

**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

## Capítol IV. Estudi dels gens *PAR*

Un cop identificats els *PAR*, el següent pas per assolir l'objectiu general de dissecionar la cascada de transducció del senyal durant la SAS era caracteritzar aquests factors i estudiar la seva funció durant la resposta a l'ombra. Amb la finalitat d'analitzar la funció d'alguns dels factors *PAR* en el procés de la síndrome de fugida de l'ombra vam seguir una estratègia de genètica inversa. Aquesta es basa en la deducció de la funció d'un factor determinat a partir de l'estudi del fenotip dels seus mutants de guany (sobreexpressió) i de pèrdua o reducció de funció.

### 1. Sobreexpressió d'*ATHB2* i *ATHB4*

*ATHB2* i *ATHB4* són dos gens *PAR* diana primaris de l'acció dels fitocroms durant la SAS que codifiquen dues proteïnes del tipus HD-ZIP, anomenades així perquè contenen una seqüència *homeobox* de 60 aminoàcids anomenada *homeodomain* (HD) i un motiu de cremallera de leucines (*leucine zipper*, abreujat ZIP). Les seves seqüències proteiques presenten un 88.5% de similitud (Carabelli i col., 1993).

El cDNA dels gens *ATHB2* i *ATHB4* es van obtenir per RT-PCR i utilitzant encebadors específics a partir de RNA de plàntules silvestres Col-0 tractades 1h amb ombra simulada i es van introduir en el vector de clonatge pTZ57R. Posteriorment es van introduir en el vector binari pBinAr, resultant les fusions P<sub>35S</sub>:*ATHB2* i P<sub>35S</sub>:*ATHB4* (apartat 1.3.2 del material i mètodes). Amb aquestes construccions es van transformar plantes i es va obtenir la sobreexpressió constitutiva i estable dels gens *ATHB2* i *ATHB4*. Plantes heterozigotes per aquestes construccions al ser cultivades a l'hivernacle presentaven un fenotip clarament diferent al de les plantes silvestres (**figura R.36**). El tret característic d'aquestes plantes a l'estadi de roseta, tot i haver una gradació en la severitat del fenotip, era l'allargament de pecíols i fulles i el cargolament d'aquestes cap a dalt (hiponàstia). A més, algunes de les plantes en estadi adult presentaven flors situades cap avall (epinàstia) i síliques curtes. També es trobaven plantes poc vigoroses.

Aquests resultats indiquen que la sobreexpressió d'*ATHB2* i *ATHB4* altera el desenvolupament de diferents òrgans de la planta, tant en l'estadi vegetatiu com en el reproductor. A més, la sobreexpressió de cadascun d'aquests gens per separat afecta els mateixos trets fisiològics.

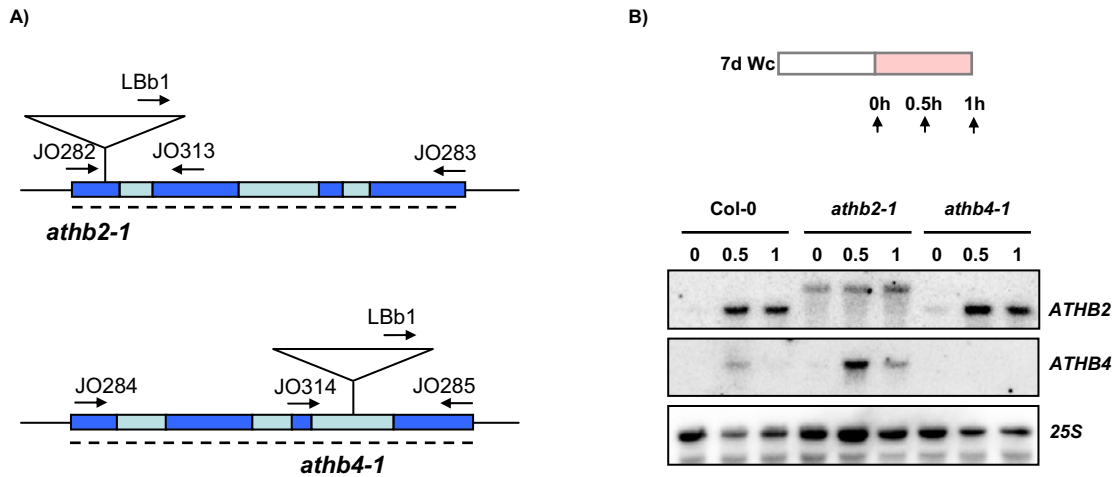


**Figura R.36. Aspecte de les plantes de sobreexpressió d'ATHB2 i ATHB4.** A l'esquerra, aspecte de la roseta d'una planta amb fenotip silvestre. Al mig, aspecte de la roseta de tres línies independents de P<sub>35S</sub>:ATHB2 (part superior) i P<sub>35S</sub>:ATHB4 (part inferior). A la dreta, detall de les inflorescències de plantes adultes per ambdues construccions. El número de la línia es mostra junt a cada planta.

## 2. Mutants simples d'ATHB2 i ATHB4

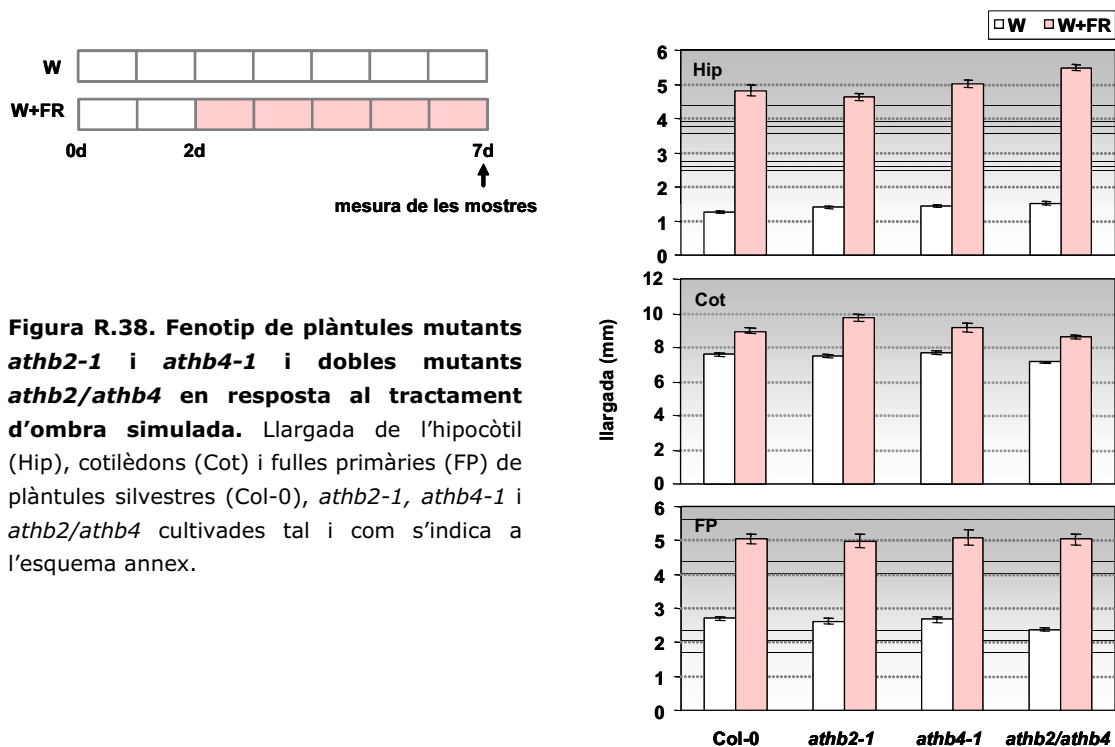
Es van demanar mutants simples d'ATHB2 i ATHB4 de la col·lecció de mutants del Salk Institute Genomic Analysis (ATHB2, línia Salk\_106790, d'ara en endavant anomenada *athb2-1*; ATHB4, línia Salk\_104843, d'ara en endavant anomenada *athb4-1*) (**figura R.37A**). Les llavors rebudes de la generació T3 i segregant, es van sembrar a terra i quan les plantes es trobaven en estadi de roseta se'n va extreure DNA genòmic i es van genotipar analitzant la presència del T-DNA per PCR (apartat 2.4.4.2 del material i mètodes). Aquelles plantes que presentaven el transgen en homozigosi van ser seleccionades i cultivades a l'hivernacle fins obtenir la generació següent (T4). Aquestes llavors van ser utilitzades per als posteriors experiments moleculars i fisiològics.

Es va analitzar per *northern-blot* l'expressió d'ATHB2 i ATHB4 en plantes homozigotes per la mutació (**figura R.37B**). Com s'observa, l'expressió d'ATHB4 és indetectable en el seu mutant, suggerint que es tracta d'un mutant nul, mentre que sí que es detecta una banda en el mutant *athb2-1*, però de mida superior a la d'ATHB2 correctament processat, la qual cosa suggereix que ATHB2 també està silenciada en el seu mutant corresponent. Aquests mutants simples no presentaven cap fenotip obvi al ser cultivades a l'hivernacle, per la qual cosa es va decidir obtenir el doble mutant per creuament. Plantes dobles mutants *athb2/athb4* tampoc presentaven cap fenotip aparent (dades no mostrades).



**Figura R.37. Caracterització molecular de les línies mutants *athb2-1* i *athb4-1*.** **A**, representació esquemàtica de la seqüència genòmica d'*ATHB2* i *ATHB4* i les insercions de T-DNA en *athb2-1* i *athb4-1*. La línia de punts indica la regió utilitzada com a sonda per a les anàlisis *northern-blot*. **B**, anàlisi *northern-blot* de l'expressió d'*ATHB2* i *ATHB4* en plantes silvestres (Col-0) i de les línies mutants *athb2-1* i *athb4-1* en resposta a l'ombra simulada cultivades tal i com s'indica a l'esquema superior.

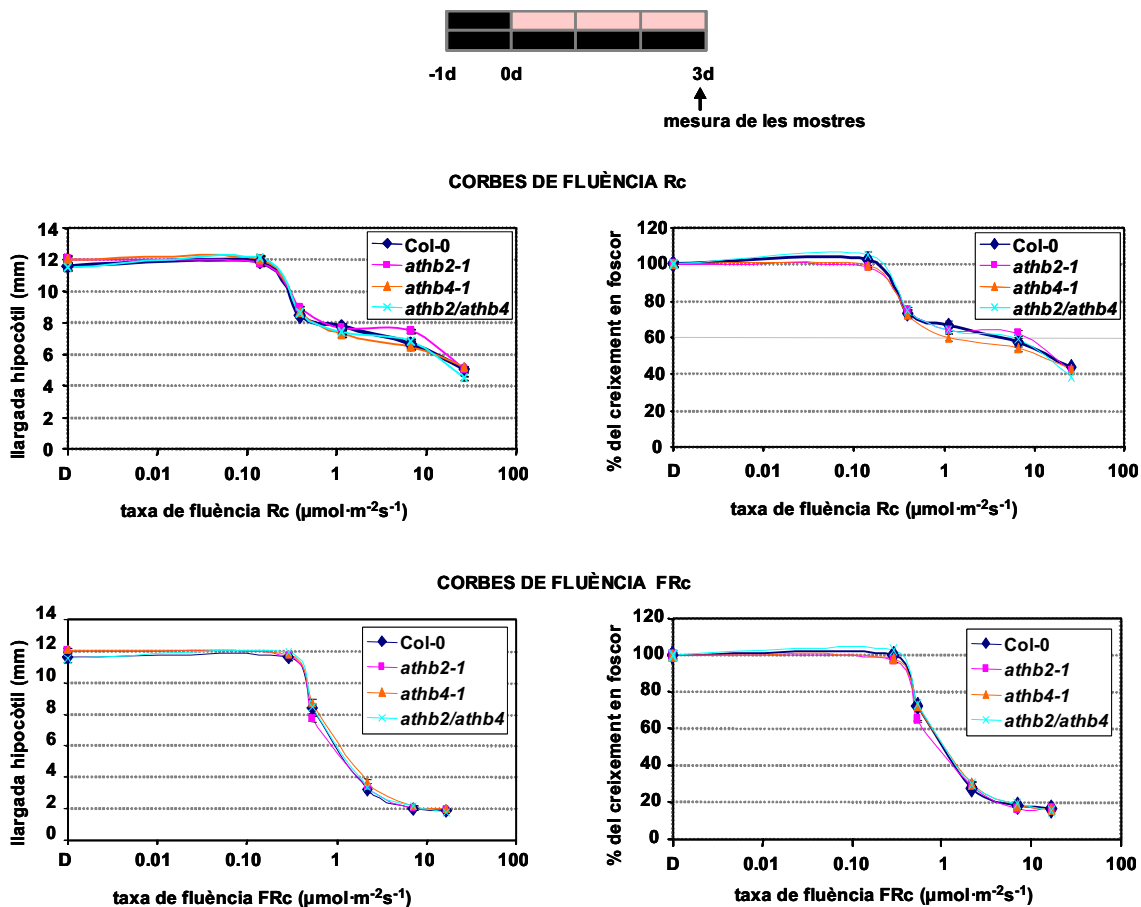
Vam estudiar la resposta d'aquests mutants simples i dobles a l'ombra simulada (**figura R.38**). Els mutants simples *athb2-1* i *athb4-1* i el doble mutant *athb2/athb4* no mostraren una resposta a l'ombra simulada significativament diferent a la que presenten les plantes silvestres. Aquests resultats indiquen que la pèrdua de funció dels gens *ATHB2*, *ATHB4* o de tots dos gens alhora no provoca un fenotip a la planta quan aquesta és cultivada en W ni quan és sotmesa a ombra simulada.



**Figura R.38. Fenotip de plàntules mutants *athb2-1* i *athb4-1* i dobles mutants *athb2/athb4* en resposta al tractament d'ombra simulada.** Llargada de l'hipocòtil (Hip), cotilèdons (Cot) i fulles primàries (FP) de plàntules silvestres (Col-0), *athb2-1*, *athb4-1* i *athb2/athb4* cultivades tal i com s'indica a l'esquema annex.

A més de les respostes a l'ombra simulada, vam estudiar el fenotip d'aquests mutants durant la desetioliació sota diferents intensitats de Rc i FRc (experiments idèntics als descrits a l'apartat 3.3 del capítol III), en les que s'expressa l'allargament de l'hipocòtil de les plàntules en relació al logaritme de la fluència de llum. A la **figura R.39** es mostra els resultats d'aquests experiments, observant-se com cap dels mutants simples *athb2-1* i *athb4-1* ni el doble mutant *athb2/athb4* presenten un fenotip significativament diferent al fenotip de les plàntules silvestres Col-0 en les diferents intensitats de llum aplicades.

Aquests resultats indiquen que la pèrdua de funció dels gens *ATHB2*, *ATHB4* o de tots dos gens alhora no provoca un fenotip a la planta en la desetioliació sota Rc o FRc.



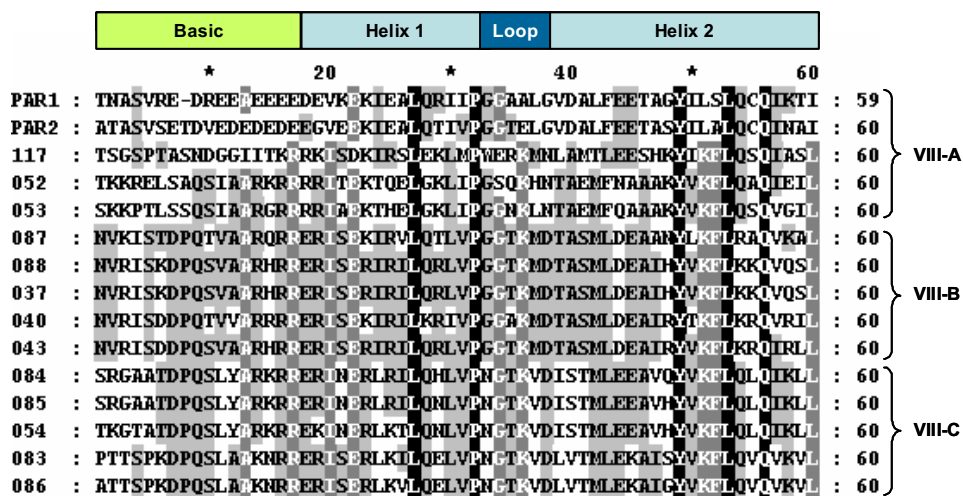
**Figura R.39. Corbes de fluència en Rc i FRc del mutants *athb2-1*, *athb4-1* i del doble mutant *athb2/athb4*.** A l'esquerra de la imatge, els gràfics representen la llargada dels hipocòtils en relació a la taxa de fluència. A la dreta de la imatge, els gràfics representen les mateixes dades anteriors però referint l'allargament dels hipocòtils a les diferents taxes de fluència a l'allargament d'aquests a la foscor. Les plàntules s'han cultivat tal i com s'indica a l'esquema superior.

D'aquest bloc de resultats concloem que no hem detectat cap tipus de fenotip per als mutants simples *athb2-1* i *athb4-1* ni per al doble mutant *athb2/athb4* en els processos de la SAS i la desetioliació en les nostres condicions experimentals.

# Capítol V. Caracterització del factor PAR1

## 1. Estudi de la seqüència de PAR1

*PAR1* és un dels gens diana primaris de l'acció dels fitocroms identificats en el capítol I, que codifica una proteïna petita de 118 residus per a la qual, com s'ha comentat, a l'inici d'aquest treball no s'havia descrit cap funció. Vam fer una cerca per trobar a quines proteïnes s'assemblava PAR1 utilitzant el programa BLAST. La seqüència de *PAR1* és molt similar a la d'un altre gen d'arabidopsis que hem anomenat *PAR2* (At3g58850), que també codifica una proteïna de funció desconeguda de la mateixa mida i 72% de similitud (64% d'identitat) amb *PAR1*. A més, PAR1 i PAR2 mostren similitud amb factors de transcripció del tipus *basic helix-loop-helix* (bHLH) d'arabidopsis, semblança que es restringeix a la regió HLH. En canvi, les seqüències divergeixen en la regió bàsica, motiu característic de la unió al DNA de les proteïnes bHLH, que en el cas de PAR1 i PAR2 és clarament una regió àcida i que no manté cap residu conservat amb la resta de bHLHs més semblants. Més enllà de la regió bHLH central no es troba cap domini reconegut (figura R.40).



**Figura R.40. Alineament de les seqüències proteiques de PAR1, PAR2 i factors de transcripció de la família bHLH.** Els bHLH s'han numerat com els anomenen els autors (Heim i col., 2003). En aquesta figura només es mostra l'alineament de les seqüències en la regió corresponent al domini bHLH, representat a la part superior.

## 2. Anàlisi funcional en planta

Per analitzar la funció de PAR1 en el desenvolupament de la planta, es va adoptar una estratègia de genètica inversa com la realitzada per als gens *ATHB2* i *ATHB4* (capítol IV), generant plantes de sobreexpressió i de pèrdua de funció de *PAR1*.

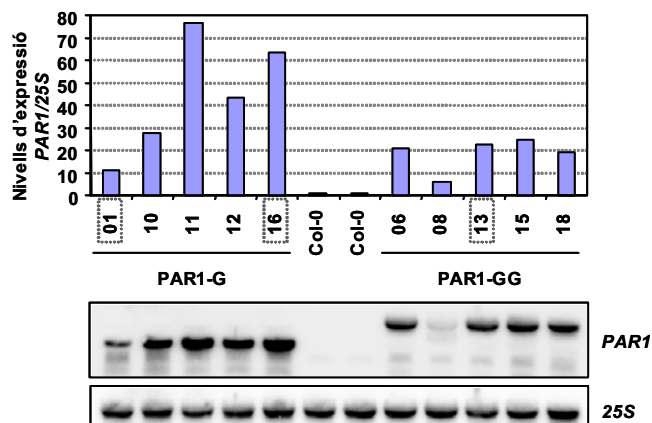
## 2.1. Obtenció i caracterització de plantes de sobreexpressió de *PAR1*

El gen *PAR1* no té introns, el que va permetre clonar-lo directament per PCR sobre DNA genòmic de plantes silvestres Col-0 utilitzant encebadors que eliminaven el codó stop per poder expressar-lo com a proteïna de fusió en planta. Es va introduir en el vector pGEM-T *Easy* i posteriorment en els vectors binaris pCAMBIA1302 i pCAMBIA1303, obtenint la sobreexpressió de *PAR1* sota el control del promotor constitutiu 35S i fusionat al gen reporter *GFP* (d'ara en endavant P<sub>35S</sub>:PAR1-G) i als gens reporters *GUS-GFP* (d'ara en endavant P<sub>35S</sub>:PAR1-GG) respectivament (apartat 1.3.2 del material i mètodes). Amb aquestes construccions es van transformar plantes d'arabidopsis obtenint plantes transgèniques de sobreexpressió de *PAR1*. Paral·lelament a aquest treball en el nostre laboratori es van obtenir plantes transgèniques per a la sobreexpressió de *PAR1* sense fusionar a cap gen reporter sota el control del promotor constitutiu 35S (d'ara endavant P<sub>35S</sub>:PAR1) que també s'han utilitzat en alguns dels estudis que es presenten a continuació.

### 2.1.1. Caracterització molecular

La gran majoria de les plantes que estaven segregant els transgens per a la sobreexpressió (generació T2) ja presentaven un fenotip característic al ser cultivades a l'hivernacle. Les plantes eren nanes amb rosetes i inflorescències compactes, fulles epinàstiques, tiges florals i síliques curtes i un color verd fosc (dades no mostrades). El fet que totes les plantes, independentment de la construcció que contenien, presentessin el mateix fenotip (nanisme i coloració verd fosca), indicava que amb tota probabilitat aquests canvis fenotípics eren deguts a elevats nivells de *PAR1*. Tot i això, vam caracteritzar-les molecularment per determinar quines sobreexpressaven el transgen i en quins nivells ho feien. L'anàlisi *northern-blot* de l'expressió de *PAR1* en plàntules segregants cultivades 7d en Wc (**figura R.41**) mostrava que totes les línies de sobreexpressió presentaven nivells d'expressió de *PAR1* superior al de les plantes silvestres (que correspondria a una banda de menor mida i pràcticament indetectable en l'exposició mostrada), essent els nivells d'expressió molt variables entre les diferents línies.

**Figura R.41. Caracterització molecular de les línies de sobreexpressió de *PAR1*.** Anàlisi *northern-blot* de l'expressió de *PAR1* en plàntules silvestres i diferents línies segregants independents *PAR1-G* i *PAR1-GG* cultivades 7d en Wc. A la part superior es mostren els nivells d'expressió de *PAR1* en aquestes línies quantificats respecte al 25S i relatius a l'expressió en les plantes silvestres *Col-0*. Amb un requadre s'assenyalen les línies seleccionades per a posteriors experiments.

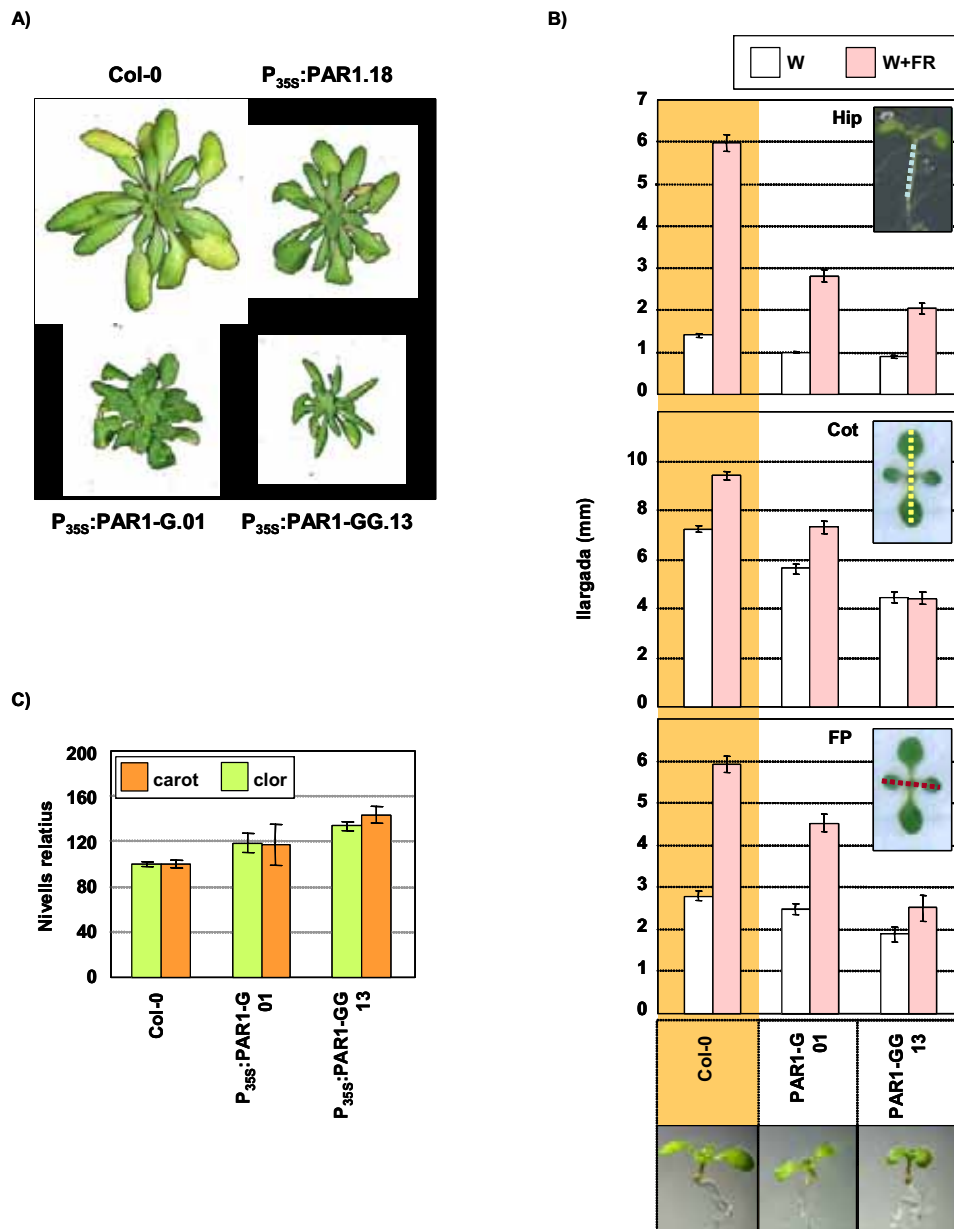


### 2.1.2. Caracterització fenotípica

Algunes de les plantes que sobreexpressaven el transgen tenien el fenotip molt alterat: eren molt nanes, creixien lentament i les síliques curtes produïen molt poques llavors, la qual cosa dificultava l'obtenció de línies homozigotes amb fenotips extrems. És per això que es van seleccionar plantes T2 amb fenotips intermedis, com les línies 01 i 16 de la construcció  $P_{35S}:\text{PAR1-G}$  i la línia 13 de la construcció  $P_{35S}:\text{PAR1-GG}$ , per aïllar plantes homozigotes mitjançant l'obtenció de subsegüents generacions i selecció per la presència del transgen.

El clar fenotip que presentaven les plantes T2 es va seguir manifestant en subsegüents generacions, essent més fort en les plantes que sobreexpressaven *PAR1* sense fusionar a cap gen reporter (dades no mostrades). Plantes homozigotes de la generació T4 al ser cultivades en cicles de dia curt (SD, de l'anglès *short days*) presentaven en estadi de roseta de 6 setmanes d'edat un clar aspecte nan i una coloració més fosca que la de les plantes silvestres (**figura R.42A**).

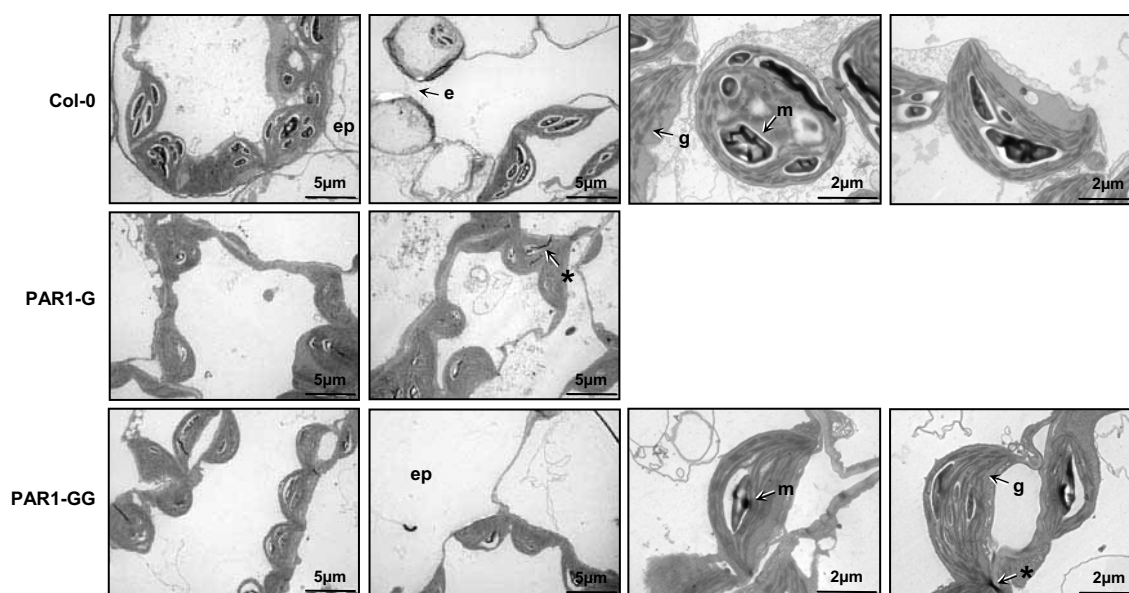




**Figura R.42. Fenotip de les plàntules de sobreexpressió de *PAR1* en Wc i en resposta a l'ombra simulada. A**, fenotip de plantes silvestres (Col-0) i diferents línies de sobreexpressió de *PAR1* cultivades durant 6 setmanes en condicions de SD (8h llum, 16h fosc). **B**, llargada de l'hipocòtil (Hip), cotilèdons (Cot) i fulles primàries (FP) de plàntules silvestres i de sobreexpressió *PAR1*-G i *PAR1*-GG cultivades tal i com s'indica a la figura R.38. A la part inferior es mostra l'aspecte d'aquestes plantes al ser cultivades en Wc. **C**, nivells relatius (en %) de clorofil·les i carotenoides presents en aquestes plantes cultivades 7d en Wc.

Aquest fenotip es va caracteritzar més detalladament en l'estadi de plàntula, per la qual cosa plàntules silvestres i sobreexpressants de *PAR1* es van cultivar 7d en Wc (**figura R.42B**, barres blanques). Aquestes plàntules presenten hipocòtils més curts i un menor allargament dels cotilèdons i de les fulles verdaderes que les plantes silvestres. A més, acumulen entre un 20 i un 50% més de clorofil·les i carotenoides que les plantes silvestres (**figura R.42C**).

Es va estudiar si la major acumulació de pigments es corresponia amb algun canvi a nivell subcel·lular dels orgànuls que els acumulen, els cloroplasts, per la qual cosa es va observar la seva estructura subcel·lular mitjançant microscòpia electrònica, centrant-nos en els cloroplasts de la primera capa de cèl·lules sota l'epidermis (**figura R.43**). Les cèl·lules de les plantes silvestres Col-0 semblen mostrar un elevat número de cloroplasts. A més, aquests presenten nombrosos grans de midó de grans dimensions en el seu interior. Quant a les plantes de sobreexpressió de *PAR1*, aquestes semblen tenir grans de midó més petits que els dels cloroplasts silvestres, i sovint un menor nombre d'ells. A més, en les plantes de sobreexpressió de *PAR1* vam observar unes estructures fibrilars electrodenses, la identitat de les quals ens resulta desconeguda, que no observàvem als cloroplasts de les plantes silvestres (a la figura s'assenyalen amb un asterisc).



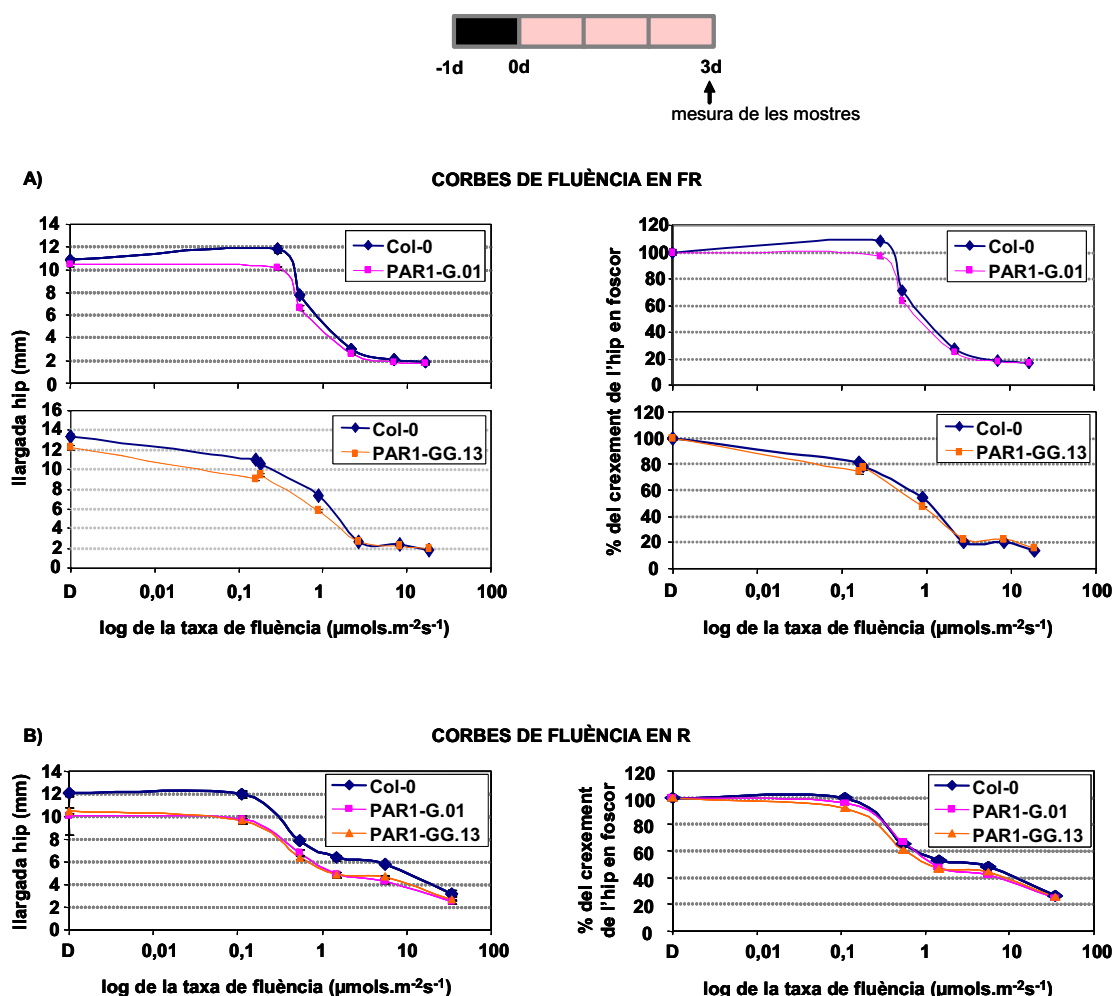
**Figura R.43. Estructura subcel·lular de plantes silvestres Col-0 i de sobreexpressió PAR1-G i PAR1-GG.** Imatges de microscopi electrònic de transmissió de plantes cultivades 7d en Wc. Les estructures d'interès s'assenyalen amb fletxes. e, estoma; ep, epidermis; g, grana; m, midó; \* estructures fibrilars electrodenses d'identitat desconeguda.

Els efectes que la sobreexpressió de *PAR1* provocava en el desenvolupament i el metabolisme de la planta ens va dur a analitzar si aquests trets estaven relacionats amb les respostes de les plantes silvestres a l'ombra simulada. A l'apartat 7 del capítol I ja hem vist com l'ombra simulada promou l'allargament de l'hipocòtil, cotilèdons i fulles primàries en plàntules silvestres. També hem observat que plàntules silvestres sotmeses a ombra simulada mostren nivells més baixos de clorofil·les i carotenoides que quan són mantingudes en W. Aquests canvis són oposats als de la sobreexpressió de *PAR1*, per tant, la sobreexpressió de *PAR1* i l'ombra simulada afecten els mateixos trets fisiològics i bioquímics però en sentit contrari.

Plantes homozigotes per a la sobreexpressió de *PAR1* es van sotmetre a tractaments d'ombra simulada com els exposats a l'apartat 7 del capítol I i es van

caracteritzar les respostes fisiològiques a aquest tractament (**figura R.42B**). Aquestes plàntules presentaven les respostes de la SAS (allargament de l'hipocòtil, cotilèdons i fulles primàries) atenuades comparat amb les de la línia silvestre, i l'atenuació d'aquestes respostes es correlacionava positivament amb els nivells de sobreexpressió del transgen. Aquests resultats, junt amb el fet que, com ja s'ha dit, la sobreexpressió de *PAR1* i l'ombra simulada afecten els mateixos trets fisiològics i bioquímics però de manera contrària, suggereixen que *PAR1* actuaria com un regulador negatiu de la SAS.

Donat que *PAR1* s'havia descrit inicialment com a gen ràpidament reprimit durant la desetiolació sota FRc (capítol I), també es va estudiar la possible funció de *PAR1* en la desetiolació de la plàntula. Es va caracteritzar la resposta de les línies de sobreexpressió de *PAR1* a la desetiolació en diferents intensitats de llum R o FR. El disseny experimental va ser idèntic a l'explicat en l'apartat 3.3 del capítol III, i la resposta mesurada també fou la llargada de l'hipocòtil. A la **figura R.44** es mostra l'allargament de l'hipocòtil de les línies de sobreexpressió de *PAR1* sota diferents intensitats de llum R o FR. Com es pot observar en els gràfics de l'esquerra de la figura, les plàntules de sobreexpressió de *PAR1* eren més curtes que les silvestres a la foscor (D). Al referir les mesures de l'allargament dels hipocòtils a la llargada d'aquests a D (**figura R.44A, dreta**) veiem que les plàntules de sobreexpressió són lleugerament més curtes que les silvestres a fluències de FR baixes i intermèdies, i també a baixes i intermèdies fluències de R (**figura R.44B, dreta**). Aquests resultats indiquen que les línies de sobreexpressió de *PAR1* mostren una lleu hipersensibilitat a la llum R i FR en fluències baixes i intermèdies de llum.



**Figura R.44. Fenotip de les plàntules de sobreexpressió de PAR1 en resposta a la desetiolació. A,** Corbes de fluència en FRc de plàntules de sobreexpressió PAR1-G i PAR1-GG. **B,** Corbes de fluència en Rc de plàntules de sobreexpressió PAR1-G i PAR1-GG. A l'esquerra de la imatge, els gràfics representen la llargada dels hipocòtils en relació a la taxa de fluència lumínica. A la dreta de la imatge, els gràfics representen les mateixes dades anteriors però referint l'allargament dels hipocòtils en les diferents taxes de fluència a l'allargament d'aquests a la foscor. Tant en A com en B les plàntules s'han cultivat tal i com s'indica a l'esquema superior.

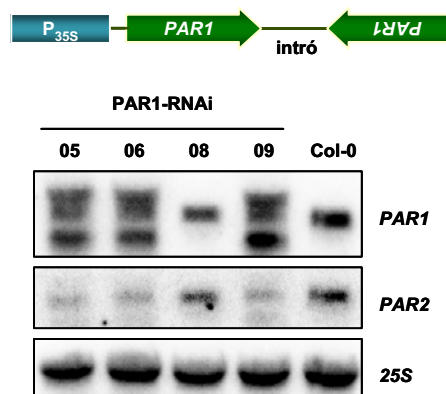
## 2.2. Obtenció i caracterització de línies amb nivells reduïts de PAR1 (i PAR2)

De la mateixa manera que es va fer per a *ATHB2* i *ATHB4*, es van buscar mutants per a *PAR1* en les col·leccions de mutants disponibles (SALK i SAIL). Al no trobar-ne cap que tingués una inserció a la regió codificant, vam decidir optar per la tècnica de l'RNA d'interferència (RNAi) per a silenciar aquest gen (apartat 1.2.3 del material i mètodes). Aquesta tècnica es basa en introduir en la planta una molècula de RNA que, essent complementària a gens específics, els degrada mitjançant mecanismes de silenciament post-transcripcional. A la construcció resultant, amb la qual es van transformar plantes d'arabidopsis, l'anomenarem a partir d'ara PAR1-RNAi.

### 2.2.1. Caracterització molecular

Es van seleccionar les línies PAR1-RNAi analitzant per *northern-blot* l'expressió de *PAR1* en línies segregants per a la construcció sotmeses a 1h d'ombra simulada. Aquest tractament es va realitzar per induir l'expressió de *PAR1* i així identificar millor aquelles línies que mostressin nivells d'expressió de *PAR1* menors que les silvestres (**figura R.45**). En els *northern-blots* algunes de les línies presentaven, a part de la banda corresponent a *PAR1*, una banda superior i una inferior a aquesta també reconegudes per la sonda de *PAR1*, que probablement corresponen a la construcció PAR1-RNAi utilitzada per silenciar el gen endogen. No obstant això, els nivells de *PAR1* endogen estaven reduïts en totes les línies analitzades. A més, en aquestes línies també es troba silenciada el gen *PAR2*, homòleg a *PAR1*, identificat en el nostre laboratori. És interessant destacar que les línies amb nivells de *PAR2* més reduïts presentaven un patró complex de bandes reconegudes per *PAR1*, el que suggereix que la presència d'aquest patró es correlacionarà amb nivells de silenciament més forts.

**Figura R.45. Caracterització molecular de les línies PAR1-RNAi.** Anàlisi *northern-blot* de l'expressió de *PAR1* i *PAR2* en plàntules silvestres i diferents línies segregants independents PAR1-RNAi cultivades 7d en Wc i sotmeses a 1h d'ombra simulada. Com a control de càrrega es mostra la hibridació amb la sonda constitutiva 25S. A la part superior de la imatge s'esquematitza la construcció utilitzada per silenciar *PAR1*.



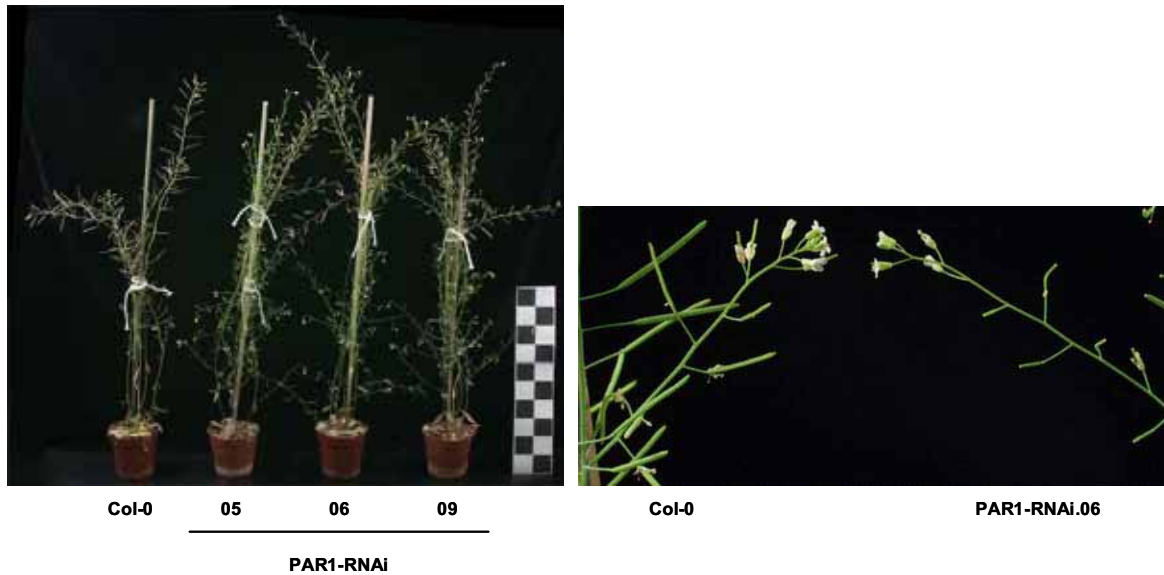
S'ha comprovat que les línies mantenen el silenciament en les subsegüents generacions que hem utilitzat per a la seva caracterització, ja que el silenciament gènic obtingut mitjançant la tècnica de l'RNAi es pot perdre al llarg de les generacions, possiblement per silenciament de la pròpia construcció introduïda. Aquesta variabilitat ha dificultat el manteniment de les línies, i és per això que tot i intentar ser sistemàtics els experiments que presentem a continuació no s'han fet sempre amb les mateixes línies.

### 2.2.2. Caracterització fenotípica

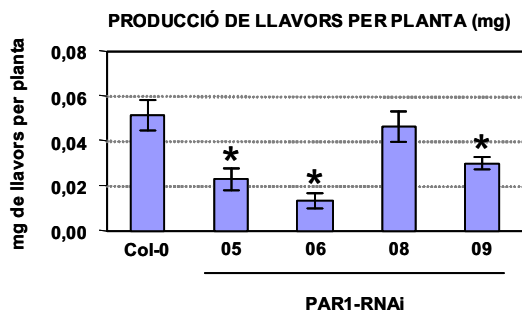
Les plantes PAR1-RNAi al ser cultivades a l'hivernacle presentaven una fertilitat reduïda. Les síliques eren més curtes i sovint presentaven moltes branques laterals, efecte ja descrit en mutants estèrils (Hensel i col., 1994) (**figura R.46A**). Es va quantificar aquest fenotip estimant el pes de les llavors produïdes per planta. Es van sembrar i cultivar a l'hivernacle 8-10 plantes de 4 línies independents PAR1-RNAi i la línia silvestre Col-0, i es van recollir les llavors de cada planta separatament. Al comparar el pes mitjà de llavors produïdes per planta vam veure que totes elles tenien una producció de llavors menor que la línia silvestre, essent la diferència estadísticament significativa en tots els

casos excepte per la línia PAR1-RNAi-08 (**figura R.46B**) que és la línia que mostrava un silenciament menor de *PAR1* i *PAR2* i un fenotip menys acusat al cultivar-la a l'hivernacle. Aquest resultat ens indica una correlació negativa entre el silenciament dels gens *PAR1* i *PAR2* i la fertilitat de la planta expressada com a pes de llavors produïdes per planta.

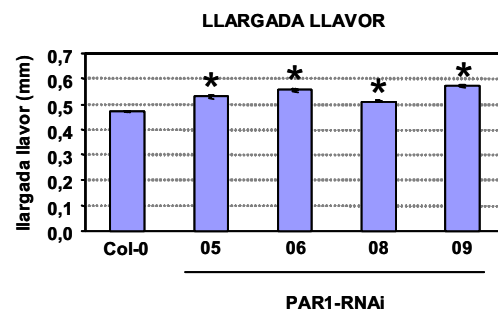
A)



B)



C)

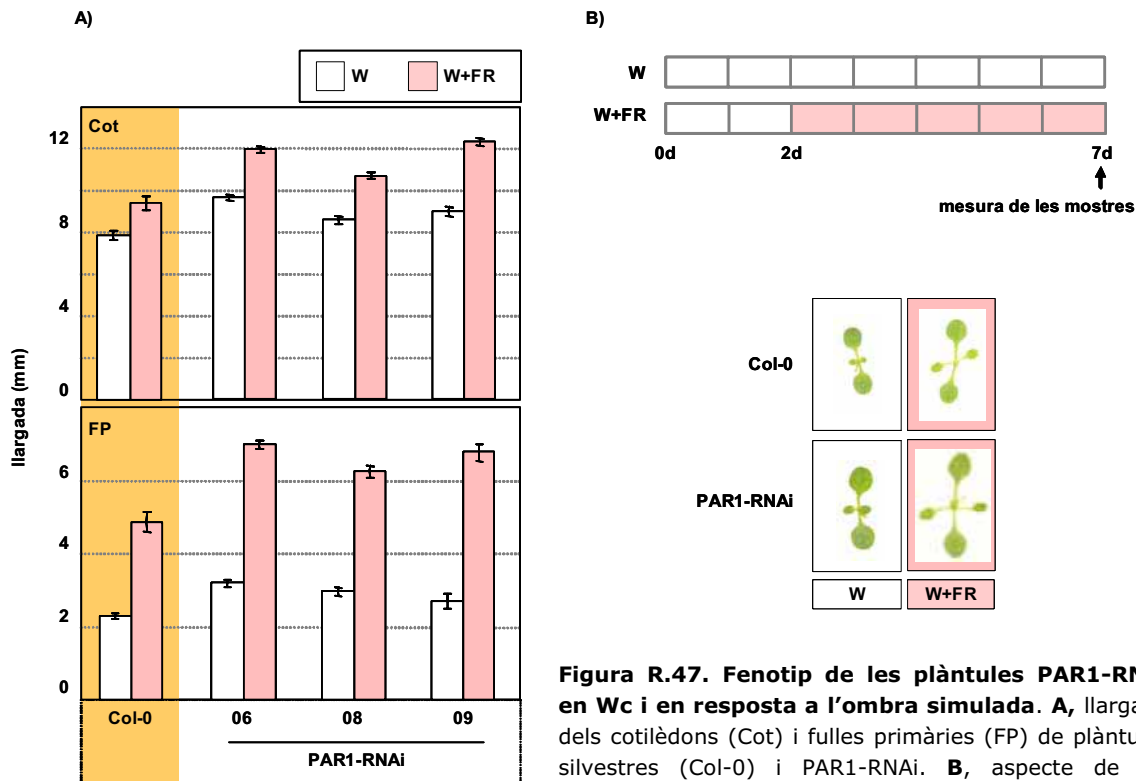


**Figura R.46. Fenotip de plantes PAR1-RNAi i anàlisi de la seva fertilitat. A,** Fenotip de plantes adultes silvestres Col-0 i diferents línies PAR1-RNAi. Esquerra, aspecte general de les plantes. Dreta, detall de les síliques d'una planta silvestre i una PAR1-RNAi. **B,** producció de llavors d'aquestes plantes. **C,** llargada de les llavors d'aquestes plantes. En A, B i C les plantes han estat cultivades a l'hivernacle en condicions de LD (14h llum, 10h fosc). En B i C es marquen amb un asterisc aquelles línies que mostren diferències significatives respecte a la línia silvestre.

A més, al recollir les llavors vam observar que les de les línies PAR1-RNAi semblaven lleugerament més grans, i per tant més llargues, que les de les plantes silvestres. Es va quantificar aquest fenotip mesurant la llargada de 150 llavors de cada línia. A la **figura R.46C** es mostra com les llavors de les línies PAR1-RNAi són significativament més llargues que les de la planta silvestre, el que indica que, per al mateix pes, les línies PAR1-RNAi contenen menor número de llavors. Això ens permet

determinar que al estar prenent el pes de les llavors com una mesura de la producció d'aquestes per planta estem sobreestimant la producció de llavors de les plantes PAR1-RNAi, i reforcem els resultats de les mesures de fertilitat expressats com a producció de llavors que indiquen una correlació inversa entre el silenciament dels gens *PAR1* i *PAR2* i la fertilitat de la planta.

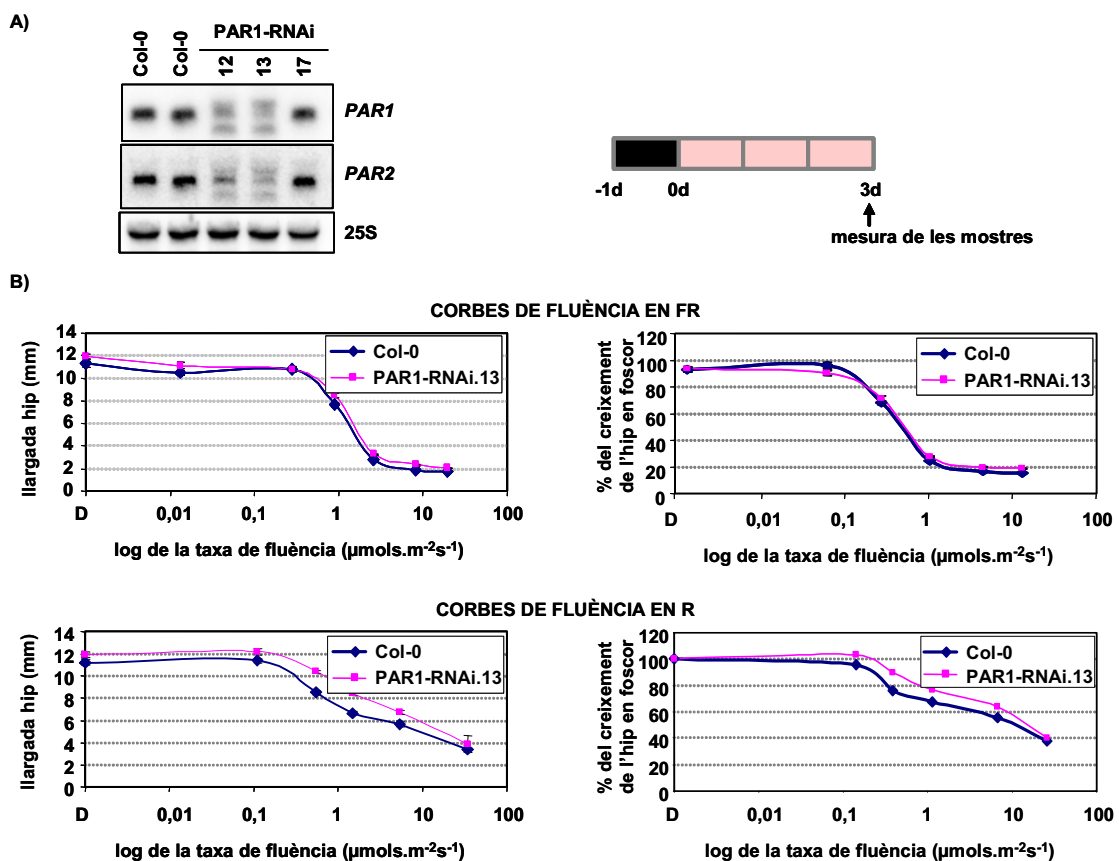
Quan estudiem el fenotip de les línies PAR1-RNAi a nivell de plàntula cultivant-les 7d en Wc, aquestes mostren un major allargament dels cotilèdons i de les fulles primàries (**figura R.47A**, barres blanques).



**Figura R.47. Fenotip de les plàntules PAR1-RNAi en Wc i en resposta a l'ombra simulada. A,** llargada dels cotilèdons (Cot) i fulles primàries (FP) de plàntules silvestres (Col-0) i PAR1-RNAi. **B,** aspecte de les plàntules silvestres (Col-0) i PAR1-RNAi mesurades a l'apartat A. Les plantes s'han cultivat tal i com s'indica a la part superior de B.

Quan sotmetem les plàntules PAR1-RNAi a un tractament d'ombra simulada idèntic al descrit en l'apartat 7 del capítol I, veiem que aquestes mostren unes respostes a nivell d'allargament de cotilèdons i fulles primàries més acusades que les plantes silvestres (**figura R.47A i B**), mentre que no s'observen diferències significatives quant a l'allargament de l'hipocòtil (dades no mostrades). Aquests resultats indiquen que els nivells reduïts de *PAR1* (i *PAR2*) resulten en una resposta més acusada a l'ombra simulada. A més, aquests resultats són consistents amb els resultats presentats a l'apartat 2.1.2 d'aquest capítol indicant que *PAR1*, i possiblement *PAR2*, actuaria com un regulador negatiu de la SAS.

Es va caracteritzar la resposta de les plantes PAR1-RNAi a la desetioliació en diferents intensitats de llum R o FR. El disseny experimental va ser idèntic a l'explicat en l'apartat 3.3. del capítol III i la resposta mesurada fou la llargada de l'hipocòtil. A la **figura R.48** es mostra l'allargament de l'hipocòtil de la línia PAR1-RNAi.13 sota diferents intensitats de llum R o FR. En el moment de realitzar aquests experiments no es disposava de cap altra línia PAR1-RNAi que presentés un silenciament mantingut durant les generacions (les línies caracteritzades molecular i fenotípicament i descrites en els apartats anteriors es van obtenir amb posterioritat), és per això que es presenten els resultats d'una sola línia. Al contrari del que passava amb les plantes de sobreexpressió de PAR1, les plàntules PAR1-RNAi eren lleugerament més llargues que les silvestres a la foscor (D, gràfics de l'esquerra de la figura). Al posar les mesures de l'allargament de l'hipocòtil en relació a la llargada d'aquest a la foscor veiem que les plàntules PAR1-RNAi són igual de llargues que les silvestres en les diferents fluències de FR, mentre que són més llargues a fluències intermèdies de R (**figura R.48B**). Aquests resultats suggereixen que les línies PAR1-RNAi de PAR1 són lleugerament hiposensibles a R en fluències intermèdies de llum.



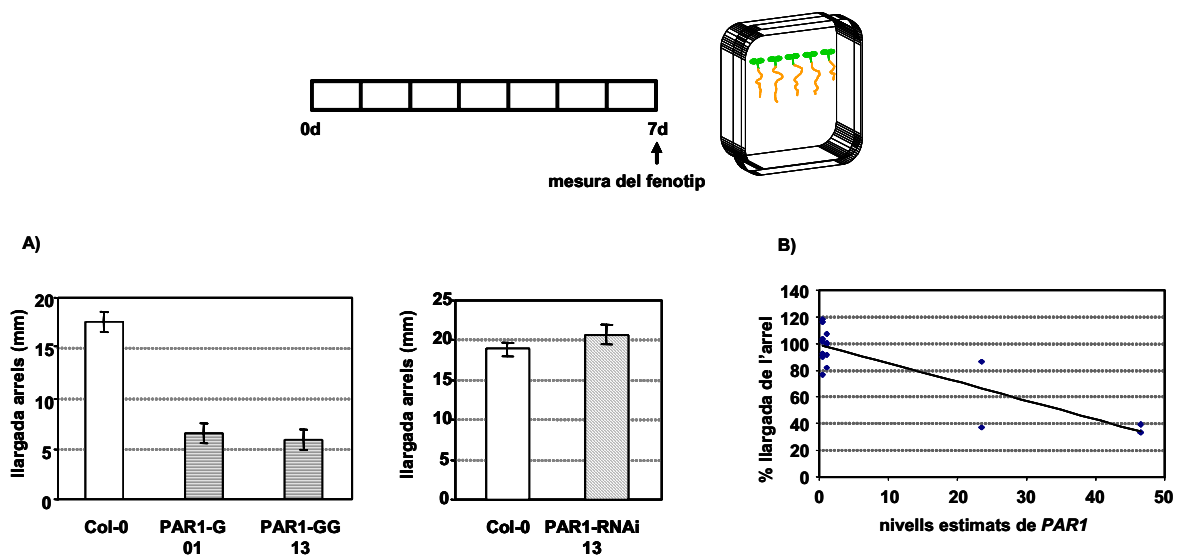
**Figura R.48. Fenotip de les plàntules PAR1-RNAi en resposta a la desetioliació. A,** Caracterització molecular per anàlisi *northern-blot* de la línia PAR1-RNAi utilitzada en aquest experiment. S'analitza l'expressió de *PAR1* i *PAR2* en plàntules silvestres (Col-0) i línies segregants PAR1-RNAi cultivades 7d en Wc i sotmeses a 1h d'ombra simulada. Com a control de càrrega es mostra la hibridació amb la sonda constitutiva 25S. **B,** Corbes de fluència en FRc i Rc de plàntules PAR1-RNAi. A l'esquerra de la imatge, els gràfics representen la llargada dels hipocòtils en relació a la taxa de



fluència lumínica. A la dreta de la imatge, els gràfics representen les mateixes dades anteriors però referint l'allargament dels hipocòtils en les diferents taxes de fluència a l'allargament d'aquests a la foscor. Les plàntules s'han cultivat tal i com s'indica a l'esquema superior.

### 2.3. Altres fenotips d'interès

Vam observar que les línies de sobreexpressió de PAR1 també presentaven unes arrels més curtes que les de les plantes silvestres. Vam cultivar plantes silvestres Col-0, dues línies de sobreexpressió de *PAR1* ( $P_{35S}$ :PAR1-G.01 i  $P_{35S}$ :PAR1-GG.13) i una línia PAR1-RNAi (PAR1-RNAi.13) 7d en Wc en plaques verticals per quantificar aquest fenotip. Les plantes de sobreexpressió presenten unes arrels més curtes que les plantes silvestres, mentre que la línia RNAi presenta les arrels lleugerament més llargues (**figura R.49A**). Quan representàvem aquest caràcter en funció dels nivells estimats de *PAR1* a partir dels experiments de *northern-blot* (**figures R.41, R.45 i R.48**) es veu que aquests paràmetres correlacionen negativament (**figura R.49B**), el que suggereix que PAR1 és un inhibidor de l'allargament de les arrels.



**Figura R.49. Anàlisi de la llargada de les arrels de plantes de sobreexpressió de PAR1 i PAR1-RNAi.** **A**, Mesura de la llargada de les arrels de plantes silvestres (Col-0) i de sobreexpressió de *PAR1*, i silvestres i PAR1-RNAi. **B**, percentatge de l'allargament de l'arrel en les plàntules mutants *PAR1* en funció dels seus nivells d'expressió de *PAR1* (estimats). La línia indica la tendència de les mostres. En A i B les plantes han estat cultivades tal i com s'indica a l'esquema superior.

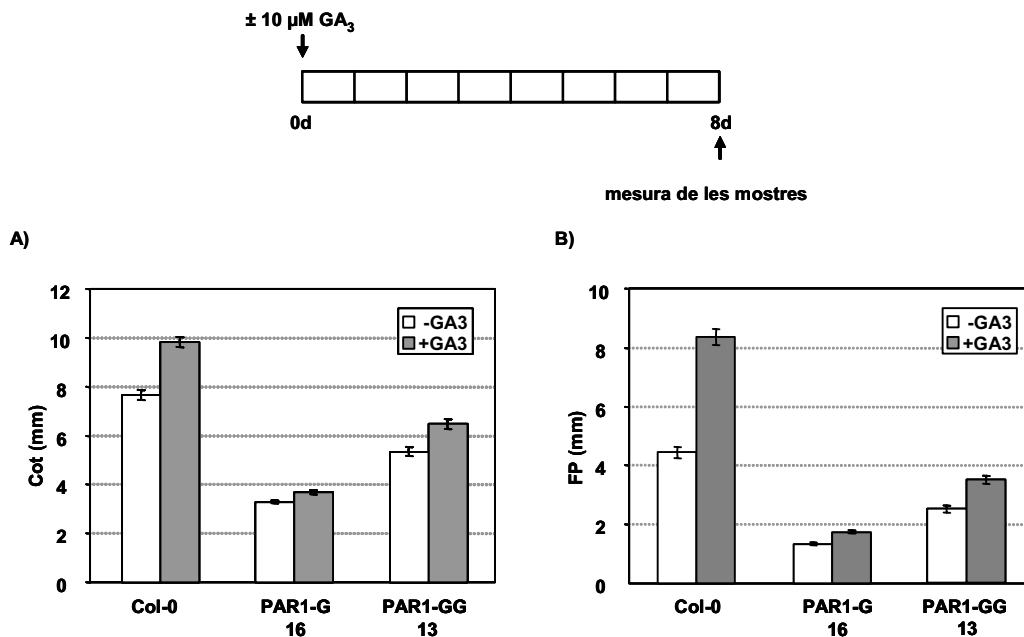
## 3. Relació de les hormones amb el fenotip de les plantes mutants *PAR1*

Les plantes mutants de sobreexpressió de *PAR1* presenten un fenotip nan que recorda al fenotip de mutants de diferents hormones. En aquest apartat es presenta un abordatge clàssic per estudiar la sensibilitat i resposta de les plantes mutants *PAR1* a

diferents hormones. Aquesta aproximació ha consistit en l'aplicació d'hormones o inhibidors de la biosíntesi d'alguna hormona a aquestes plantes i la mesura de les respostes que causen sobre els diferents òrgans de la planta: allargaments d'arrels, hipocòtil, cotilèdons i/o fulles primàries, segons està descrit en la bibliografia. En algun cas també s'ha mesurat els nivells hormonal en la planta.

### 3.1. Estudi de l'efecte de les gibberel·lines (GAs) sobre el fenotip de les plantes de sobreexpressió de *PAR1*

Degut a que el fenotip de les plantes de sobreexpressió de *PAR1* (nanisme i color verd fosc) recordava al dels mutant *gai-1d* (Peng i Harberd, 1993; Peng i col., 1997) i *ga* (Davies, 2004) (mutants de la transducció del senyal i la biosíntesi de GAs, respectivament) vam aplicar GAs sobre elles per veure si recuperaven el fenotip silvestre. Plantes silvestres i dues línies de sobreexpressió de *PAR1* ( $P_{35S}$ :*PAR1*-G.16 i  $P_{35S}$ :*PAR1*-GG.13) es van cultivar 8d en Wc en absència o presència de  $GA_3$  10  $\mu$ M, i es van mesurar la resposta d'allargament de cotilèdons i fulles primàries. A la **figura R.50** veiem com el  $GA_3$  afecta l'allargament de cotilèdons i de fulles primàries tant de les plantes silvestres com de les plantes que sobreexpressen *PAR1*, tot i que les plantes de sobreexpressió no arriben mai a recuperar el fenotip silvestre. Aquests resultats suggereixen que les línies de sobreexpressió de *PAR1* responen a GAs, malgrat que les GAs no són capaces de restaurar el fenotip silvestre en aquestes plantes. Aquest resultat descartava que la sobreexpressió de *PAR1* provocava el fenotip nan per una inhibició de la biosíntesi de GAs. Restava, per tant, esbrinar la sensibilitat a les GAs estava alterada en aquestes línies transgèniques.



**Figura R.50. Efecte de l'aplicació de  $GA_3$  sobre plantes silvestres i de sobreexpressió de *PAR1*.** **A**, llargada dels cotilèdons en plantes silvestres (Col-0) i de sobreexpressió de *PAR1*. **B**, llargada de les fulles primàries en plantes silvestres i de sobreexpressió de *PAR1*. Les plantes van ser cultivades tal i com s'indica a l'esquema superior.

### 3.2. Estudi de la sensibilitat de les plantes mutants *PAR1* a GAs

Per tal de mesurar la sensibilitat de les plantes a GAs es van dissenyar un conjunt d'experiments per estudiar el rescat de la germinació mitjançant l'aplicació de GAs després d'haver inhibit aquesta amb paclobutrazol (paclo). El paclo és un agent que bloqueja la biosíntesi de GAs a nivell de l'enzim ent-kaurè oxidasa (KO), que converteix l'ent-kaurè en àcid ent-kaurenoic (**figura R.51**).

Es va testar diferents concentracions de paclo per trobar quina era la que inhibia totalment la germinació de les llavors silvestres Col-0. Les concentracions de paclo utilitzades van ser 0,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  i  $10^{-3}$ M. A la **taula R.I** es mostra el % de llavors germinades després de 4d en Wc en les diferents concentracions de paclo. Basant-nos en aquests resultats es va establir que la concentració que inhibia completament la germinació de les llavors era  $10^{-3}$ M paclo.

**Taula R.I.** Percentatges de germinació de llavors Col-0 en presència de concentracions creixents de paclobutrazol.

[ PACLOBUTRAZOL ]	% GERMINACIÓ
0M	100
$10^{-7}$ M	100
$10^{-6}$ M	93.2
$10^{-5}$ M	22.9
$10^{-4}$ M	14.4
$10^{-3}$ M	0

A continuació vam inhibir la germinació de les llavors amb  $10^{-3}$ M paclo i analitzar el restabliment d'aquesta mitjançant l'aplicació de diferents concentracions de GA<sub>3</sub>. Les concentracions testades foren 0,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-4}$ M GA<sub>3</sub>. Aquest experiment es va realitzar tant per a plantes *PAR1*-RNAi (línies *PAR1*-RNAi.13 i 17) com de sobreexpressió de *PAR1* (P<sub>35S</sub>:*PAR1*-G.01 i P<sub>35S</sub>:*PAR1*-GG.13). A la **taula R.IIA** es mostren els resultats obtinguts per a les plantes *PAR1*-RNAi.

En aquesta taula veiem que les concentracions més altes de GA<sub>3</sub> emprades,  $10^{-5}$  i  $10^{-4}$ M, restableixen totalment la germinació, el que indica que l'acció inhibidora de paclo en la germinació es deu exclusivament al seu efecte sobre la inhibició de la biosíntesi de GAs. En les concentracions intermèdies,  $10^{-7}$ - $10^{-6}$ M, s'observa un lleuger efecte en la recuperació de la germinació en les línies *PAR1*-RNAi, que sembla ser més ràpid que en la línia silvestre. Pel que fa a les plantes de sobreexpressió (**taula R.IIB**), a la concentració  $10^{-4}$ M s'ha recuperat la germinació pràcticament al 100% en tots els casos. En les concentracions intermèdies,  $10^{-8}$ - $10^{-6}$ M però, s'observa un efecte semblant al detectat per a les línies *PAR1*-RNAi. Durant la realització d'aquests assajos s'ha observat una gran variabilitat en les xifres de germinació entre els diferents experiments i també entre diferents rèpliques dins un mateix experiment. Degut a això, juntament amb les subtils diferències trobades i considerant que la germinació és un procés afectat per molts

paràmetres, vam concloure que la sensibilitat a GAs no està alterada clarament en les línies transgèniques.

A)

CONCENTRACIÓ APLICADA		% GERMINACIÓ		
		Col-0	PAR1-RNAi.13	PAR1-RNAi.17
paclo 0M		100	100	100
paclo 10 <sup>-3</sup> M +	0M GA <sub>3</sub>	0	0.5	0
	10 <sup>-8</sup> M GA <sub>3</sub>	48	40	71.4
	10 <sup>-7</sup> M GA <sub>3</sub>	59.5	72.9	87.6
	10 <sup>-6</sup> M GA <sub>3</sub>	91.1	92.6	99
	10 <sup>-5</sup> M GA <sub>3</sub>	100	100	100
	10 <sup>-4</sup> M GA <sub>3</sub>	100	100	100

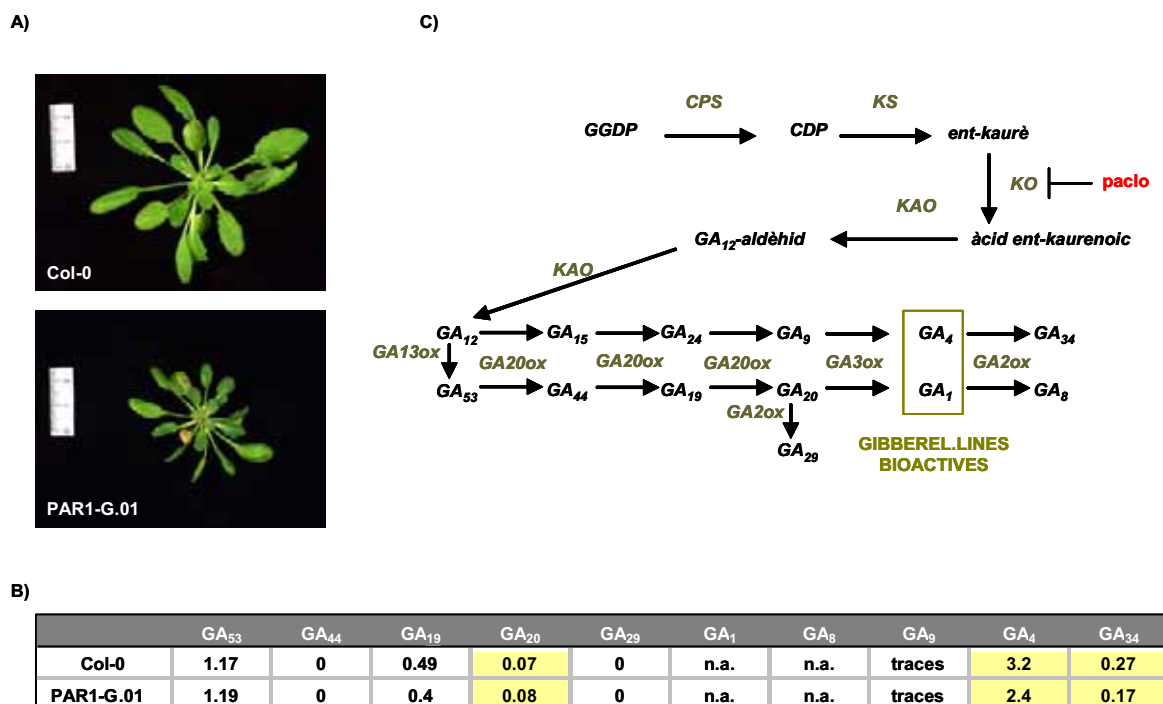
B)

CONCENTRACIÓ APLICADA		% GERMINACIÓ		
		Col-0	PAR1-GG.13	PAR1-G.01
paclo 0M		100	100	100
paclo 10 <sup>-3</sup> M +	0M GA <sub>3</sub>	0.5	0	2.5
	10 <sup>-8</sup> M GA <sub>3</sub>	2.6	3.4	22.6
	10 <sup>-7</sup> M GA <sub>3</sub>	10.5	6	25.6
	10 <sup>-6</sup> M GA <sub>3</sub>	30	46.8	51.5
	10 <sup>-5</sup> M GA <sub>3</sub>	100	90	96.6
	10 <sup>-4</sup> M GA <sub>3</sub>	100	100	99

**Taula R.II. Percentatges de germinació de llavors Col-0 i mutants *PAR1* en presència d'una concentració de paclo inhibidora i concentracions creixents de GA<sub>3</sub>.** **A**, anàlisi de les llavors silvestres (Col-0) i PAR1-RNAi. **B**, anàlisi de les llavors silvestres (Col-0) i de sobreexpressió de *PAR1*.

### 3.3. Quantificació de GAs en les plantes de sobreexpressió de *PAR1*

Mentre que els mutants nans deficients en la biosíntesi de GAs presenten nivells baixos de GAs bioactives i responen a l'aplicació exògena de GA<sub>3</sub> (per exemple, mutants *ga1* i *ga3*) (Davies, 2004), els mutants nans de la cadena de transducció del senyal presenten nivells elevats de GAs bioactives i responen poc o gens a l'aplicació de GAs exògenes (per exemple, mutant *gai-1d*) (Davies, 2004). Per tal d'aprofundir en la relació entre el fenotip nan observat i les GAs, es va quantificar els nivells de GAs endògenes de les plantes P<sub>35S</sub>:PAR1-G.01 comparant-los amb els nivells de plantes silvestres. Aquests assajos han estat realitzats en col.laboració amb el Dr. Jose Luis García Martínez de l'IBMCP (CSIC) de València. A la **figura R.51** es veu com no existeixen canvis significatius en els nivells de GA<sub>4</sub> (GA activa més important en aràbidopsis), GA<sub>34</sub> (metabòlit de la GA<sub>4</sub>) i GA<sub>20</sub> (precursor de la GA<sub>1</sub>).

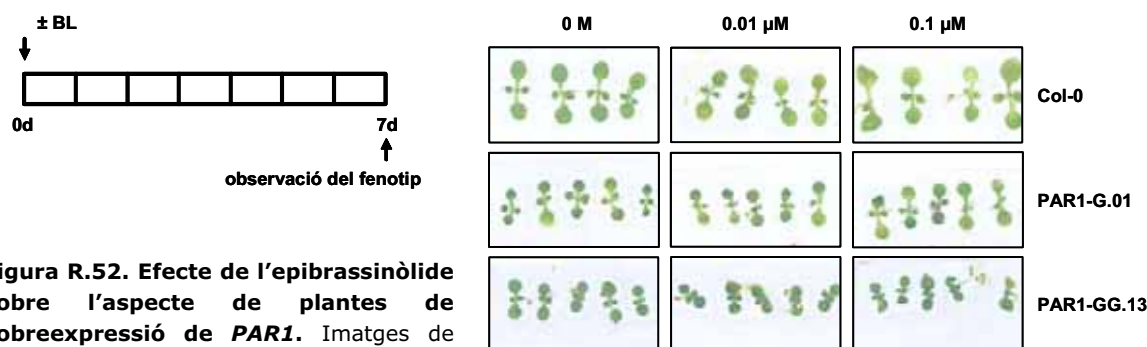


**Figura R.51. Nivells de les diferents GAs en plantes silvestres Col-0 i de sobreexpressió de PAR1.** **A**, aspecte d'una plàntula silvestre i una sobreexpressant de PAR1 utilitzades per la quantificació. **B**, valors de GAs obtinguts en la quantificació. n.a., no analitzat; traces, nivells massa baixos per a ser quantificats. Els valors que es donen corresponen a ng/g de pes fresc. **C**, esquema de la biosíntesi i degradació de GAs.

Per tant, basant-nos en què i) l'aplicació de GA<sub>3</sub> no reverteix el fenotip de les plantes de sobreexpressió de PAR1 (**figura R.50**), ii) la sensibilitat a GA<sub>3</sub> no sembla estar clarament afectada en els assajos de germinació (**taula R.2**), i iii) els nivells de GAs endògenes no estan afectats en les plantes de sobreexpressió de PAR1 (**figura R.51**), concloem que les GAs, almenys per sí soles, no són hormones responsables del fenotip de les plantes mutants PAR1.

### 3.4. Estudi de l'efecte dels brassinosteroides (BRs) sobre el fenotip de les plantes de sobreexpressió de PAR1

Els mutants de la transducció del senyal (*bri*) (Davies, 2004) i de la biosíntesi (*det2*) (Davies, 2004) de BRs presenten un fenotip en llum semblant al de les plantes de sobreexpressió de PAR1 (apartats 2.1.4 i 2.2.4 d'aquest capítol). Vam fer un tractament amb BRs sobre plantes silvestres i de sobreexpressió de PAR1 per veure si aquesta hormona és capaç de restaurar el fenotip silvestre en aquestes plantes. Llavors de plantes de les línies P<sub>35S</sub>:PAR1-G.01 i P<sub>35S</sub>:PAR1-GG.13 es van sembrar en diferents concentracions d'epibrassinòlide (BL) (0, 0.01 i 0.1 μM) cultivant-les 7d en Wc, després dels quals es va observar el seu fenotip (**figura R.52**).

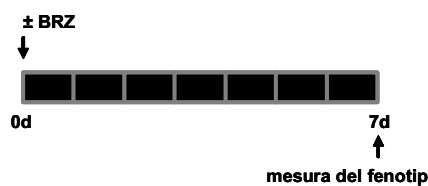


**Figura R.52. Efecte de l'epibrassinòlide sobre l'aspecte de plantes de sobreexpressió de *PAR1*.** Imatges de plantes silvestres (Col-0), PAR1-G i PAR1-GG cultivades en presència de diferents concentracions de BL tal i com s'indica a l'esquema annex.

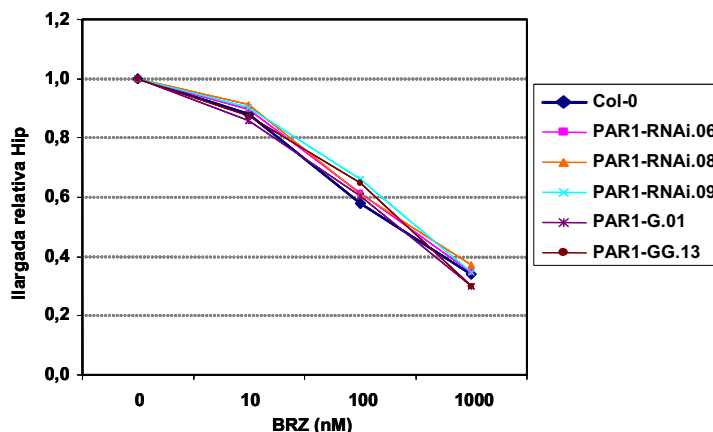
El BL va provocar engrogiment de les plàntules i epinàstia dels cotilèdons en totes les línies analitzades. S'observa com les línies de sobreexpressió de *PAR1* al cultivar-les en les dues concentracions de BL continuen mostrant el mateix fenotip nan que quan creixen en absència d'aquest agent. Per tant, la incapacitat del BL de restaurar el fenotip silvestre en les línies de sobreexpressió de *PAR1* suggereix que el fenotip nan no és degut a una manca d'aquestes hormones.

També es va estudiar l'efecte del brassinazol (BRZ), un inhibidor de la biosíntesi de BR, sobre l'allargament de l'hipocòtil en fosc de les plantes de sobreexpressió de *PAR1* i *PAR1*-RNAi. S'ha descrit que plantes mutants en components de la senyalització dels BRs, com *bri1*, *bes1* o *bim1*, presenten una sensibilitat alterada al BRZ (Yin i col., 2002; 2005). Llavors de plantes silvestres i de les línies  $P_{35S}:PAR1-G.01$ ,  $P_{35S}:PAR1-GG.13$  i *PAR1*-RNAi.06, 07 i 08 es van sembrar en diferents concentracions de BRZ (0, 10, 100 i 1000 nM). Es va induir la germinació amb un pols de 3h de W i es van cultivar 7d en fosc (D). A la **figura R.53** es mostra com, al posar les mesures de l'allargament de l'hipocòtil en relació a la llargada d'aquest en absència de BRZ, tant les línies de sobreexpressió de *PAR1* com les *PAR1*-RNAi són lleugerament més llargues que les silvestres.

Aquests resultats no permeten correlacionar els nivells d'expressió de *PAR1* amb una major o menor sensibilitat a BRZ. Aquest experiment junt amb l'anterior suggereix que els BRs, almenys per si sols, no són les hormones responsables del fenotip de les plantes mutants de *PAR1*.

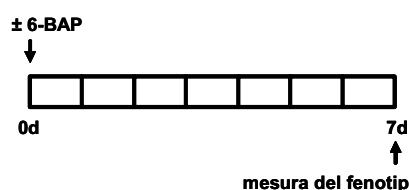


**Figura R.53 Efecte del brassinazol sobre l'allargament de l'hipocòtil de plantes mutants *PAR1*.** Allargament relatiu de l'hipocòtil de plantes silvestres (Col-0), PAR1-RNAi, PAR1-G i PAR1-GG cultivades en presència de diferents concentracions de BRZ tal i com s'indica a l'esquema annex.

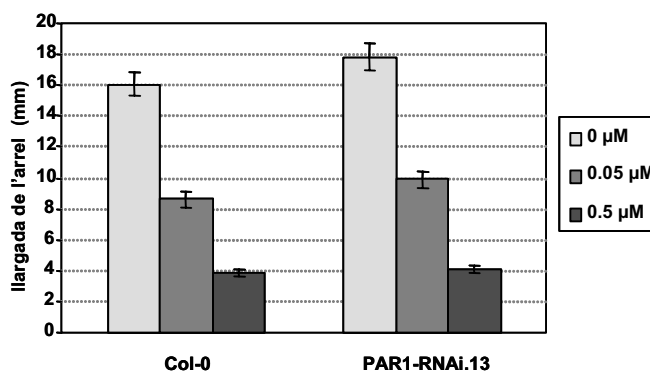


### 3.5. Estudi de l'efecte de les citoquinines (CKs) sobre el fenotip de les plantes mutants *PAR1*

Les CKs són hormones implicades en la divisió cel·lular, l'expansió foliar, i el desenvolupament dels cloroplasts (l'aplicació de CKs causa l'acumulació de clorofil·la i promou la conversió dels etioplasts en cloroplasts) (Davies, 2004). Per analitzar la relació entre aquestes hormones i l'acció de PAR1, plantes silvestres i de la línia PAR1-RNAi.13 es van cultivar 7d en Wc en presència de 6-BAP 0, 0.05, 0.5 o 5  $\mu$ M. L'anàlisi de la llargada de les arrels en aquestes plantes mostra, tal i com es veu en la **figura R.54**, que no hi havia diferències significatives en la llargada de les arrels PAR1-RNAi respecte a les silvestres en cap de les concentracions testades. La concentració 6-BAP 5  $\mu$ M inhibia tant el creixement de les arrels que la llargada d'aquestes resultava molt difícil de mesurar, per això no es mostren al gràfic. Aquests resultats suggereixen que les CKs no són les hormones responsables del fenotip de les plantes mutants *PAR1*.



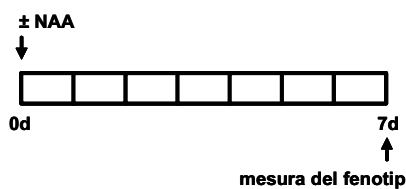
**Figura R.54. Efecte del 6-BAP sobre la llargada de les arrels de plantes PAR1-RNAi.** Mesura de la llargada de les arrels de plantes silvestres (Col-0) i PAR1-RNAi cultivades en presència de diferents concentracions de 6-BAP tal i com s'indica a l'esquema annex.



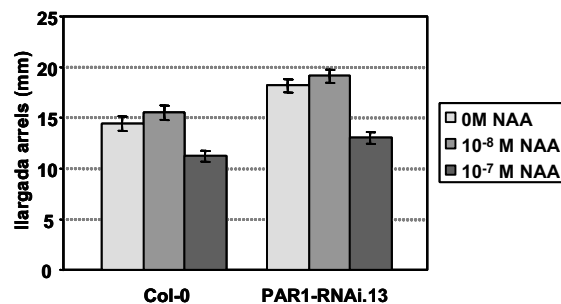
### 3.6. Estudi de l'efecte de les auxines sobre el fenotip de les plantes mutants *PAR1*

Les auxines són hormones que indueixen l'allargament i divisió cel·lular, i la dominància apical de la planta. Quant a les arrels, concentracions baixes d'auxines promouen el seu creixement, mentre que concentracions altes l'inhibeixen (Davies 2004). Vam cultivar plantes silvestres i *PAR1*-RNAi.13 7d en presència de diferents concentracions de NAA ( $0$ ,  $10^{-8}$  i  $10^{-7}$  M), mesurant la resposta de l'allargament de l'arrel. En la **figura R.55** s'observa com les plàntules *PAR1*-RNAi semblen respondre a l'aplicació de NAA  $10^{-8}$  i  $10^{-7}$  M de la mateixa manera que ho fan les plantes silvestres.

D'aquests experiments concloem que no hi ha un efecte clar de les auxines sobre el fenotip de les plantes mutants *PAR1*.



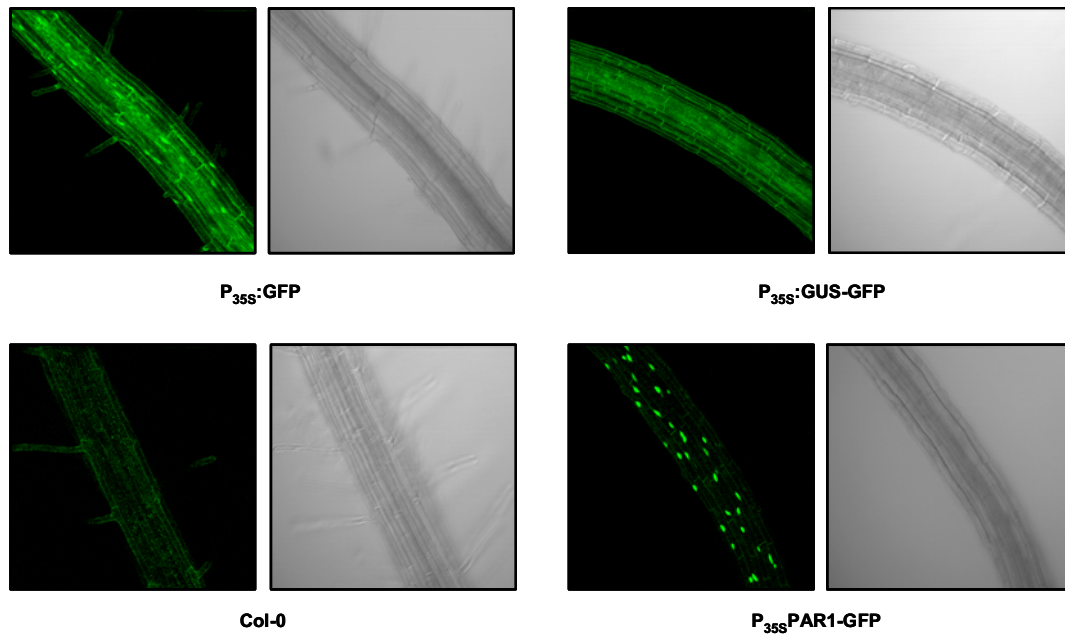
**Figura R.55. Efecte del NAA sobre la llargada de les arrels de plantes *PAR1*-RNAi.** Mesura de la llargada de les arrels de plantes silvestres (*Col-0*) i *PAR1*-RNAi cultivades en presència de diferents concentracions de NAA tal i com s'indica a l'esquema annex.



## 4. Estudi de la localització subcel·lular de *PAR1*

Diferents bases de dades van predir diferents localitzacions subcel·lulars per *PAR1* (cloroplàstica, mitocondrial, citoplasmàtica, etc.). No obstant, degut a que *PAR1* presentava similitud de seqüència amb membres de la família bHLH de factors de transcripció, la nostra hipòtesi era que aquest factor podria estar regulant la transcripció gènica. Vam utilitzar les línies de sobreexpressió que havíem generat on *PAR1* està fusionat al gen reporter GFP per estudiar la localització subcel·lular d'aquestes proteïnes de fusió en arrels de plantes  $P_{35S}:PAR1-G$  que presentaven fenotip nan (indicatiu de que els transgens s'estaven expressant). Com a control es van utilitzar plantes  $P_{35S}:GFP$  i  $P_{35S}:GUS-GFP$  (**figura R.56**).





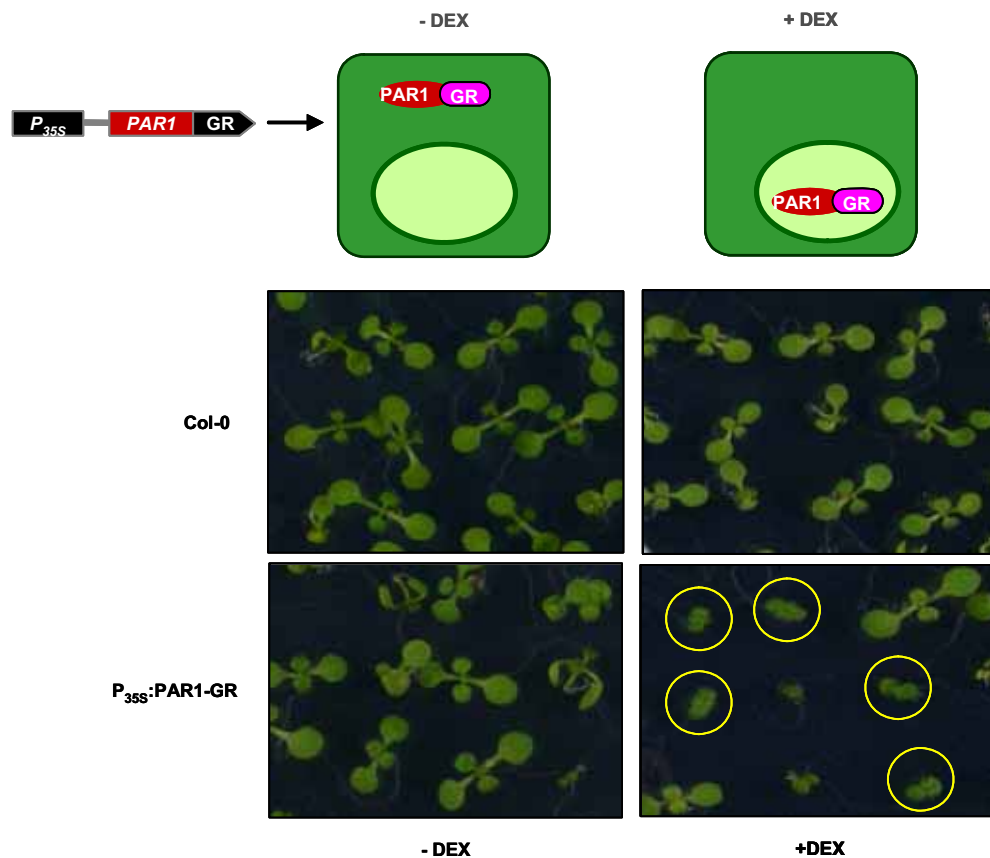
**Figura R.56. Localització subcel·lular de la proteïna PAR1.** Imatges al microscopi confocal de fluorescència GFP (esquerra de cada parella) i de camp clar (dreta) de les arrels de les línies P<sub>35S</sub>:GFP, P<sub>35S</sub>:GUS-GFP, Col-0 i P<sub>35S</sub>:PAR1-G. Totes les imatges es mostren al mateix augment.

Com s'esperava, en les plantes control P<sub>35S</sub>:GFP es detectava localització citoplasmàtica i nuclear de la proteïna GFP, mentre que en les plantes P<sub>35S</sub>:GUS-GFP la fusió GUS-GFP (de major mida que la GFP sola) no podia difondre al nucli i el marcatge GFP només es detectava al citoplasma. En les plantes P<sub>35S</sub>:PAR1-G l'activitat GFP es detectava majoritàriament al nucli de les cèl·lules, indicant que la localització de PAR1 és principalment nuclear.

#### 4.1. Anàlisi de la funcionalitat de PAR1 dependent de la seva localització subcel·lular

Els estudis de localització subcel·lular de la proteïna de fusió PAR1-GFP mostraven la presència de baixa activitat GFP al citoplasma cel·lular. per tant, vam estudiar si aquesta localització nuclear de PAR1 era necessària per la seva funció en la planta. Per això vam generar plantes transgèniques que sobreexpressaven *PAR1* fusionat al receptor de glucocorticoides (GR). Aquest tipus de fusions al GR es caracteritzen perquè en absència del glucocorticoide sintètic dexametasona (DEX), la proteïna fusionada al GR queda retinguda al citoplasma, i al aplicar DEX 5 µM la proteïna de fusió va a la seva localització normal (en el cas de PAR1, al nucli). En absència de DEX, la majoria de plàntules transgèniques P<sub>35S</sub>:PAR1-GR tenien l'aspecte de plàntules silvestres (**figura R.57, esquerra**), el que suggereix que la localització citoplasmàtica de PAR1-GR no té cap efecte detectable macroscòpicament en el desenvolupament de la planta o l'acumulació de pigments. Algunes de les línies presentaven un fenotip lleugerament més petit que les silvestres, que podria venir donat per l'existència de certa quantitat de PAR1

al nucli. Al tractar amb DEX, aquesta provoca un clar fenotip nan en les línies P<sub>35S</sub>:PAR1-GR i no en les plantes silvestres (**figura R.57, dreta**). A la figura no totes les plàntules P<sub>35S</sub>:PAR1-GR cultivades en presència de DEX presentaven fenotip verd fosc i nan perquè es tractava de plàntules T2 segregants per la presència del transgen.



**Figura R.57. Fenotip de les plàntules P<sub>35S</sub>:PAR1-GR.** Aspecte de plantes silvestres (Col-0) i P<sub>35S</sub>:PAR1-GR segregants germinades i cultivades 7d en Wc en absència (-DEX) o presència (+DEX) de DEX 5 μM.

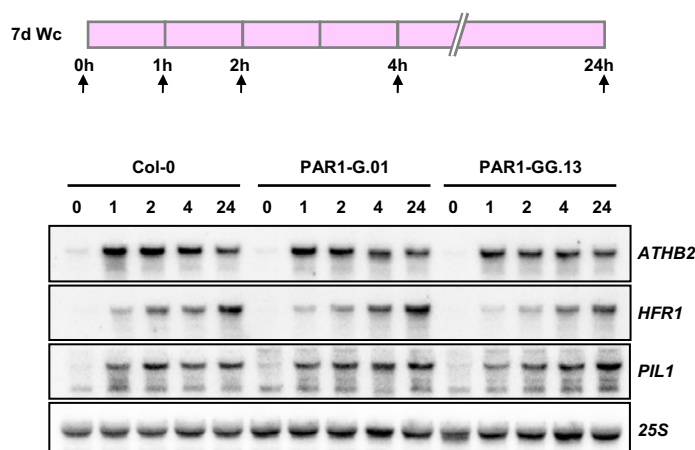
Aquests resultats demostren que PAR1 es actiu només quan es localitza al nucli. Això, junt amb el fet que PAR1 tingui relativa similitud a factors de transcripció del tipus bHLH suggereix que PAR1 podria ser un factor de transcripció amb un determinat paper en la regulació transcripcional.

## Capítol VI. Identificació i caracterització de gens regulats per PAR1

### 1. Efecte de PAR1 sobre l'expressió d'altres gens regulats pels fitocroms

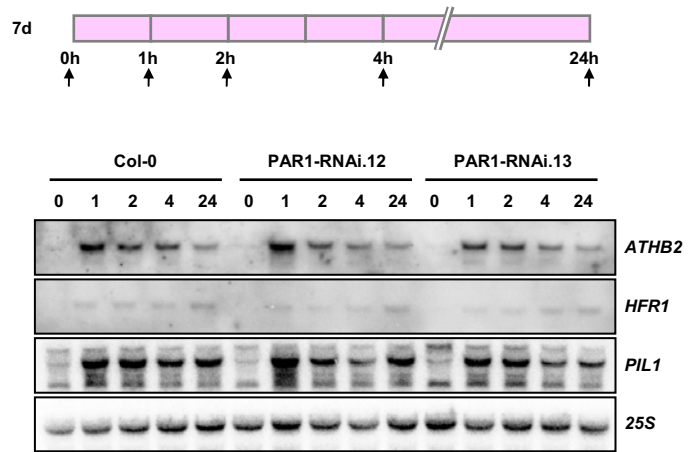
Com hem mostrat al capítol III, el phyB va ser identificat com un dels *PAR* diana primari de l'acció dels fitocroms durant la SAS (**figura R.24**). A més, és un dels receptors que capta la raó R:FR que posteriorment provocarà canvis en l'expressió dels gens *PAR*, de manera que es tracta d'un *PAR* que està regulant l'expressió d'altres *PARs*. *HFR1*, un altre gen *PAR* durant la SAS, s'ha descrit com un regulador negatiu de la SAS que afecta l'expressió fotoregulada d'altres *PARs* (*ATHB2*, *PAR1* i *PIL1*), com a mínim sota condicions en què tant la qualitat com la quantitat de llum estava alterada (Sessa i col., 2005). En aquest treball *PAR1* ha estat identificat com un regulador negatiu de la SAS. Per tant, ens vam plantejar si també afectava l'expressió fotoregulada dels altres gens *PAR*. Per adreçar aquesta qüestió vam estudiar el possible efecte de *PAR1* en la regulació de l'expressió d'algun dels altres *PARs* directes, com ara *ATHB2*, *PIL1* i també la de *HFR1*. L'expressió d'aquests tres *PARs* es va analitzar en diferents línies de sobreexpressió de *PAR1* (*PAR1-G.01*, *PAR1-GG.13*) i *PAR1-RNAi* (*PAR1-RNAi.12* i *PAR1-RNAi.13*; la línia 12 no està silenciada, per tant s'esperava que es comportés com la línia silvestre), sotmeses a un tractament d'ombra simulada de 1, 2, 4h i 24h.

Com es pot veure en la **figura R.58**, l'expressió d'*ATHB2*, *HFR1* i *PIL1* no varia significativament en les plantes de sobreexpressió de *PAR1* respecte a les plantes silvestres, i tampoc ho fa en les plantes *PAR1-RNAi* (**figura R.59**).



**Figura R.58. Efecte d'alts nivells de PAR1 sobre la inducció de l'expressió dels PAR per l'ombra simulada.** Anàlisi *northern-blot* de l'expressió d'*ATHB2*, *HFR1* i *PIL1* en plàntules silvestres (Col-0), *PAR1-G* i *PAR1-GG* cultivades tal i com s'indica a l'esquema superior. Com a control de càrrega es mostra la hibridació amb la sonda constitutiva 25S.

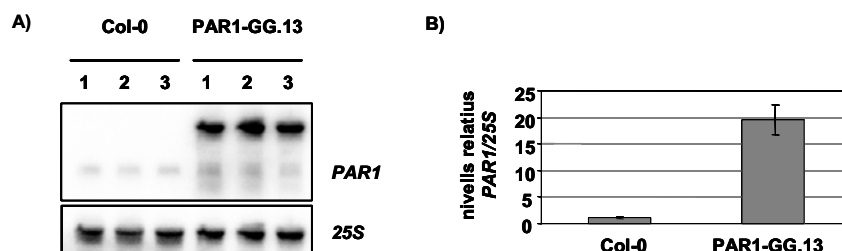
**Figura R.59. Efecte de baixos nivells de PAR1 sobre la inducció de l'expressió dels PAR per l'ombra simulada.** Anàlisi *northern-blot* de l'expressió d'*ATHB2*, *HFR1* i *PIL1* en plàntules silvestres (Col-0) i PAR1-RNAi cultivades tal i com s'indica a l'esquema superior. Com a control de càrrega es mostra la hibridació amb la sonda constitutiva 25S.



Aquests resultats suggereixen que PAR1 no sembla tenir cap efecte obvi sobre l'expressió d'*ATHB2*, *HFR1* i *PIL1*, com a mínim sota les condicions inductores de la SAS emprades per nosaltres. No obstant, anàlisis semblants amb línies de sobreexpressió de *PAR1* i *PAR2* amb fenotips més acusats varen mostrar un efecte subtil (Dr. J. Bou, comunicació personal).

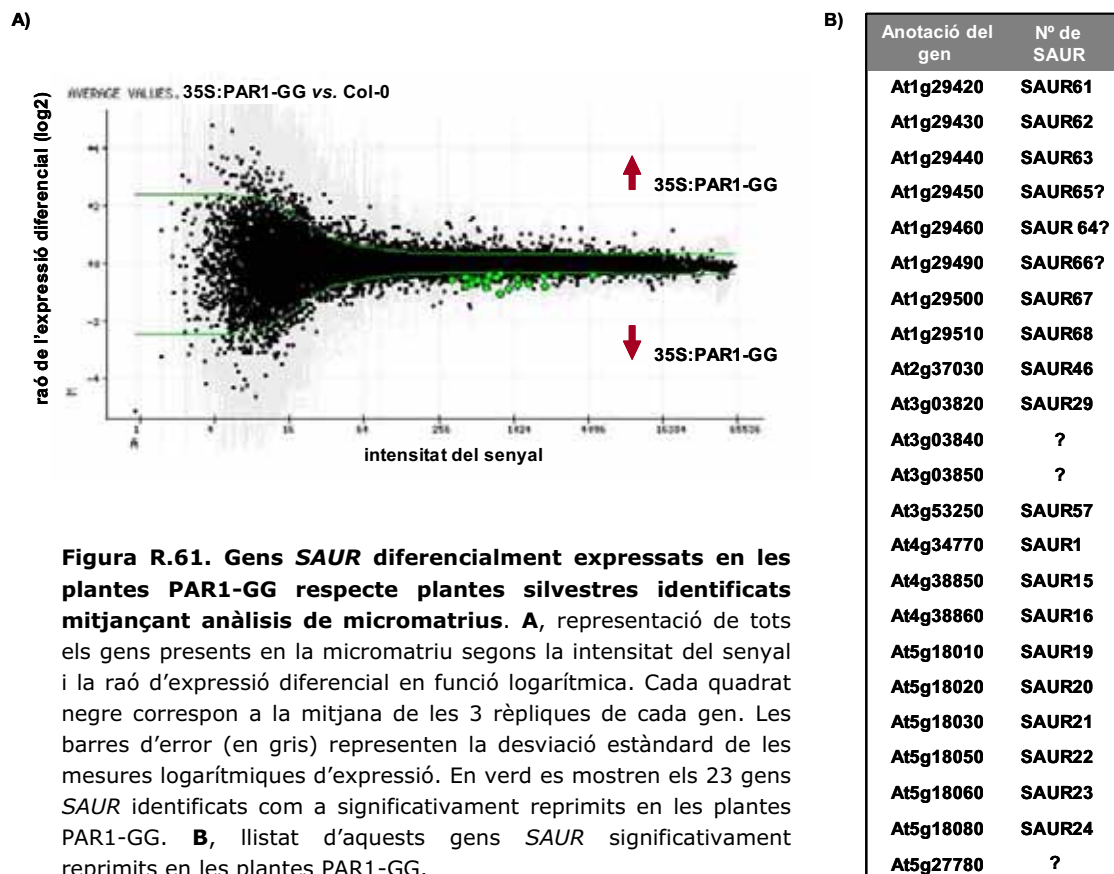
## 2. Identificació de gens regulats per PAR1 mitjançant la tècnica de les micromatrius de RNA

Com a estratègia de gran abast per identificar gens regulats per *PAR1* es va realitzar una anàlisi transcriptòmica de micromatrius de RNA en col·laboració amb el Servei de Transcriptòmica del Projecte GEFA del CNB de Madrid. L'experiment va consistir en comparar el transcriptoma de plantes silvestres Col-0 i plantes de sobreexpressió de *PAR1* (PAR1-GG.13) cultivades 7d en Wc. El xip o micromatriu empleat va ser el d'encebadors 70 mer de Qiagen-Operon d'arabidopsis, que conté 26000 encebadors. Les plantes PAR1-GG.13 presentaven un fenotip nan i verd fosc indicatiu de que la sobreexpressió de *PAR1* estava tenint lloc. No obstant, com a control previ vam analitzar els nivells de *PAR1* en les mostres de RNA d'aquestes plantes que s'utilitzarien per hibridar les micromatrius. Com es mostra a la **figura R.60**, la línia PAR1-GG.13 expressa *PAR1* en uns nivells aproximadament 20 cops més alts que la línia silvestre.



**Figura R.60. Nivells d'expressió de PAR1 en les dues mostres comparades en l'anàlisi transcriptòmica.** **A**, Anàlisi *northern-blot* de l'expressió de *PAR1* en les tres rèpliques de plantes silvestres (Col-0) i les tres rèpliques de plantes PAR1-GG cultivades 7d en Wc. **B**, representació de la mitjana dels nivells relatius d'expressió de les rèpliques mostrades en A, considerant l'expressió de *PAR1* en les plantes Col-0 com a 1. Les barres d'error indiquen l'error estàndard de les mitjanes.

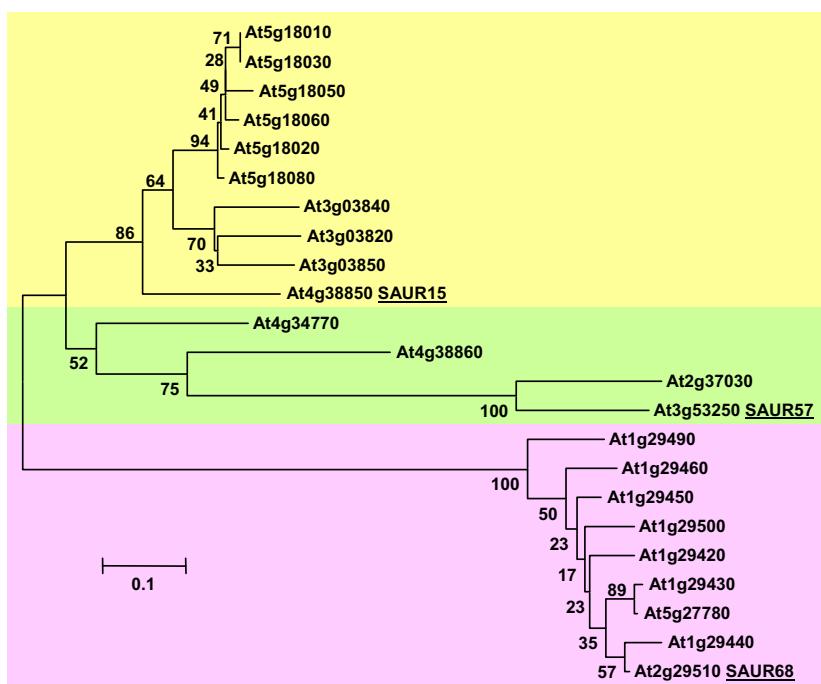
Quant als resultats de les anàlisis de les micromatrius, cal citar que aquestes no van identificar gens amb nivells d'inducció o repressió gènica gaire alts. Per exemple, l'expressió de *PAR1* segons les dades de la micromatriu es trobava 2.05 cops induïda en la línia PAR1-GG respecte la silvestre. Aquest valor dista molt dels nivells d'expressió de *PAR1* de les mateixes mostres obtinguts al analitzar-les per *northern-blot* (aproximadament 20 cops, **figura R.60**). Tot i això, cal destacar un conjunt de 23 gens que es trobaven significativament reprimits en les plantes de sobreexpressió de *PAR1*: els gens *SAUR* (de *Small Auxin Up-RNAs*) (**figura R.61**). Els *SAURs* són gens molt petits (d'entre 250 i 300 pb), sense introns, identificats inicialment per la seva ràpida inducció per auxines (Gil i Green 1996; Goda i col., 2002; Tian i col., 2002; Goda i col., 2004). El nostre interès immediat va ser estudiar la regulació d'aquests gens *SAUR* per *PAR1* i la seva possible relació amb el fenotip que mostren les plantes mutants *PAR1*.



## 2.1. Estudi de la expressió dels gens *SAUR* en les línies mutants *PAR1* i en resposta a l'ombra simulada

Per validar les dades de l'anàlisi de micromatrius, vam analitzar per *northern-blot* l'expressió dels *SAURs* en les plantes de sobreexpressió de *PAR1*. Els gens *SAUR* es troben en múltiples còpies al llarg del genoma, sovint en tàndem (Hagen i Guilfoyle, 2002). Vàrem classificar els 23 gens *SAUR* en tres grups, basant-nos en la similitud de les seves

seqüències (**figura R.62**), i vam clonar un gen representant de cadascun dels grups: *SAUR15*, també anomenat *SAUR-AC1* (Gil i col., 1994), *SAUR57* i *SAUR68* mitjançant PCR directa sobre DNA genòmic de plantes Col-0, ja que es tractava de gens sense introns.

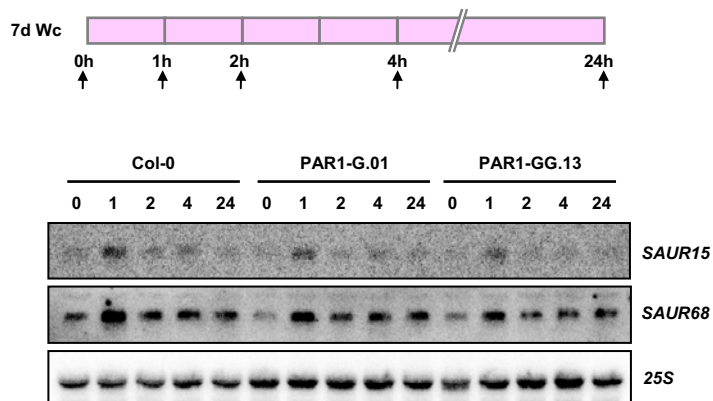


**Figura R.62.** Arbre filogenètic generat pel mètode *Neighbor Joining* dels 23 gens *SAUR* diferencialment expressats en les plantes *PAR1-GG*. La llargada de les branques és proporcional a la divergència de les seqüències, essent la distància que s'indica com a 0.1 equivalent a 0.1 substitucions per aminoàcid. Als nusos de l'arbre s'indiquen els valors de *bootstrap* obtinguts amb 1000 rèpliques. En diferents colors es mostren els 3 grups en els que els hem classificat. Junt a l'anotació dels gens es mostren, subratllats, els noms dels *SAURs* que hem seleccionat com a representants de cada grup.

Vam cultivar plantes silvestres i de sobreexpressió de *PAR1* (*PAR1-G.01*, *PAR1-GG.13*) 7d en *Wc* sotmetent-les a un tractament d'ombra simulada i analitzant l'expressió de *SAUR15*, *SAUR57* i *SAUR68* a 0, 1, 2, 4 i 24h després del tractament. S'observà que tant l'expressió de *SAUR15* com de *SAUR68* es detectava per aquest tipus d'anàlisi (**figura R.63**). Es va descartar l'estudi de *SAUR57* en posteriors anàlisis ja que la seva expressió no era detectable per *northern-blot*. En aquests experiments s'observà que l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68* estava induïda transitòriament per ombra simulada (**figura R.63**). Existia un pic d'expressió a 1h del tractament d'ombra simulada, i una posterior caiguda ja evident a les 2h de tractament. Aquests resultats indiquen que *SAUR15* i *SAUR68* també són gens *PAR*. A més, les línies de sobreexpressió de *PAR1* mostren una lleugera reducció de l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68* (**figura R.63**), mentre que no es detecta cap efecte en les línies *PAR1-RNAi* analitzades (dades no mostrades). Experiments similars realitzats en el nostre laboratori amb línies de sobreexpressió de *PAR1* amb un fenotip més fort mostraven que l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68* en les línies de sobreexpressió de *PAR1* estava reprimida respecte a les plantes silvestres. No

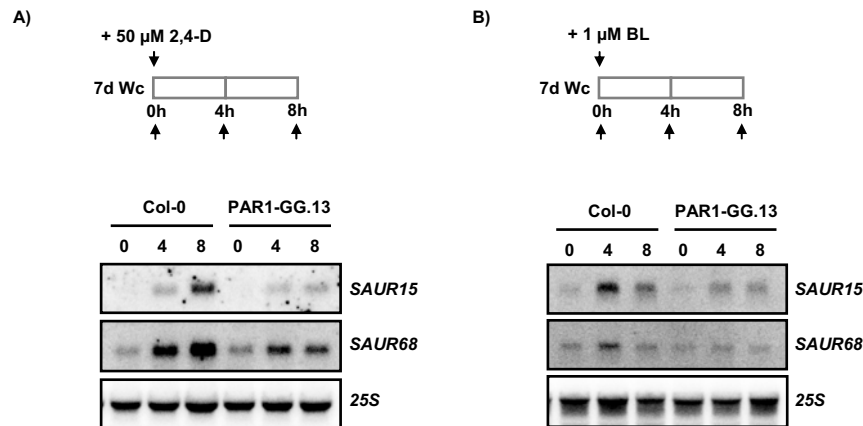
obstant, els baixos nivells d'expressió detectats per aquests dos gens *SAUR* dificultaven la validació de les dades de les micromatrius.

**Figura R.63. Efecte d'alts nivells de PAR1 sobre l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68* en un tractament d'ombra simulada.** Anàlisi *northern-blot* de l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68* en plàntules silvestres (Col-0), PAR1-G i PAR1-GG cultivades tal i com s'indica a l'esquema superior. Com a control de càrrega es mostra la hibridació amb la sonda constitutiva 25S.



## 2.2. Efecte de PAR1 sobre la regulació per hormones de *SAUR15* i *SAUR68*

Vam aprofundir en l'estudi de l'efecte de PAR1 sobre l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68*, realitzant un tractament amb auxines i analitzant la inducció de l'expressió dels *SAUR15* i 68 mitjançant *northern-blot*. Es va aplicar l'auxina sintètica 2,4-D a una concentració de 50  $\mu$ M, quantitat descrita com clarament inductora de canvis en l'expressió gènica (Goda i col., 2004; Zimmerman i col., 2004). A la **figura R.64A** es mostra l'efecte del tractament de 2,4-D realitzat en l'expressió dels dos *SAURs* estudiats en plantes silvestres i de la línia PAR1-GG.13. Tal i com era d'esperar, l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68* s'incrementa fortament en resposta al tractament amb 2,4-D aplicat. En les línies de sobreexpressió PAR1-GG la inducció de l'expressió d'aquests *SAURs* per 2,4-D està clarament atenuada respecte a l'observada en les plantes silvestres. Aquests resultats indiquen que PAR1 està reprimint la inducció per auxines de l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68*.

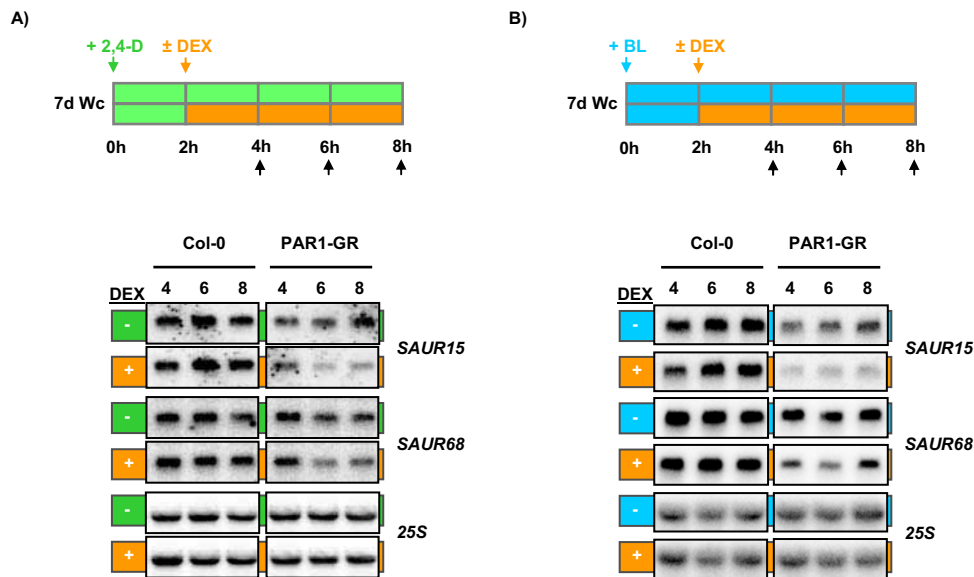


**Figura R.64. Efecte d'alts nivells de PAR1 sobre la resposta a 2,4-D i BL de l'expressió dels gens SAUR15 i SAUR68.** **A**, anàlisi *northern-blot* de l'expressió dels dos SAURs en plantes silvestres (Col-0) i PAR1-GG tractades amb 2,4-D i cultivades tal i com s'indica a l'esquema superior. **B**, anàlisi *northern-blot* de l'expressió dels dos SAURs en plantes silvestres (Col-0) i PAR1-GG tractades amb BL i cultivades tal i com s'indica a l'esquema superior. En A i B com a control de càrrega es mostra la hibridació amb la sonda constitutiva 25S.

Estudis previs (Sawa i col., 2002; Goda i col., 2004; Zimmerman i col., 2004) suggerien que l'expressió de SAUR15 i SAUR68 també estava induïda per l'aplicació exògena de BL, pel que es va realitzar el mateix tipus d'experiment al descrit amb 2,4-D utilitzant aquesta hormona. A la **figura R.64B** es mostra l'efecte del tractament de BL 1 µM realitzat i l'expressió dels dos SAURs estudiats en plantes silvestres, i en la línia de sobreexpressió PAR1-GG.13. Tal com s'havia descrit, el BL indueix l'expressió de SAUR15 i SAUR68 en les plantes silvestres, inducció més suau que l'observada per l'aplicació de 2,4-D (**figura R.64A**). En les línies de sobreexpressió de PAR1 la inducció de l'expressió dels SAURs per BL és menor que en les plantes silvestres, el que indica que PAR1 està reprimint la inducció per BRs de l'expressió de SAUR15 i SAUR68. Aquestes dades, per tant, són consistents amb els resultats obtinguts en els experiments de micromatrius.

Per estudiar si la repressió per PAR1 de l'expressió dels SAURs induïda per aquestes hormones és un efecte primerenc o no, vam utilitzar les línies P<sub>35S</sub>:PAR1-GR (descrites a l'apartat 4.1 del capítol V), juntament amb una línia silvestre. Pel que fa a auxines, l'experiment va consistir en aplicar 2,4-D 50 µM per induir l'expressió de SAUR15 i SAUR68, i 2h després aplicar o no (±)DEX 5 µM, que provocarà la translocació de PAR1 al nucli. Es van recollir mostres 4, 6 i 8h després de l'aplicació de 2,4-D, per analitzar l'efecte de la presència de PAR1 al nucli cel·lular sobre l'expressió de SAUR15 i SAUR68. A la **figura R.65A** veiem com, en absència de DEX (-DEX), SAUR15 s'està expressant en nivells detectables i mantinguts en les plantes silvestres i P<sub>35S</sub>:PAR1-GR. En presència de DEX (+DEX), les plantes silvestres mostren nivells similars d'expressió de SAUR15 que les plantes Col-0 sense tractar. En canvi, les plantes P<sub>35S</sub>:PAR1-GR tractades +DEX mostren una repressió de l'expressió de SAUR15 a partir de les 6h de l'aplicació de 2,4-D (4h després de l'aplicació +DEX) respecte a les plantes P<sub>35S</sub>:PAR1-GR sense tractar.





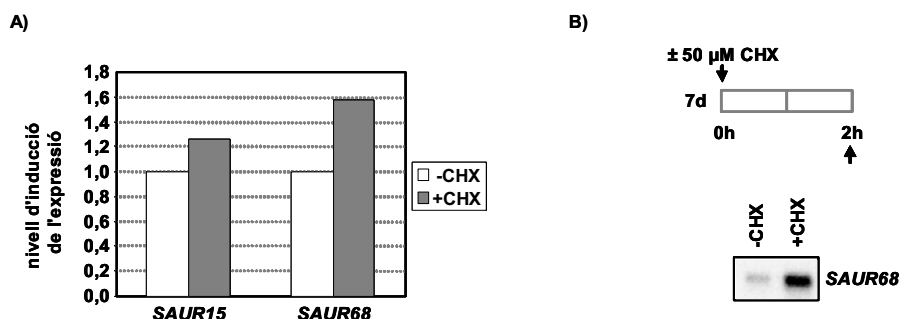
**Figura R.65. Expressió dels gens *SAUR15* i *SAUR68* en resposta a les 2,4-D i BL en les línies de sobreexpressió de PAR1 induïbles per DEX.** **A**, anàlisi *northern-blot* de l'expressió dels dos *SAURs* en plantes silvestres (Col-0) i PAR1-GR tractades amb 2,4-D i cultivades tal i com s'indica a l'esquema superior. **B**, anàlisi *northern-blot* de l'expressió dels dos *SAURs* en plantes silvestres (Col-0) i PAR1-GR tractades amb BL i cultivades tal i com s'indica a l'esquema superior. En A i B com a control de càrrega es mostra la hibridació amb la sonda constitutiva 25S.

Es van obtenir resultats similars al estudiar l'expressió de *SAUR68* (**figura R.65A**). Aquests resultats ens indiquen que l'efecte repressor que exerceix PAR1 sobre l'expressió d'aquests *SAURs* induïda per 2,4-D és un efecte ràpid (ocorre en menys de 4h), podent-se tractar d'un efecte directe.

Quant als BRs, vam fer un experiment semblant al que havíem fet per al 2,4-D, aplicant BL 1  $\mu$ M. A la **figura R.65B** veiem com, en -DEX, *SAUR15* s'expressa en nivells detectables i mantinguts en les plantes silvestres i  $P_{35S}$ :PAR1-GR. En +DEX, les plantes Col-0 mostren nivells similars d'expressió de *SAUR15* que les plantes Col-0 sense tractar. En canvi, les plantes  $P_{35S}$ :PAR1-GR mostren una repressió de l'expressió de *SAUR15* a les 4h de l'aplicació de BL (2h després de l'aplicació +DEX). Resultats similars es van obtenir al estudiar l'expressió de *SAUR68* (**figura R.65B**). Aquests resultats ens indiquen que l'efecte repressor que exerceix PAR1 sobre l'expressió d'aquests *SAURs* induïda per BL és un efecte ràpid, (ocorre en menys de 2h) fins i tot més ràpid que amb 2,4-D, podent-se tractar també d'un efecte directe.

Ens vam plantejar la utilització de CHX, un inhibidor de la síntesi de proteïnes, per tal d'esbrinar si l'acció primària de PAR1 sobre l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68* (**figura R.65**) és directa. Vam trobar però, que no podem discernir fàcilment si *SAUR15* i *SAUR68* són gens *PAR* diana primaris o secundaris de l'acció dels fitocroms durant la SAS ja que s'ha descrit que aquests gens, com d'altres gens l'expressió dels quals s'indueix per auxines, estan induïts per CHX, agent que utilitzem per fer aquests estudis (dades

obtingudes *in silico* utilitzant el programa Genevestigator®). A la **figura R.66** es mostren aquestes dades així com la comprovació per *northern-blot* que efectivament l'expressió de *SAUR68* està induïda per CHX. Vist aquest resultat, la inducció de *SAUR15* per CHX ja no es va comprovar per *northern-blot*.



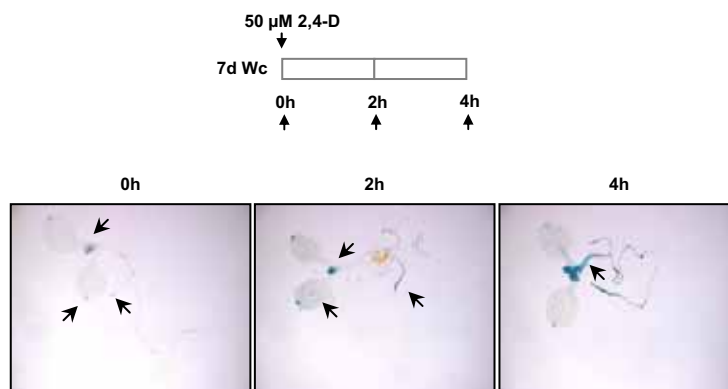
**Figura R.66. Efecte de la CHX en l'expressió de SAUR15 i SAUR68.** **A**, expressió del gens *SAUR15* i *SAUR68* en resposta a la CHX segons les dades *in silico* del programa Genevestigator®. **B**, anàlisi *northern-blot* de l'expressió de *SAUR68* en plantes silvestres (Col-0) tractades amb ± CHX i cultivades tal i com s'indica a l'esquema superior.

### 3. Estudi de la relació hormones-SAS

Com que *PAR1*, gen diana primari dels fitocroms durant la transducció del senyal lumínic en la SAS, es troba regulant l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68*, elements de la senyalització per hormones (auxines i BRs), vam pensar que aquest podria ser un punt de connexió entre els efectes de la SAS i aquestes rutes hormonals. Per estudiar la possible implicació de les hormones auxines en la resposta de la planta a l'ombra simulada ens vam servir de la línia DR5:GUS. Aquesta línia, descrita per Ulmasov i col. (1997), presenta l'element sintètic DR5 que respon a auxines repetit set vegades i dirigint l'expressió del gen *GUS*, de manera que l'activitat GUS reflecteix els nivells d'auxines endògenes en la planta. A més, també s'ha descrit que aquest element respon a BL (Nakamura i col., 2003).

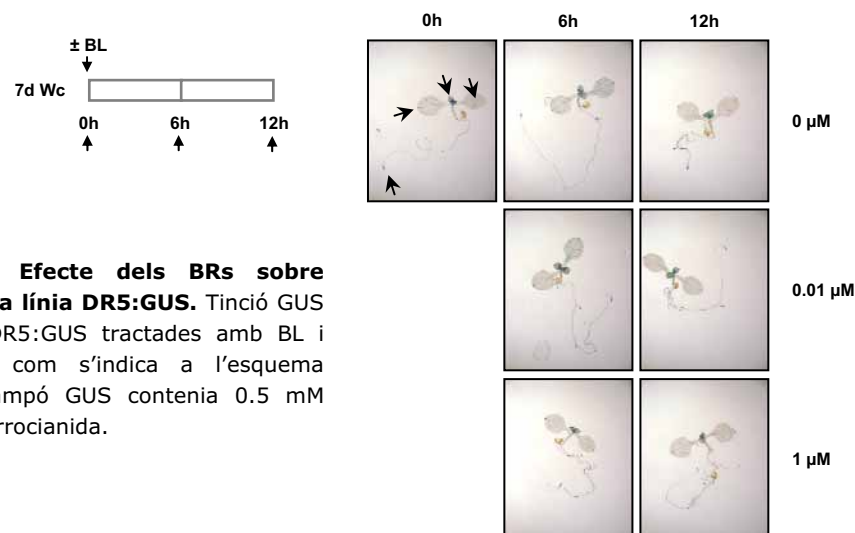
#### 3.1 Estudi de la resposta de la línia DR5:GUS a les auxines i a la SAS

Per comprovar que l'activitat GUS de la línia DR5:GUS funcionava en les nostres condicions experimentals tal i com s'havia descrit, vam aplicar 2,4-D 50 µM a plàntules de 7d i analitzar la tinció GUS a 0, 2 i 4h del tractament. A la **figura R.67** s'observa que en absència de tractament (0h) les plantes presenten una tinció basal GUS a l'extrem proximal de les fulles primàries, hidatodes dels cotilèdons i puntes de les arrels. La tinció GUS augmenta a les fulles primàries, sistema vascular dels cotilèdons i punta de les arrels a partir de les 2h d'aplicació de 2,4-D, estenent-se a les 4h també als hipocòtils.



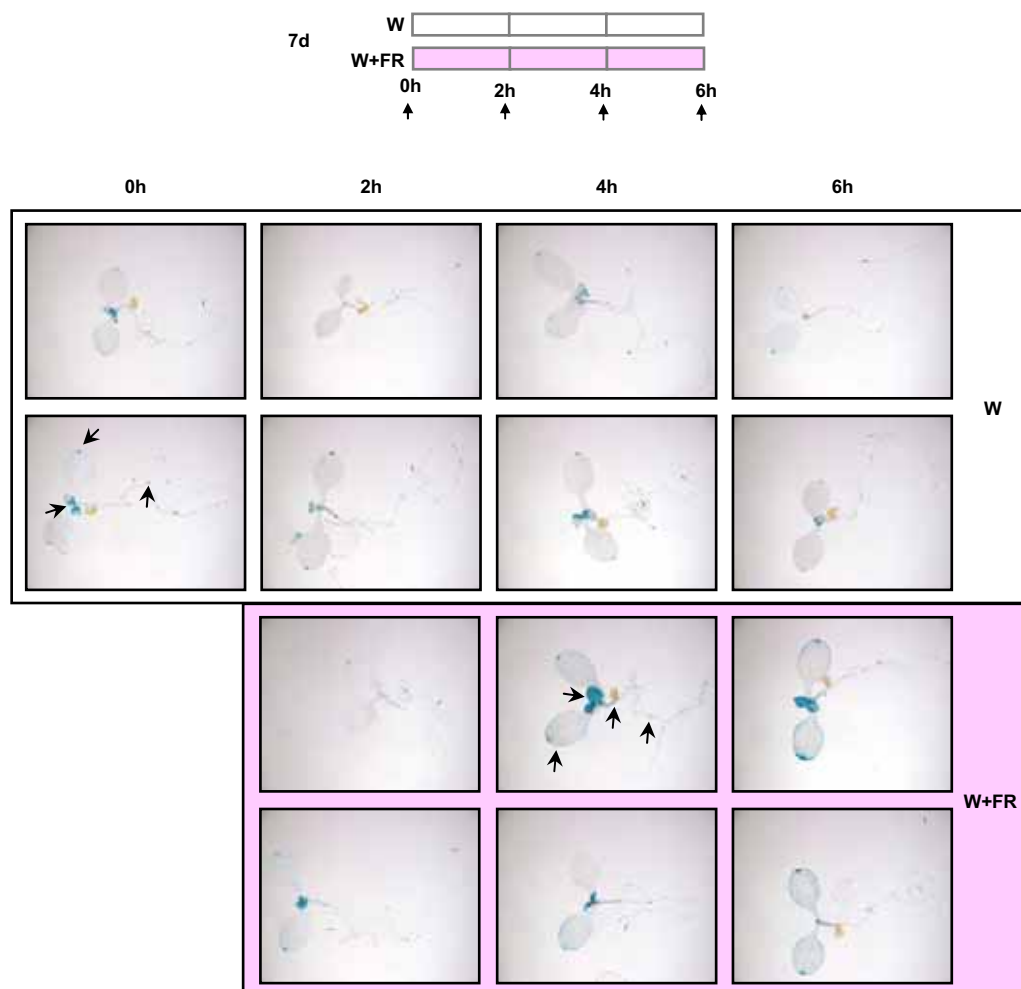
**Figura R.67. Efecte de les auxines sobre plàntules de la línia DR5:GUS.** Tinció GUS de plàntules DR5:GUS tractades amb 2,4-D i cultivades tal i com s'indica a l'esquema superior. Els llocs d'acumulació de tinció GUS es troben assenyalats amb fletxes. El tampó GUS contenia 0.5 mM ferricianida i ferrocianida.

Com s'ha comentat abans, s'ha descrit que la construcció DR5:GUS a més de respondre a auxines també respon a BL (Nakamura i col., 2003). Ho vam comprovar aplicant diferents concentracions de BL (0, 0.01 o 1  $\mu\text{M}$ ) i recollint mostres per analitzar la tinció GUS a 0, 6, i 12h. A la **figura R.68** s'observa que les plantes no tractades amb BL presenten la tinció basal GUS ja descrita en figures anteriors. La tinció GUS no augmenta en les plantes tractades amb BL en cap concentració respecte a les plantes no tractades durant les 12h posteriors a l'aplicació. Aquests resultats indicarien que l'aplicació exògena de BL no altera el patró espacial de tinció GUS durant temps inferiors o iguals a 12h. Per tant, en les nostres condicions de creixement, i en contrast amb l'observat per altres autors, l'activitat GUS semblaria reflectir només canvis en els nivells d'auxines.



**Figura R.68. Efecte dels BRs sobre plàntules de la línia DR5:GUS.** Tinció GUS de plàntules DR5:GUS tractades amb BL i cultivades tal com s'indica a l'esquema superior. El tampó GUS contenia 0.5 mM ferricianida i ferrocianida.

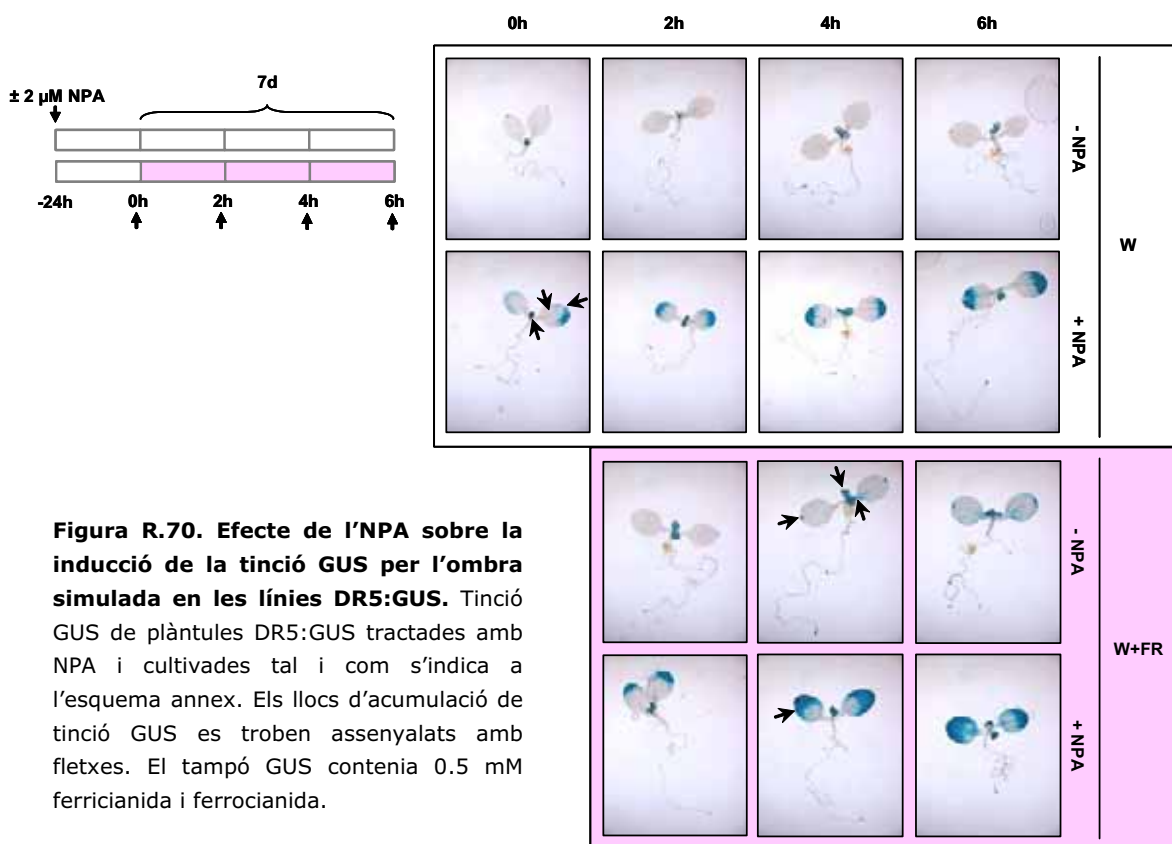
A continuació, vam analitzar l'efecte de l'ombra simulada sobre l'activitat GUS en aquestes plantes. Vàrem realitzar un tractament d'ombra simulada i vam recollir mostres per analitzar la tinció GUS a 0, 2, 4 i 6 h (**figura R.69**).



**Figura R.69. Efecte de l'ombra simulada sobre les línies DR5:GUS.** Tinció GUS de plàntules DR5:GUS cultivades tal i com s'indica a l'esquema superior. Els llocs d'acumulació de tinció GUS es troben assenyalats amb fletxes. El tampó GUS contenia 0.5 mM ferricianida i ferrocianida.

La **figura R.69** mostra com els diferents temps de tractament amb Wc no produeixen canvis en el patró espacial de GUS, que resta igual al ja descrit en la **figura R.67** per a la concentració 0  $\mu$ M. L'ombra simulada però, provoca una acumulació de la tinció GUS en la plàntula principalment a les fulles primàries, sistema vascular dels cotilèdons i vora dels cotilèdons a la part més distal, propera als hidatodes (també tenyits), hipocòtils i punta de les arrels. Aquest augment es detecta a les 4h de tractament i és molt evident a les 6h. L'augment d'activitat GUS detectat reflecteix probablement un augment en els nivells de les auxines endògenes pel tractament d'ombra simulada.

Per aprofundir en aquesta relació entre l'ombra simulada i les auxines vam realitzar tractaments combinat de NPA i ombra simulada. L'NPA és un inhibidor del transport polar d'auxines que s'ha descrit que inhibeix la resposta de l'hipocòtil a l'ombra simulada (Steindler i col., 1999). Plantes cultivades 6d en Wc van ser transferides a plaques que contenen o no una solució NPA 2  $\mu$ M durant 24h. Aquesta concentració es va escollir perquè ha estat descrita per altres autors com a suficient per bloquejar el transport polar d'auxines i induir l'acumulació de tinció GUS en la punta de les arrels de plàntules de la línia DR5:GUS (Lin i Wang, 2005). Immediatament, un grup de plantes es va mantenir en W mentre que un altre es va transferir a W+FR recollint mostres per analitzar la tinció GUS 0, 2, 4 i 6h després de l'inici del tractament d'ombra simulada. En la **figura R.70** es mostra el resultat d'aquest experiment.



**Figura R.70. Efecte de l'NPA sobre la inducció de la tinció GUS per l'ombra simulada en les línies DR5:GUS.** Tinció GUS de plàntules DR5:GUS tractades amb NPA i cultivades tal i com s'indica a l'esquema annex. Els llocs d'acumulació de tinció GUS es troben assenyalats amb fletxes. El tampó GUS contenia 0.5 mM ferricianida i ferrocianida.

Les plantes mantingudes en Wc i tractades amb NPA presenten una major tinció GUS que les no tractades, concretament a l'extrem distal dels cotilèdons al voltant dels hidatodes (estructures responsables de la secreció d'auxines), sistema vascular dels cotilèdons i fulles primàries. En absència de NPA, les plantes sotmeses al tractament d'ombra simulada a 4h presenten una major tinció GUS comparades amb les plantes cultivades en Wc a les fulles primàries, sistema vascular dels cotilèdons i vora dels cotilèdons a la part més distal propera als hidatodes i hipocòtils, tal i com havíem vist a la **figura R.68**. Aquesta acumulació s'incrementa, excepte en els hipocòtils, en presència de NPA. Aquests resultats mostren com l'NPA provoca l'acumulació de la tinció GUS en la part

aèria de la planta en les zones properes al seu lloc de síntesi (hidatodes). A més, reforcen la idea de que l'ombra simulada provoca un increment dels nivells d'auxines en la plàntula.

Per tant, d'aquest grup de resultats es conclou que l'increment de tinció GUS provocat per 2, 4 o 6h d'ombra simulada està reflectint, probablement, un augment en els nivells d'auxines de la planta.