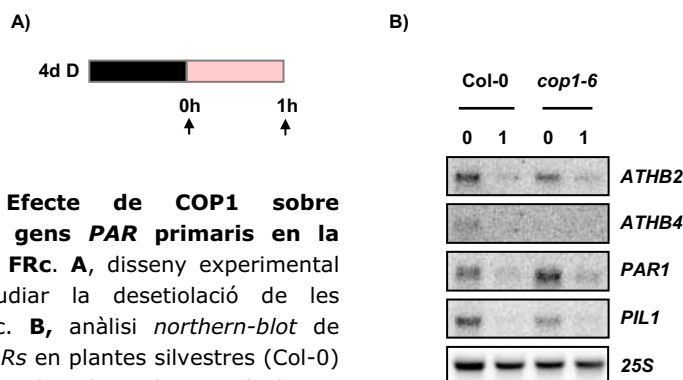


Figura R.21. Efecte de COP1 sobre l'expressió dels gens *PAR* primaris en la desetioliació per FRC. **A**, disseny experimental utilitzat per estudiar la desetioliació de les plàntules per FRC. **B**, anàlisi *northern-blot* de l'expressió dels *PARs* en plantes silvestres (Col-0) i mutants *cop1-6* cultivades tal com s'indica a l'apartat A. Com a control de càrrega es mostra la hibridació amb la sonda constitutiva 25S.

Tal i com estava descrit (Tepperman i col., 2001), els 4 gens estaven ràpidament reprimits després del tractament de llum en les plàntules silvestres. En les plàntules etiolades del mutant *cop1-6*, els nivells de mRNA de *PAR1* eren més alts que en les plàntules silvestres, mentre que diferències molt subtils es van detectar en els nivells d'expressió d'*ATHB2* i *PIL1*. Els nivells de transcrit d'*ATHB4* en el mutant eren difícilment detectables. Després del tractament de llum, l'expressió d'*ATHB2*, *PAR1* i *PIL1* estava clarament reprimida pels fitocroms en les plàntules del mutant *cop1-6*, tal i com s'observava en les plantes silvestres. Aquests resultats indiquen que, a diferència del que

s'observa per a la SAS, COP1 no juga un paper principal en la repressió primerenca de com a mínim 3 dels gens *PAR* analitzats durant la desetiolació per llum FRc.

2. Paper de HY5 sobre la regulació de l'expressió dels *PARs*

COP1 interacciona directament amb HY5, un altre regulador fotomorfolgènic integrador del senyal de la llum en la desetiolació de la plàntula (Oyama i col., 1997; Ang i col., 1998), de manera que també es va estudiar el paper d'aquest factor en la regulació de les respostes de la SAS. Per estudiar les respostes fisiològiques, plàntules silvestres i mutants *hy5-1* es van sotmetre a un tractament d'ombra simulada idèntic al descrit per als mutants *cop*. A la **figura R.22A** es mostra com el mutant *hy5-1*, que ja en W presenta un hipocòtil força més llarg que les plantes silvestres, mostra una resposta significativa en l'allargament de l'hipocòtil al ser transferit a W+FR, la qual cosa suggereix que HY5 no és requerit per a l'allargament de l'hipocòtil en resposta a l'ombra simulada.

Degut a que HY5 és un factor de transcripció, vam investigar si participaria en el control de l'expressió dels gens *PAR* durant la SAS. Es va analitzar l'expressió dels *PARs* per *northern-blot* en plàntules silvestres i mutants *hy5-1* cultivades 7d en Wc just abans (0h), 0.5 i 1h després de l'ombra simulada (**figura R.22B**).

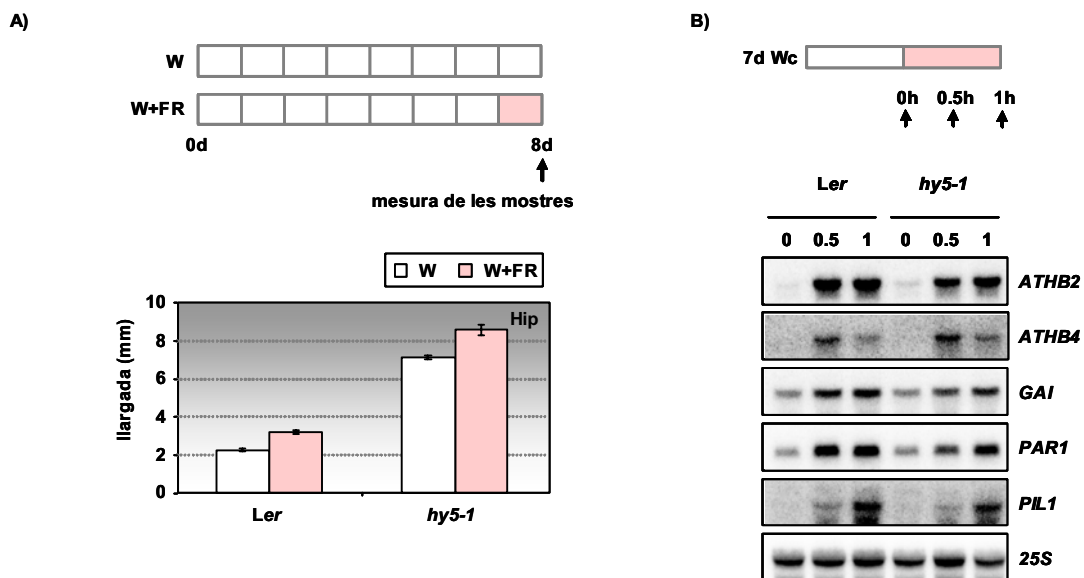


Figura R.22. Efecte de HY5 sobre les respostes fisiològiques i moleculars de la SAS. **A**, mesura de la llargada dels hipocòtils en plàntules silvestres (*Ler*) i mutants *hy5-1* cultivades tal i com s'indica a l'esquema superior. **B**, anàlisi *northern-blot* de l'expressió dels *PARs* en plantes silvestres i *hy5-1* cultivades tal com s'indica a l'esquema superior. Com a control de càrrega es mostra la hibridació amb la sonda constitutiva 25S.

La mutació *hy5-1* no afecta significativament l'expressió dels *PARs* després de l'ombra simulada. Aquest resultat suggereix que, a diferència de *COP1*, *HY5* no és requerit per transduir el senyal iniciat per l'ombra cap a respostes moleculars primerenques.

3. Paper de *DET1* i *DET2* sobre la regulació de l'expressió dels *PARs*

Els mutants *cop1* presenten un fenotip fotomorfogènic constitutiu, és a dir, les plantes estan sempre desetiolades, fins i tot en la foscor, presentant inhibició de l'allargament de l'hipocòtil, expansió dels cotilèdons, i una major acumulació d'antocianines. Per avaluar si aquest fenotip tan pleiotròpic, que els mutants *hy5* no presenten, és el responsable dels efectes observats sobre l'expressió dels *PARs* després de l'ombra simulada en els mutants *cop1*, es va analitzar les respostes de la SAS en altres dos mutants que presenten el mateix fenotip fotomorfològic constitutiu que *cop1*: *det1-1* (Pepper i col., 1994), i *det2-1* (Li i col., 1996). Malgrat presentar el mateix fenotip fotomorfogènic constitutiu, les lesions moleculars d'aquests mutants afecten a processos bioquímics diferents. S'ha suggerit que la proteïna nuclear *DET1* participa amb *COP1* en la degradació de possibles reguladors de la fotomorfogènesi via el sistema del proteasoma (Yanagawa i col., 2004), mentre que *DET2* és un enzim involucrat en la biosíntesi de BRs (Li i col., 1996). Per estudiar el possible paper de *DET1* sobre les respostes fisiològiques de la SAS, plàntules silvestres i mutants *det1-1* es van sotmetre a un tractament d'ombra simulada idèntic al descrit per als mutants *cop* i *hy5*. De la mateixa manera que passava en els mutants *cop1-4* i *cop1-6*, en les plàntules mutants *det1-1*, més curtes que les silvestres en *W*, aquesta resposta de la SAS estava atenuada. Aquest resultat suggereix la participació de *DET1* en la resposta fisiològica de la SAS. El paper de la biosíntesi de BRs sobre les respostes de la SAS ja ha estat analitzat per altres autors, que mostraven que el mutant deficient en BRs *eve1/dwf1* mostrava la resposta de l'hipocòtil a l'ombra vegetal anul·lada (Luccioni i col., 2002).

Es va analitzar l'expressió dels *PARs* després d'un tractament d'ombra simulada realitzant el mateix tipus d'anàlisi que el que hem descrit per als mutants *cop1* i *hy5* utilitzant plàntules dels mutants *det1-1* i *det2-1* (**figura R.23**). La reducció de la fotomodulació de l'expressió de *GAI*, *PAR1* i *PIL1* i en menor grau d'*ATHB2* i *ATHB4* que observàvem en les plàntules mutants *cop1* comparades amb les silvestres, també s'observà en les plàntules *det1-1*. Per contra, les plàntules *det2-1* presentaven una fotomodulació de l'expressió dels gens *PAR* igual que la de les silvestres (*GAI*, *PAR1* i *PIL1*) o lleugerament induïda (*ATHB2* i *ATHB4*), confirmant que la repressió de l'expressió dels *PARs* per l'ombra simulada en els mutants *cop1* i *det1* no és un efecte secundari del seu fenotip fotomorfogènic constitutiu, sinó un efecte directe de les lesions moleculars d'aquests mutants.

El conjunt de resultats presentats en aquest capítol mostra que no tots els factors identificats genèticament als que se'ls ha atribuït un paper en la desetiolació de les

plàntules participen en la regulació de les respostes moleculars i primerenques de la SAS. A més, aquells que sí que hi participen, com COP1, semblen afectar diferents grups de gens diana directes del fitocroms en diferents respostes fotomorfogèniques (SAS vs desetioliació, figures **R.20** i **R.21**).

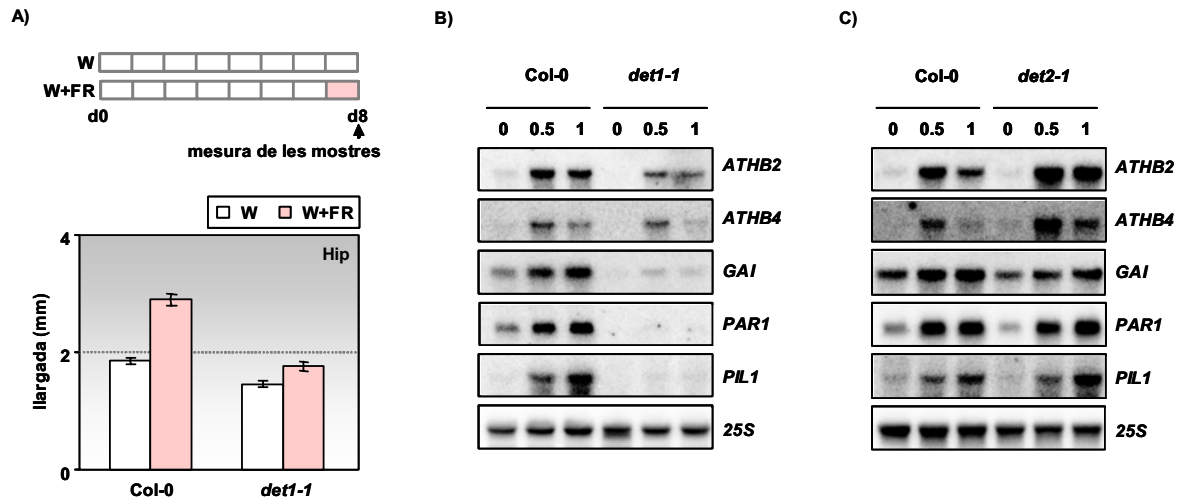


Figura R.23. Efecte de DET1 i DET2 sobre les respostes fisiològiques i moleculars de la SAS.

A, mesura de la llargada dels hipocòtils en plàntules silvestres (Col-0) i mutants *det1-1* cultivades tal i com s'indica a l'esquema superior. **B**, anàlisi *northern-blot* de l'expressió dels PARs en plantes silvestres i mutants *det1-1*. **C**, anàlisi *northern-blot* de l'expressió dels PARs en plantes silvestres (Col-0) i mutants *det2-1*. En B i C les plantes es van cultivar tal i com s'indica a la figura R.22B.

Capítol III. Cerca de nous factors de la transducció de la llum en resposta a l'ombra

Com a complement de l'estratègia descrita en el capítol I hem desenvolupat una estratègia genètica per tal d'identificar altres factors implicats en la transducció de la llum durant la SAS. Aquesta ha consistit en realitzar una mutagènesi amb EMS i el posterior cribratge de mutants amb la resposta alterada a l'ombra simulada.

1. Plantejament de l'estratègia genètica

Degut a que resulta difícil establir un cribratge per a la identificació de mutants amb la resposta a la raó R:FR alterada analitzant quantitativament determinats paràmetres fisiològics (com l'allargament de l'hipocòtil, cotilèdons...), es va desenvolupar un assaig basat en la bioluminiscència que és senzill i eficient i es realitza a temps real i de manera no destructiva per a la planta.

Anàlisis de micromatrius de RNA mostraven que l'expressió del gen *PHYB* s'indueix ràpidament per ombra simulada (Devlin i col., 2003). Nosaltres hem analitzat l'expressió de *PHYB* i hem vist que aquesta es troba ràpidament induïda després de 1h de tractament amb ombra simulada, la qual cosa indica que *PHYB* també és un gen *PAR* (**figura R.24A**). Aquesta inducció depèn de la qualitat de la llum, ja que és més alta a baixes raons R:FR (**figura R.24B**). Experiments d'aplicació de CHX com el mostrat en l'apartat 4 del capítol I indicaren que la inducció de l'expressió de *PHYB* per l'ombra simulada és independent de la inhibició de la síntesi *de novo* de proteïnes, el que permet afirmar que *PHYB* és un *PAR* diana primari dels fitocroms (**figura R.24C**).

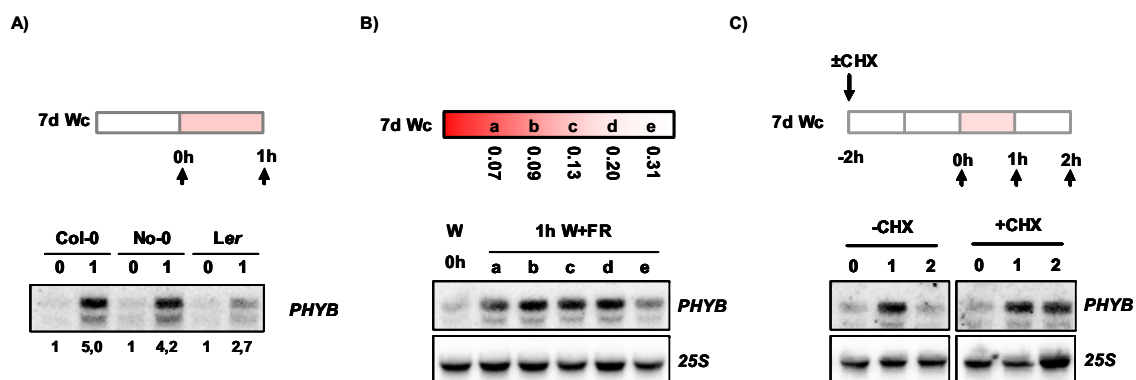


Figura R.24. Anàlisi de l'expressió de *PHYB* en resposta a l'ombra simulada. **A**, anàlisi *northern-blot* de l'expressió de *phyB* seleccionats en plàntules de 3 ecotips diferents d'arabidopsis. **B**, anàlisi *northern-blot* de l'expressió del *phyB* en plàntules silvestres No-0 en resposta a diferents raons R:FR. **C**, anàlisi *northern-blot* de l'efecte de la CHX sobre la inducció per ombra simulada de l'expressió de *PHYB* en plantes silvestres (Col-0). En A, sota el *northern* es mostren els valors d'expressió normalitzats respecte a la hibridació amb la sonda constitutiva 25S i relatius als valors d'expressió a 0h. En B i C, la hibridació amb la sonda constitutiva 25S es mostra com a control de càrrega. En A, B i C, les plantes es van cultivar tal i com s'indica en els respectius esquemes superiors.

La nostra estratègia s'ha basat en la utilització d'una línia transgènica ja existent (cedida pel grup del Dr. Millar i descrita a Bogner i col., 1999) que conté 2292 pb del promotor del gen *PHYB* fusionat al gen reporter *LUCIFERASA* ($P_{PHYB}:LUC$) en el fons genètic *Ws*, línia que d'ara en endavant anomenarem PBL. Experiments descrits per Hall i col. (2002) indiquen que l'expressió fotoregulada de *PHYB* ocorre en part pel seu control transcripcional. Basant-nos en la informació relativa al control de l'expressió de *PHYB*, quan les condicions de llum mantinguin la SAS apagada (alta raó R:FR) el transgen no s'estarà expressant i la bioluminescència d'aquestes plantes serà mínima. Per contra, quan les condicions de llum mantinguin la SAS encesa (baixa raó R:FR), el transgen s'expressarà i per tant la luminiscència d'aquestes plàntules augmentarà. Així doncs, el transgen convertirà el senyal de l'ombra simulada en diferències lumíniques, fàcilment quantificables (**figura R.25A**).

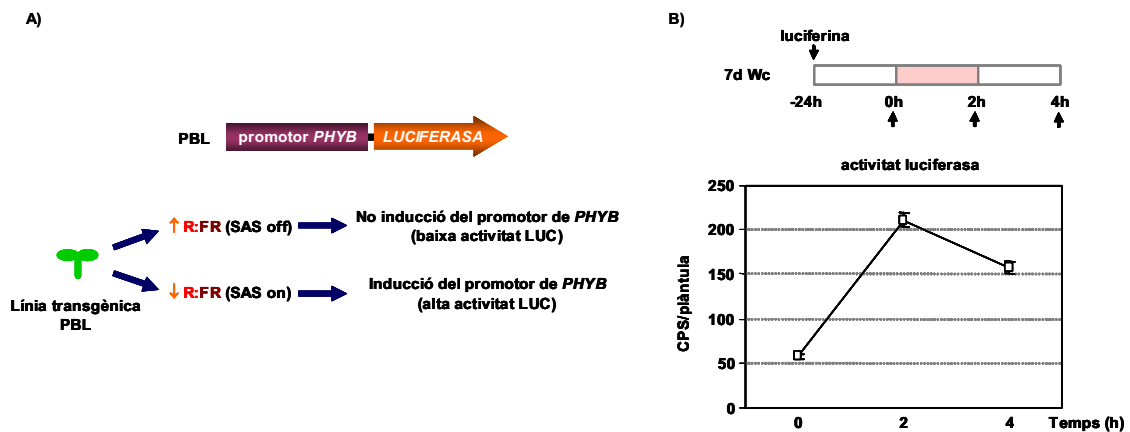


Figura R.25. Descripció de la hipòtesi de funcionament de la línia PBL i el seu comportament en resposta a ombra simulada. **A**, esquema de la línia utilitzada per a realitzar la mutagènesi i cribratge de mutants, i comportament esperat de la línia davant diferents raons R:FR. **B**, anàlisi de l'activitat luciferasa *in vivo* de plàntules de la línia PBL. A la part superior, tractament d'ombra simulada utilitzat en el cribratge de mutants basat en la mesura de l'activitat luciferasa. La luciferina, substrat de la luciferasa, s'aplicà 24h abans de la primera mesura de l'activitat. **B**, a la part inferior, evolució de l'activitat luciferasa de plantes PBL sense mutagenitzar. El valor en cada punt correspon a la mitjana de la mesura lumínica de 100 plàntules individuals expressat en comptes per segon (CPS) per plàntula. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana.

Vam estudiar si el comportament de la línia PBL s'ajustava a la nostra hipòtesi cultivant les plantes 7d en Wc i després transferint-les 2h a W+FR. A continuació, les plantes es retornaven a W. S'analitzà l'activitat luciferasa de les plantes *in vivo* just abans (0h), 2h després del tractament d'ombra simulada (2h), i 2h després de transferir-les de nou a W (4h). 24h abans de l'anàlisi de la luminiscència, es pulveritzava el substrat de l'enzim luciferasa a les plàntules en quantitats saturants. A la **figura R.25B** es mostra l'activitat luciferasa mitjana de 100 plàntules PBL individuals, on es veu com hi ha un augment de l'activitat luciferasa després de 2h d'ombra simulada respecte a l'activitat a 0h, i com aquests nivells disminueixen al transferir de nou les plàntules a W, tot i que mai arriben a disminuir fins als nivells inicials. Per tant, l'activitat luciferasa *in vivo* de la línia

PBL s'ajusta a les nostres prediccions, el que fa que aquesta línia pugui ser utilitzada per a la mutagènesi i cribratge de mutants amb la resposta de la SAS alterada.

2. Mutagènesi, cribratge i confirmació de mutants

A la **figura R.26** es mostra un esquema resum de la mutagènesi, cribratge i posterior caracterització i mapatge de mutants que s'estan duent a terme.

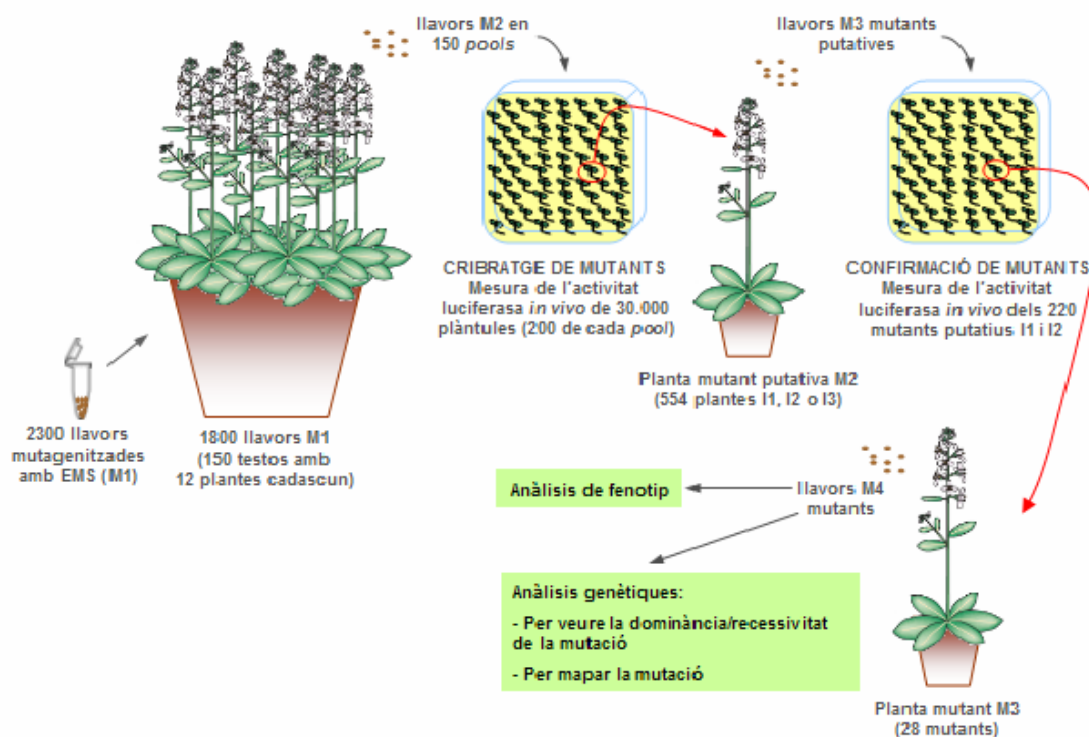


Figura R.26. Esquema de la mutagènesi, cribratge i anàlisi de mutants amb la resposta a l'ombra simulada alterada.

Vam mutagenitzar llavors de la línia PBL (a les que es considerarà la generació M1) amb dues concentracions de l'agent mutagen químic EMS (etil metà sulfonat): 0.2% (2500 llavors) i 0.3% (2300 llavors) (apartat 2.4.11 del material i mètodes), i les vam sembrar en testos per cultivar-les a l'hivernacle. Es van sembrar 1800 llavors de cada mutagènesi, posant 12 llavors per test, la qual cosa va resultar en 150 testos per mutagènesi (**figures R.26 i R.27A**). Quan les plantes es trobaven en estadi de roseta, es va analitzar el número de sectors deficientes en clorofil·la que presentaven les fulles d'aquestes plantes, ja que diferents autors en la bibliografia han descrit que el percentatge d'aquests sectors en les plantes M1 és reflex de l'eficiència de la mutagènesi, essent un 5-10% la xifra òptima (Bretagne-Sagnard i col., 1996) (**figura R.27B**).

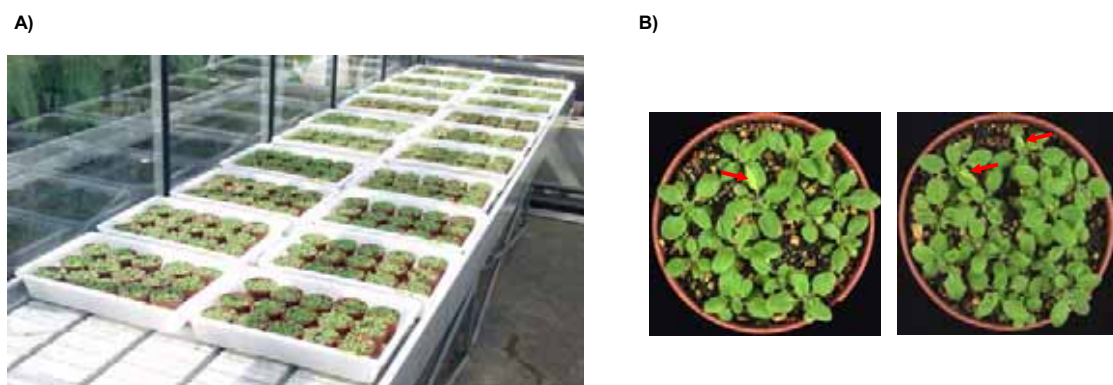


Figura R.27. Aspecte de les plantes mutagenitzades M1 en cultiu a l'hivernacle. A, cultiu de les plantes M1 a l'hivernacle per a l'obtenció de la generació M2 que serà utilitzada en el cribratge. **B,** Aspecte de dos testos amb plantes que presentaven sectors cloròtics (assenyalats amb fletxes vermelles).

Així, el recompte de sectors deficientes en clorofil·la ens va fer decidir continuar l'estratègia amb les llavors de la línia mutagenitzada amb el 0.3% EMS, ja que al voltant d'un 12% d'aquestes plantes presentaven sectors cloròtics (<5% per la població mutagenitzada amb 0.2% EMS). Les llavors M2 es van recollir ajuntant totes les llavors produïdes per les plantes cultivades en un mateix test, de manera que vam obtenir 150 *pools* M2 procedents de 12 plantes M1 cadascun. En el cribratge, per al qual em vaig desplaçar al laboratori del Dr. Paul Devlin al King's College de Londres, es van analitzar 200 individus de cada *pool*, el que fa un total de 30.000 individus M2, comparant la luminiscència individual de cada plàntula amb la mitjana de 100 individus cultivats en les mateixes condicions i analitzats alhora. Es van seleccionar aquelles plàntules que presentaven baixa activitat luciferasa amb un 95% de significança (possibles mutants amb baixa activitat luciferasa), i aquelles que presentaven alta activitat luciferasa amb un 99.9% de significança (possibles mutants amb alta activitat luciferasa) respecte a la mitjana. En total, de les 30.000 plàntules M2 analitzades, 554 es van considerar com a possibles mutants. Aquests es van anomenar depenent del moment en el que s'observava la primera alteració en l'activitat luciferasa : I1 (activitat alterada a les 0h), I2 (activitat alterada a les 2h) o I3 (activitat alterada a les 4h) (**figura R.28**). Alguns dels possibles mutants presentaven per tant alteracions en l'activitat luciferasa en més d'un moment, de manera que els anomenats I1 (alteració a les 0h) també podien presentar alteracions en l'activitat luciferasa a les 2h i/o 4h, i els anomenats I2 (alteració a les 2h) també podien presentar alteracions en l'activitat luciferasa a les 4h (**figura R.28B**). La nomenclatura dels possibles mutants no diferenciava entre aquells que presentaven l'activitat luciferasa incrementada o reduïda. Els 554 possibles mutants es van passar a terra per cultivar-los en Wc i obtenir-ne la següent generació (M3). D'aquests, només 454 van sobreviure, i un 40% d'ells presentaven algun tipus de fenotip morfològic relacionat amb llum en l'estadi de plàntula, planta adulta o en ambdós estadis de desenvolupament. En la generació M3, de 220 possibles mutants I1 i I2, 28 van ser confirmats com a mutants per al seu fenotip molecular, mitjançant un cribratge similar al dut a terme en la generació M2 realitzat pel grup del Dr. Devlin.

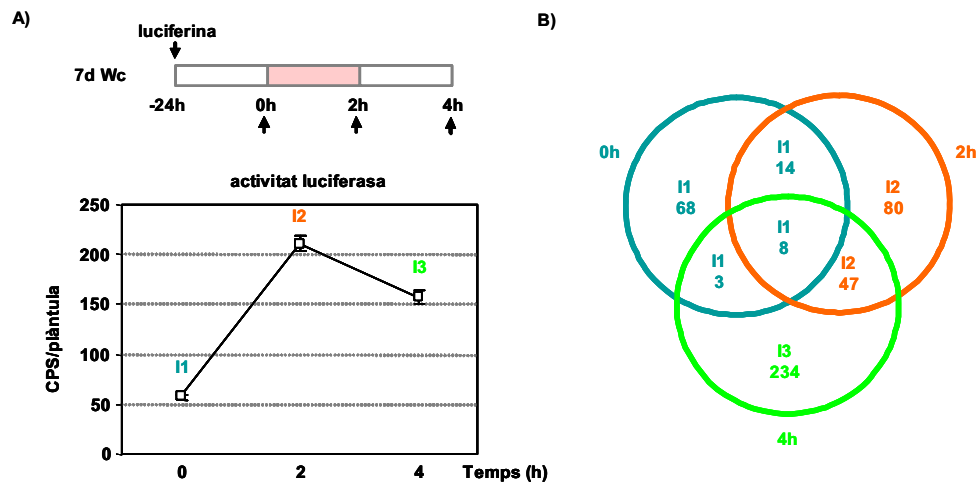


Figura R.28. Nomenclatura i nombre de possibles mutants identificats en el cribratge. **A**, nom adjudicat als mutants depenent del temps en el que tenen alterada l'activitat luciferasa, mostrat sobre el gràfic de l'evolució de l'activitat luciferasa de plantes PBL en resposta a l'ombra simulada. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana. **B**, esquema dels mutants putatius obtinguts per a cada temps mesurat, així com els mutants putatius en més d'un d'aquests punts.

3. Caracterització fisiològica de les línies mutants

3.1 Caracterització dels mutants en llum blanca

Els mutants confirmats es van cultivar a l'hivernacle. A la **figura R.29** se'n mostren alguns, creixent junt amb la línia parental PBL.

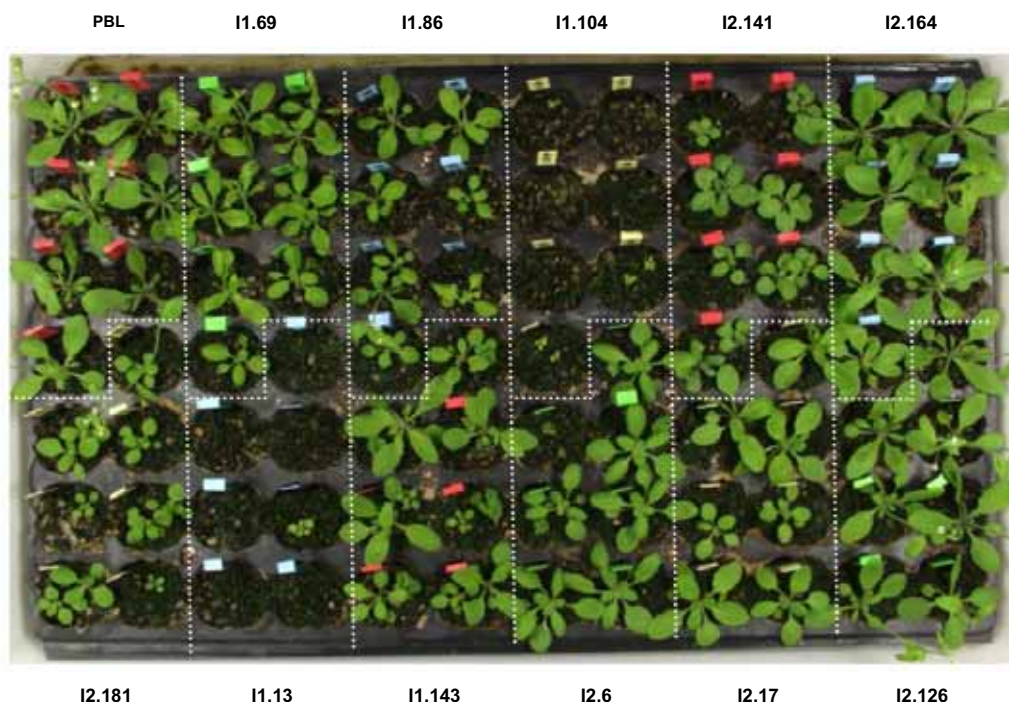
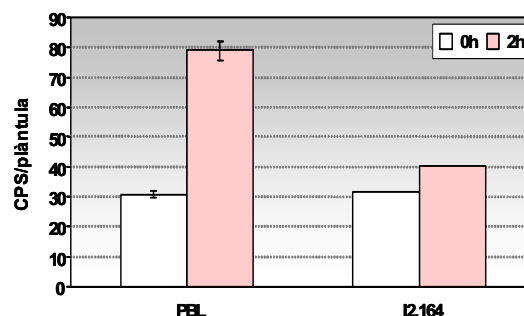


Figura R.29. Aspecte de la línia PBL i diferents línies mutants M3 al cultivar-les a l'hivernacle. La línia puntejada delimita les plantes de cada mutant.

S'observà que alguns d'ells tenien diferents fenotips morfològics/fisiològics, relacionats amb llum, com són en l'estadi de plàntula allargament de l'hipocòtil, fulles epi o hiponàstiques, coloració pàl·lida etc., i en estadi de planta adulta nanisme i alteracions en el temps de floració. A partir d'ara em centraré en la caracterització i mapatge del mutant I2.164, que va ser identificat com a mutant amb baixa activitat luciferasa després de 2h de tractament d'ombra simulada (**figura R.30**), que no presentava cap fenotip obvi en estadi de plàntula i que al cultivar-se a l'hivernacle presentava un aspecte sa en estadi de planta adulta (**figura R.29**).

Figura R.30. Activitat luciferasa del mutant I2.164. Representació dels valors d'activitat luciferasa als temps 0 i 2h del cribratge expressats en CPS/plàntula de la línia PBL (mitjana de les 100 plàntules mesurades simultàniament al mutant I2.164 que prendrem com a comportament de la línia PBL) i del mutant individual I2.164. Les barres d'error en representen l'error estàndard de la mitjana.



3.2 Caracterització del mutant I2.164 en resposta a l'ombra simulada

Es va analitzar la resposta fisiològica a l'ombra simulada de plàntules del mutant I2.164 mesurant l'allargament de l'hipocòtil als 7d de desenvolupament, i comparant-les amb la resposta de la línia PBL (**figura R.31**).

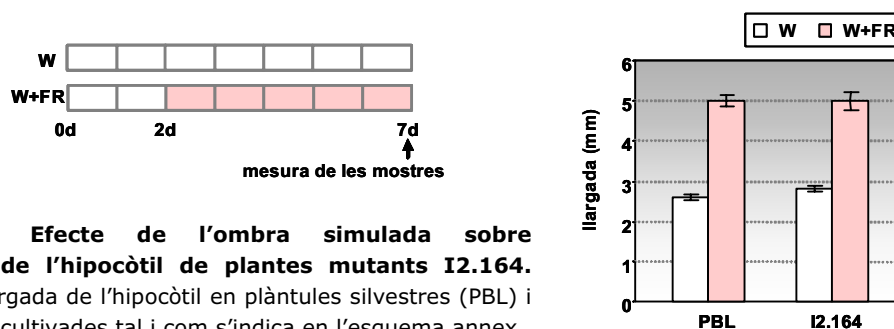


Figura R.31. Efecte de l'ombra simulada sobre l'allargament de l'hipocòtil de plantes mutants I2.164. Mesura de la llargada de l'hipocòtil en plàntules silvestres (PBL) i mutants I2.164 cultivades tal i com s'indica en l'esquema annex.

Com s'observa a la figura, en Wc les plàntules I2.164 són lleugerament més llargues que les plàntules PBL. En W+FR els hipocòtils de les plàntules I2.164 són igual de llargs que els de les plàntules PBL, la qual cosa indica que les plàntules mutants responen lleugerament menys a l'ombra simulada.

3.3. Caracterització del mutant I2.164 en la desetioliació

Es va analitzar el comportament d'aquest mutant durant el procés de desetioliació sota llum Rc o FRc, realitzant corbes de fluència per a la llargada dels hipocòtils. Els experiments d'anàlisi del fenotip durant la desetioliació sota Rc i FRc, per als quals em vaig desplaçar al laboratori del Professor Peter Quail a Berkeley, California, es van dur a terme

tal i com es descriu a l'apartat 2.4.5.2 del material i mètodes. Essencialment, unes 30 llavors de les línies a analitzar es sembraven una a una sobre medi en placa realitzant 6 rèpliques en 6 plaques diferents. Després de l'estratificació, s'induïa la germinació de les llavors amb un pols de W de 3h. Les plaques es mantenien en D durant les 21h següents. Passat aquest temps, exactament 1d després de l'estratificació, una de les plaques es mantenien en D mentre les altres 5 rèpliques es transferien a 5 intensitats diferents de R o FR. 3d després, als 4d de la germinació, es retiraven les plaques dels respectius tractaments, les plàntules es col·locaven planes sobre el medi i es mesurava la llargada dels hipocòtils utilitzant un *software* apropiat sobre imatges digitals de les plaques. La mitjana de la llargada dels hipocòtils en cada tractament (bé les mesures crues, o bé en percentatges la llargada dels hipocòtils en fosc, situació en que l'allargament és màxim) s'expressa en relació a les fluències de llum (escala logarítmica). A la **figura R.32** es mostra un esquema d'aquests tractaments i les anàlisis realitzades per al mutant I2.164.

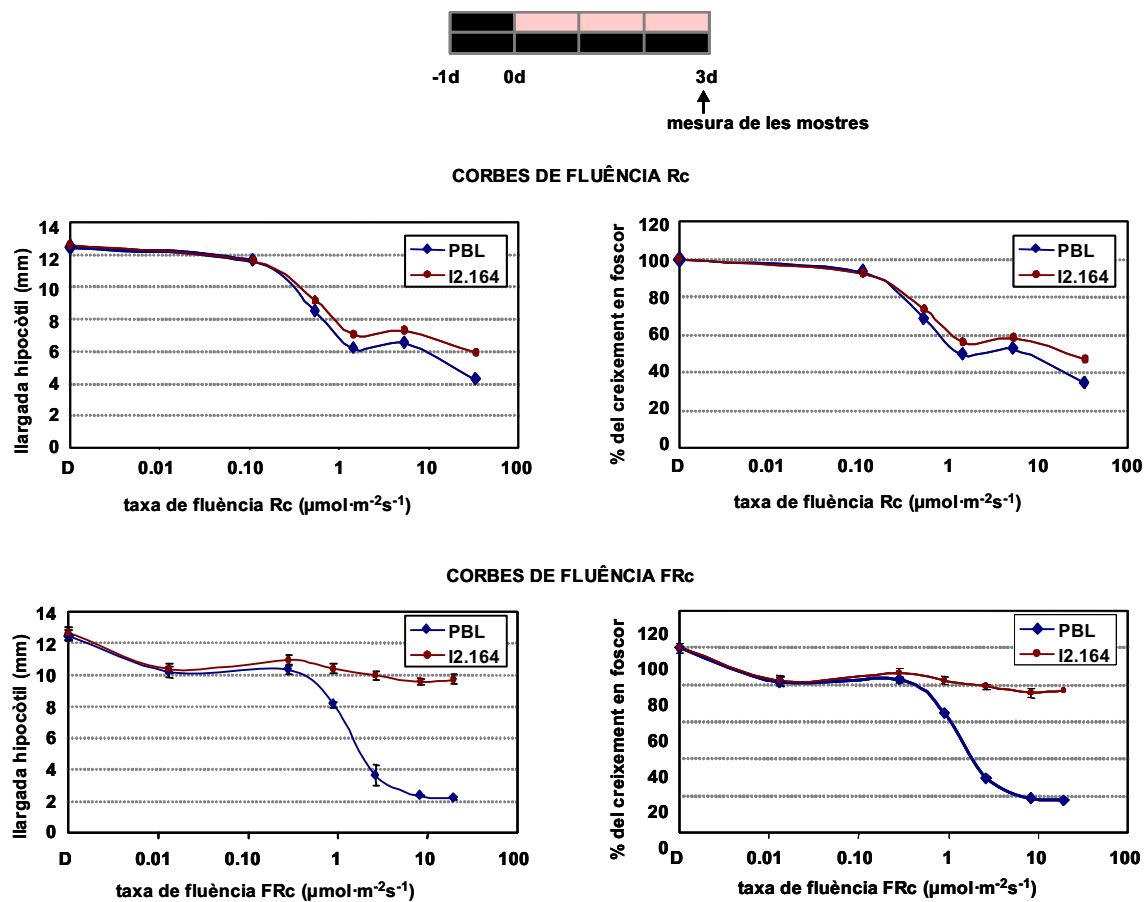


Figura R.32. Corbes de fluència en Rc i FRc del mutant I2.164 identificat en el cribratge. A l'esquerra de la imatge, els gràfics representen la llargada dels hipocòtils en relació a la taxa de fluència. A la dreta de la imatge, els gràfics representen les mateixes dades anteriors però posant l'allargament dels hipocòtils a les diferents taxes de fluència en relació a l'allargament d'aquests a la fosc. Les plàntules s'han cultivat tal i com s'indica a l'esquema superior.

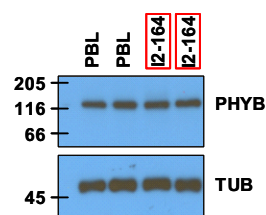
S'observa com el mutant I2.164 presenta hipocòtils més llargs que les plantes silvestres en fluències mitjanes i altes de Rc, suggerint una certa hiposensibilitat a llum Rc. A més, els hipocòtils d'aquests mutants es mostren molt allargats, pràcticament

idèntics als hipocòtils de les plàntules mantingudes en D en les diferents fluències FRc, la qual cosa suggereix ceguesa d'aquest mutant a llum FRc.

4. Anàlisi dels nivells de proteïna PHYB del mutant I2.164

Per descartar aquells mutants en els que l'activitat luciferasa sigui alterada per mutacions que afectin els nivells de phyB en la planta, que podrien estar regulant diferencialment el seu propi promotor i el promotor fusionat a la luciferasa del transgen (Hall i col., 2002), es va analitzar els nivells de proteïna PHYB mitjançant *western-blot*. Es va realitzar una extracció desnaturalitzant de proteïnes totals dels diferents mutants i la proteïna PHYB es va immunodetectar utilitzant anticossos monoclonals específics contra aquest fitocrom. També es va detectar la proteïna tubulina com a control de càrrega utilitzant un anticòs monoclonal de ratolí. A la **figura R.33** es mostra el *western-blot* per a dues rèpliques de la línia PBL i del mutant I2.164. Com es veu, el mutant no presenta canvis significatius en els nivells de PHYB respecte a la línia silvestre, el que indica que les lesions moleculars que causen alteracions en l'activitat luciferasa d'aquest mutant no recauen en el PHYB, sinó en algun altre factor.

Figura R.33. Anàlisi dels nivells de proteïna PHYB per *western-blot*. A la part superior, proteïna PHYB detectada utilitzant dos anticossos monoclonals anti-PHYB. A la part inferior es mostra la detecció de la proteïna tubulina (TUB) com a control de càrrega.



5. Mapatge de baixa resolució del mutant I2.164

Per dur a terme el mapatge de baixa resolució de la mutació en la línia I2.164 es realitzaren dos creuaments: I2.164 amb la línia silvestre PBL i I2.164 amb la línia silvestre Col-0 (**figura R.34A**). El primer serveix per netejar la planta d'altres mutacions que puguin haver-hi i que no guardin cap relació amb el fenotip d'interès (és a dir, per arribar a tenir una mutació per línia). A més, les anàlisis de segregació del fenotip en la generació F2 del creuament I2.164 x PBL ens informaren de si es tractava d'una mutació monogènica dominant o recessiva. Per altra banda, el creuament I2.164 M4 amb la línia Col-0 permet procedir al mapatge de baixa resolució de la mutació. El fenotip mutant (hipocòtil llarg en FRc) segregava en una proporció 1:3 (mutant:silvestre) en les plantes F2 del creuament I2.164 x PBL, el que indicava que es tractava d'una mutació monogènica recessiva. Aquest fenotip cosegregava amb el fenotip molecular que es va utilitzar per l'aïllament del mutant (baixa activitat luciferasa després de 2h de tractament amb W+FR), el que indicava que la mutació era responsable d'ambdós fenotips analitzats (dades generades pel grup del Dr. Devlin).

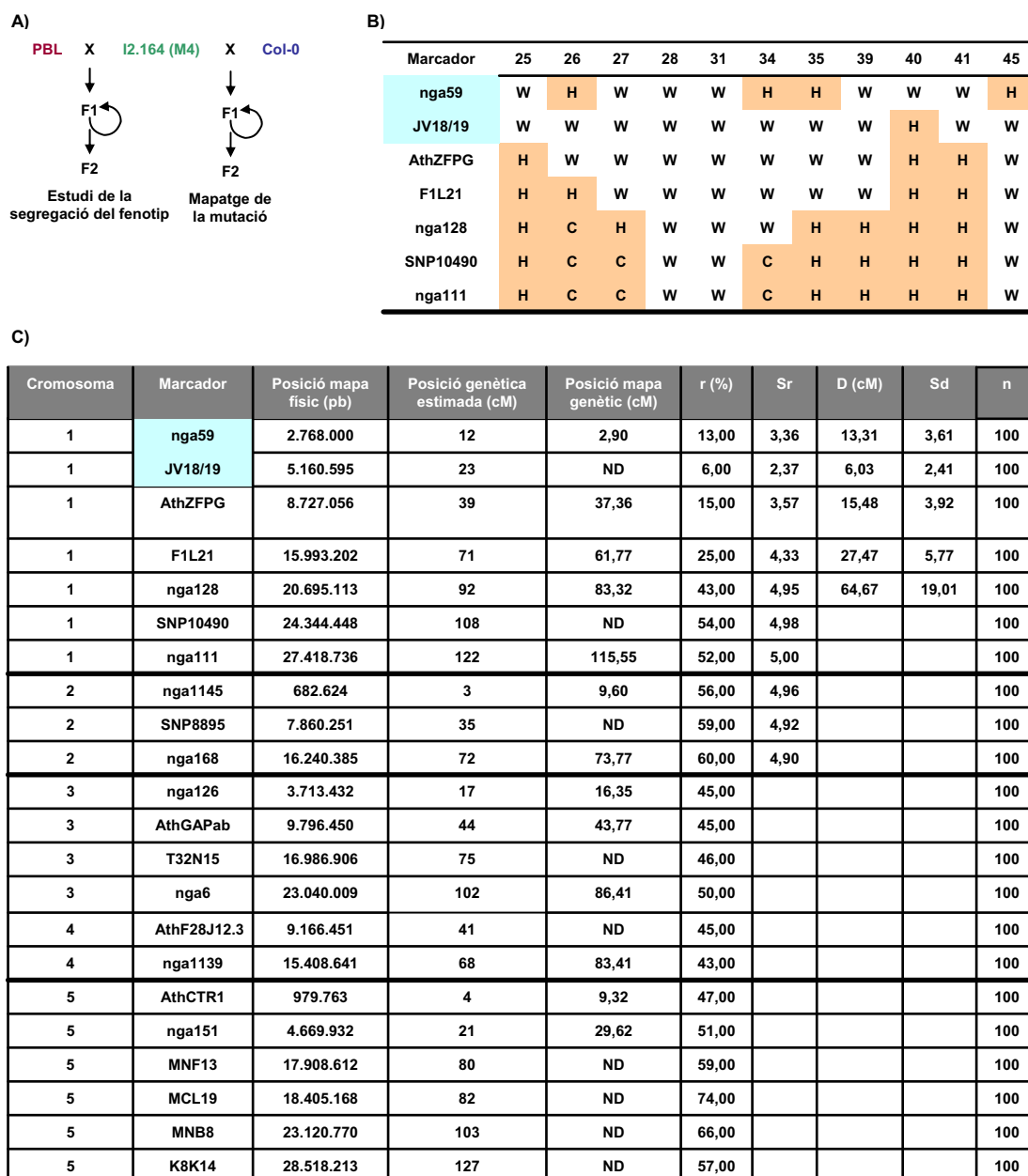


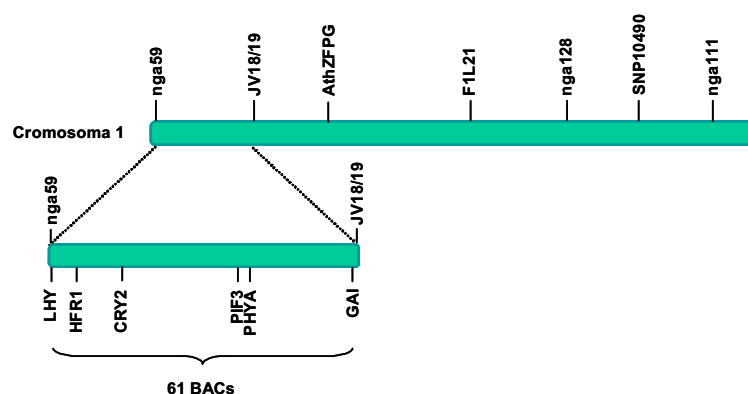
Figura R.34. Mapatge de baixa resolució del mutant I2.164. **A**, creuaments realitzats per a l'estudi de l'herència i el mapatge de la mutació d'I2.164. **B**, mostra del genotipat de 11 individus F2, seleccionats per presentar el fenotip mutant (anomenats amb un número, part superior). A la dreta s'indica els marcadors testats. En taronja es mostren els recombinants informatius trobats. W, individu homocigot per al fons genètic parental portador de la mutació; C, individu homocigot per al fons genètic parental no portador de la mutació; H, individu heterocigot. **C**, resultat del mapatge. A la taula s'indiquen els marcadors testats, i el cromosoma en el que es troben. En blau s'indiquen els dos marcadors relacionats amb la mutació present als individus I2.164. Les tres columnes que mostren paràmetres relatius a posicions són paràmetres fixes dels marcadors. r (%), percentatge de recombinació i Sr, el seu error estàndard; D, distància de mapa en cM i Sd, el seu error estàndard; utilitzant la funció de Kosambi (Servei de Cartografia).

Un cop obtinguda aquesta informació es recollien fulles (uns 100 mg) de 50 plantes F2 procedents del creuament I2.164 X Col-0 que manifestaven inequívocament el

fenotip mutant. Aquest material, juntament amb el d'una planta de cada estirp parental utilitzada i el d'una planta de la F1 es van enviar al el Servei de Cartografia Gènica de la Universitat Miguel Hernández d'Alacant, dirigit per la doctora María Rosa Ponce, que realitzà la cartografia de la mutació. El servei primer comprova el genotip dels dos individus parentals i el de la F1 utilitzant fins a 34 microsatèl·lits polimòrfics. Si aquestes anàlisis són correctes, es passa al genotipat dels 50 individus F2, acotant una regió d'uns 20 cM (5 Mb, corresponents a uns 60 clons BAC) candidata a contenir el gen mutat. Aquesta informació s'obté calculant els percentatges de recombinació dels genotips mutant (en aquest cas Ws) i silvestre (Col-0) amb els diferents marcadors. Els marcadors que no tinguin cap relació amb la mutació presenten un percentatge de recombinació dels 2 genomes proper al 50%. En canvi, aquells marcadors localitzats al voltant de la mutació (que és recessiva i està en el fons Ws) estan empobrits en el genotip Col-0 i per tant el percentatge de recombinació amb el genotip Col-0 en les regions properes a la mutació és significativament més baix del 50%. A la **figura R.34B** es mostra un exemple del genotipat d'algunes de les 50 plantes F2, assenyalant-se en taronja i per a cada marcador tots aquells casos en els que es detecta el fons genètic Col-0, ja sigui en heterozigosi o homozigosi. El càlcul en percentatges de la recombinació ocorreguda permet la realització de la taula mostrada en la **figura R.34C**, on s'assenyalen els dos marcadors del cromosoma 1 que acoten la mutació present en els individus I2.164: nga59 i JV18/19. S'observa que el valor del percentatge de recombinació (r %) per aquests dos marcadors dista molt del 50%.

En la regió compresa entre els marcadors nga59 i JV18/19 hi ha uns 1386 gens continguts en 61 clons BAC, alguns dels quals relacionats amb llum, d'entre els que destaquen: LHY, HFR1, CRY2, PIF3, PHYA, i GAI (**figura R.35**).

Figura R.35. Representació de la regió del cromosoma 1 on es troba la mutació I2.164. A la part superior s'esquematitza el cromosoma 1 sencer amb els marcadors SSLPs analitzats en el mapatge de baixa resolució. A la part inferior s'amplia la regió candidata a contenir la mutació, assenyalant els gens ja identificats com a implicats en la senyalització per llum que es troben en aquesta regió.



Es preveu completar el mapatge d'alta resolució d'aquest mutant en breu, el que facilitarà la identificació el gen mutat responsable del fenotip morfogènic d'aquesta línia.