

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

4. DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

En plantes cultivades en llum, la proximitat vegetal provoca una disminució de la raó F:FR que és captada pels fotoreceptors fitocroms, desencadenant un ampli conjunt de respostes fisiològiques i canvis en el desenvolupament de la planta, conegudes com la SAS. Per a la desetioliació, el primer gran canvi en el desenvolupament vegetal induït per llum després de la germinació i que ha estat àmpliament estudiat genèticament, s'ha postulat l'existència d'una xarxa transcripcional complexa que transdueix el senyal lumínic captat pels fitocroms fins als canvis fisiològics típics de la planta en aquest procés. En aquesta transducció del senyal, els fitocroms regularien ràpidament l'expressió gènica mitjançant l'accés directe al promotor de gens fotoregulats que són dianes directes seves. Tal i com es proposa per a la desetioliació de les plàntules (**figura I.10**), la nostra hipòtesi era que el fitocrom també transduiria el senyal lumínic per implementar les respostes de la SAS modulant ràpidament una cascada transcripcional.

Canvis moleculars associats a la SAS: identificació dels gens *PAR*

En aquest treball es mostra com, d'acord amb aquesta hipòtesi, l'ombra simulada també resulta en la inducció de l'expressió gènica. Concretament, ens hem centrat en 8 gens (*ATHB2*, *ATHB4*, *GAI*, *HAT2*, *PAR1*, *PHYB*, *PIL1* i *RIP*) l'expressió dels quals és ràpidament induïda per la SAS en arabidopsis (**figures R.3** i **R.24**). Els canvis d'expressió d'aquests gens constitueixen un conjunt de fotorespostes moleculars que, a diferència de les fisiològiques, ocorren ràpidament per sota de l'acció dels fitocroms. Per tant, poden ser utilitzades com marcadors moleculars primerencs de l'acció d'aquests fotoreceptors.

Les anàlisis d'expressió dels *PARs* en plàntules irradiades amb diferents raons R:FR (**figura R.4**) i els tractaments d'ombra simulada en les línies de sobreexpressió de fitocroms, juntament amb els aplicats a les línies mutants *phyB* i *hy4-1* (**figures R.5**, **R.6** i **R.7**) ens permeten concloure que la regulació de l'expressió dels *PARs* per ombra simulada és exclusivament dependent dels fitocroms. Això concorda amb la bibliografia que descriu als fitocroms com els fotoreceptors responsables de la captació de la raó R:FR i de la iniciació de la transducció del senyal que donarà lloc a les respostes de la SAS (Franklin i col., 2003b).

Hem demostrat que alguns d'aquests gens (concretament *ATHB2*, *ATHB4*, *GAI*, *PAR1*, *PHYB* i *PIL1*) són dianes directes dels fitocroms, basant-nos en 4 dades principals: (1) la correlació negativa entre els nivells de Pfr i la seva expressió, (2) la ràpida cinètica de la seva regulació dependent de llum, (3) la ràpida resposta dels seus promotors a l'ombra simulada, i (4) el patró independent de CHX de la seva expressió fotoregulada. A continuació es desenvolupen en detall.

La primera evidència, confirmació de la nostra hipòtesi de partida per la identificació dels gens *PAR*, és la correlació inversa entre la forma Pfr del fitocrom (o la raó R:FR) i els nivells de transcripció dels *PARs* (**figures R.4 i R.24**). Aquests resultats recolzen la idea que la inducció de l'expressió dels gens *PAR* per l'ombra simulada és un alliberament de la repressió que exerceix la forma activa dels fitocroms (**figura R.1C**). Consistentment, nivells elevats de fitocroms en les línies AOX i ABO resulten en una baixa transcripció dels *PARs* tant abans com després del tractament d'ombra simulada (**figura R.5**), i l'absència de *phyB* resulta en un moderat increment de la transcripció dels *PARs* abans del tractament d'ombra simulada (**figura R.6**). No hem pogut relacionar els nivells baixos de *phyB* amb els nivells d'expressió dels *PARs* després del tractament d'ombra simulada, ja que hi ha una variació en els nivells d'expressió d'aquests gens respecte a les 0h. Alguns d'ells, com *PIL1*, mostren una expressió major després del tractament d'ombra simulada, mentre que d'altres, com *ATHB4*, estan clarament reprimits després del tractament. Una possible explicació seria que a 0h l'expressió dels *PARs* ja es troba desreprimida en els mutants *phyB* degut a l'absència de *phyB*, de manera que només detectarem inducció de l'expressió després del tractament d'ombra simulada per aquells *PARs* que es trobin reprimits per altres fitocroms fotoestables. No obstant, aquests resultats són consistents amb la nostra hipòtesi de partida, explicant el fet que un mateix estímul lumínic (llum FR) reguli l'expressió d'un conjunt de gens (els *PAR*) de manera contrària en dos processos fisiològics diferents: la desetiolació i la SAS (**figures R.1, R.2 i R.3**).

Com es mostra per primer cop a les **figures R.1 i R.5**, la inducció per ombra de l'expressió dels *PARs* és ja evident 0.5h després del tractament d'ombra simulada, essent aquest el punt màxim d'expressió per alguns dels *PARs*, com és el cas d'*ATHB4*. Tot i que en aquest treball no s'ha analitzat l'expressió dels *PARs* a temps més curts que 0.5h de tractament d'ombra simulada, els autors que van descriure per primer cop la inducció per ombra de l'expressió d'*ATHB2* i *PIL1* mostren que aquesta ja és evident als 15 i 8 min. de tractament respectivament (Carabelli i col., 1996; Salter i col., 2003). Per tant, és possible que la inducció de l'expressió dels *PARs* per ombra simulada sigui fins i tot més ràpida que 0.5h. La rapidesa d'aquestes induccions recolza la possibilitat d'una regulació directa de l'expressió dels *PARs* per part dels fitocroms. A més, la inducció de l'expressió dels gens *PAR* es manté relativament alta almenys durant 24h des de l'inici de l'estímul de llum (**figures R.58 i R.59**).

En els nostres experiments hem vist que la regió de 1 kb corrent amunt del codó ATG d'*ATHB2*, *ATHB4*, *GAI*, *PAR1* i *RIP* és suficient per conferir fotoregulació ràpida a un gen reporter (**figura R.12**). Aquests experiments indiquen que la fotoregulació dels *PARs* es dona, almenys en part, a nivell transcripcional. Per al procés de la desetiolació s'ha proposat, com un dels mecanismes de la senyalització dels fitocroms, l'activació de cascades transcripcionals per vies tant dependents com independents de PIF3 (Tepperman i col., 2001). Com s'ha explicat a la introducció, PIF3 pertany a la gran família bHLH de proteïnes, moltes de les quals s'han mostrat que poden unir *in vitro* el motiu de la G-box

(Martinez-Garcia i col., 2000; Huq i Quail 2002; Huq i col., 2003). No obstant, la rellevància funcional d'aquest motiu per l'activitat de PIF3 i/o altres bHLHs relacionats en planta encara no ha estat demostrada. A més de les vies d'activació gènica, dades de micromatrius suggereixen l'existència d'una altra via iniciada per la repressió primerenca de la cascada transcripcional (Tepperman i col., 2001). Aquesta via podria exemplificar-se amb els gens *PAR*. Actualment, tant la possibilitat de que uns mateixos PIFs puguin funcionar com activadors o repressors transcripcionals, depenent de promotors específics (Kim i col., 2003), com la possibilitat de que els PIFs implicats en la via de repressió siguin diferents dels que actuen com a activadors de la transcripció estan obertes. Cap de les regions promotores dels *PARs* analitzades (**figura R.12**) conté elements G-box, el que suggereix que factors semblants a PIF3 no estan implicats en la repressió primerenca d'aquests gens *PAR* pels fitocroms. Les delecions seriadades del promotor d'*ATHB2* (**figura R.13**) ens han permès acotar la capacitat de fotoregulació d'aquest promotor concret a una regió de tant sols 100 pb, indicant la presència en aquesta regió d'alguns, possiblement no tots, dels elements responsables de la fotoregulació d'aquest gen. L'estudi detallat d'aquesta regió (mitjançant mutagènesi puntual o clonatge seriat de la mateixa davant gens reporters, per exemple) en un futur podria dur-nos a la identificació dels elements responsables de la fotoregulació d'*ATHB2*, possiblement mai descrits anteriorment. D'identificar-se aquests elements, podria estudiar-se la seva presència en els promotors de la resta de *PARs* o d'altres gens fotoregulats, la qual cosa, de resultar positiva, suposaria la classificació d'*ATHB2* i altres elements en una branca comú en la xarxa de transducció de la llum. Aquests estudis dels promotors dels *PARs* obren doncs la porta a la recerca de nous elements implicats en la fotoregulació gènica.

Finalment, la independència de CHX de l'expressió fotoregulada d'*ATHB2*, *ATHB4*, *GAI*, *PAR1*, *PHYB* i *PIL1* indica que aquests gens són dianes directes dels fitocroms (**figures R.10 i R.24**). Per identificar gens diana primaris d'un factor de transcripció (FT) s'utilitza normalment la fusió entre el FT i el receptor de glucocorticoides (GR), controlant així l'activitat transcripcional del FT regulant la seva translocació nuclear aplicant DEX, un glucocorticoide sintètic. L'ús d'aquestes línies induïbles s'ha combinat amb tractaments de CHX per bloquejar la síntesi *de novo* de proteïnes (Ohgishi i col., 2001; Sawa i col., 2002). Quan la CHX s'aplica junt amb la DEX, només es veuen afectats els nivells de transcrit dels gens diana primaris dels FTs. L'expressió dels gens diana primaris és doncs independent de CHX, mentre que l'expressió de gens secundaris és dependent de CHX. Aquesta aproximació, a part de per a l'estudi de FTs, també ha estat utilitzada per proteïnes sense dominis coneguts d'unió al DNA que necessiten ser al nucli per tenir activitat senyalitzadora, com CONSTANS (Samach i col., 2000). En aquesta tesi la configuració experimental utilitzada per identificar gens diana primaris dels fitocroms *in vivo* varia una mica de la que acabem de descriure, ja que l'activitat transcripcional està controlada per ombra simulada enlloc de per la translocació nuclear (**figura R.8**). L'ombra simulada modula el fotoequilibri dels fitocroms (que ja es troben al nucli en plantes cultivades en Wc i, subsegüentment, la seva habilitat a unir diferents PIFs (**figura R.8A, B**). Així, en presència de CHX, estem monitoritzant els efectes immediats (independents

de traducció) de la desaparició induïda per ombra dels Pfr-PIF sobre l'expressió dels gens *PAR* (representat a la **figura R.8C**). Aquesta aproximació experimental ha estat posada a punt utilitzant la línia LhGR-N(4c), en la que la localització nuclear del factor LhGR i per tant l'expressió de la seva diana directa, el gen reporter *GUS*, depèn de l'aplicació de DEX. Així, vam establir que l'aplicació de CHX 2h abans de l'aplicació de DEX bloquejava eficientment la síntesi *de novo* de proteïna GUS (**figura R.9**), pel que vam decidir aplicar CHX 2h abans del tractament d'ombra simulada en els nostres experiments. Utilitzant aquest disseny experimental, observem que la ràpida resposta fotoregulada d'*ATHB2*, *ATHB4*, *GAI*, *PAR1*, *PHYB* i *PIL1* és CHX independent (**figures R.10 i R.24**), suggerint que aquests gens són dianes primàries de l'acció dels fitocroms en plàntules cultivades en llum. Dels nostres resultats no podem discriminar si la forma activa dels fitocroms uneix als promotors dels gens *PAR* via PIFs específics, si evita que altres PIFs accedeixin als promotors d'aquests gens, o si es requereixen altres esdeveniments bioquímics addicionals simultanis per traduir el senyal de la llum en canvis en l'expressió dels *PARs*.

El patró similar de regulació de l'expressió d'*ATHB2*, *ATHB4*, *GAI*, *PHYB*, *PAR1*, i *PIL1* pels fitocroms durant la SAS i la desetiolació recolzen la possibilitat de que aquests siguin gens diana primaris de l'acció dels fitocroms en ambdues respostes de la plàntula, malgrat que no ho hem investigat directament. De complir-se això, concordaria amb la idea desenvolupada en sistemes animals de l'existència del que s'anomenen cassets gènics funcionals: grups de gens amb funció en un procés determinant del desenvolupament utilitzats també per fer funcions semblants en altres etapes del desenvolupament (Jan i Jan, 1993). És a dir, alguns dels *PARs*, que estan ràpidament regulats durant la desetiolació i durant la SAS, podrien constituir un casset funcional que participa en la regulació d'aquests dos processos. Això però, no vol dir que tots els mecanismes moleculars requerits per la fotoregulació dels *PARs* hagin d'estar completament conservats en aquests dos processos. De fet, com es discutirà més endavant, COP1 participa en la fotoregulació d'*ATHB2*, *ATHB4*, *GAI*, *PAR1*, i *PIL1* per ombra simulada, mentre que no juga un paper important en la repressió primerenca d'*ATHB2*, *PAR1*, i *PIL1* durant la desetiolació (**figures R.20 i R.21**).

Les anàlisis genètiques realitzades en l'estudi de la desetiolació de plàntules d'*Arabidopsis* han establert una jerarquia en els factors implicats en la transducció del senyal lumínic. Així, existeixen intermediaris de la senyalització de la llum primerencs i tardans, específics d'un fitocrom o comuns per a més d'un fitocrom (**figura I.13**) i/o per a més d'un fotoreceptor. La classe de mutants constitutivament desetiolats *cop/det/fus* han mostrat ser els més epistàtics a tots els fotoreceptors, i s'ha proposat que actuen en les etapes més tardanes de la senyalització lumínica (Quail 2002a; Schäfer i Bowler 2002; Chen i col., 2004). Malgrat aquesta informació, no hi ha molta informació sobre el paper d'aquests factors, identificats genèticament, en la xarxa transcripcional iniciada pels fitocroms en la desetiolació (**figura I.10**) o altres respostes fotomorfogèniques com les de la SAS.

Nosaltres hem mostrat que DET1, que actua junt amb COP1 regulant la degradació de FTs implicats en la senyalització lumínica (Yanagawa i col., 2004), participa en la fotoregulació d'*ATHB2*, *ATHB4*, *GAI*, *PAR1* i *PIL1* per l'ombra simulada (**figura R.23**). Així, veiem que alguns factors (COP1 i DET1) identificats genèticament i considerats com a reguladors tardans de la transducció del senyal lumínic durant la desetiolació també juguen un paper primerenc en alguns esdeveniments de la transducció de la llum en la SAS, ja que els seus mutants, tot i percebre la llum, presenten les respostes de la SAS, tant fenotípiques com moleculars, alterades (**figures R.20 i R.23**).

Dades recents indiquen que COP1 regula primerencament diferents processos durant la senyalització dels fitocroms. COP1 regula l'acumulació del factor interactor dels fitocroms PIF3, que participa en la regulació directa pels fitocroms de l'expressió de gens fotoregulats, en el nucli en plàntules etiolades (Bauer i col., 2004). També s'ha descrit la degradació dependent de COP1 del producte gènic de *HFR1* durant la desetiolació (Duek i col., 2004). En aquest treball nosaltres mostrem que COP1 provoca canvis en l'expressió gènica dependents d'ombra per l'acció dels fitocroms en plantes cultivades en llum (**figura R.20**). El fet que COP1 estigui actuant en alguns esdeveniments de la senyalització primerenca dels fitocroms durant la desetiolació i/o durant l'inici de la SAS però no en tots implica que algunes respostes mediades pels fitocroms podrien ser independents de COP1. De fet, el control de la germinació de llavors pels fitocroms no depèn de COP1 ja que no està afectada en els mutants *cop1* (Deng i col., 1992) i *phyB* és epistàtic sobre COP1 en el procés d'obertura dels cotilèdons durant la desetiolació per llum R (Boccalandro i col., 2004). Consistentment, els nostres experiments mostren que COP1 no és requerit en la repressió primerenca de l'expressió dels *PARs* durant la desetiolació (**figura R.21**), mentre que sí que ho està per la modulació de la fotoregulació per ombra d'*ATHB2*, *ATHB4*, *PAR1* i *PIL1*, és a dir, que participaria primerencament en la transducció del senyal lumínic via *PARs* durant la SAS però no durant la desetiolació. La conclusió extreta dels nostres experiments de que COP1 està actuant primerencament en la regulació de la transducció del senyal lumínic iniciada pels fitocroms en la SAS no és, però, incompatible amb la possibilitat de que COP1 actuï en etapes més tardades de la senyalització d'aquests fotoreceptors.

Altres factors (com *HY5*) en canvi, només juguen un paper en la desetiolació. Així, els mutants *hy5* no presenten una resposta fenotípica a l'ombra simulada alterada ni canvis en la inducció per ombra de l'expressió dels *PARs* comparats amb les plantes silvestres (**figura R.22**). A més, hem vist que DET2 tampoc estaria implicat en la regulació de l'expressió dels *PARs* per ombra simulada (**figura R.23**), malgrat que el mutant *det2-1* té un fenotip morfogènic constitutiu molt similar al dels mutants *cop* i *det1-1*, i també manifesta respostes defectives de la SAS. Com que DET2 participa en la biosíntesi de BRs, això suggereix que els BRs afecten les respostes de la SAS per altres mecanismes que la regulació dels gens *PAR* (probablement actuant per sota d'ells).

Per tant, en aquest treball revelem una funció primerenca desconeguda per a COP1 i DET1 regulant l'expressió dels *PARs* durant la SAS. Aquesta funció és una característica

d'aquests dos factors ja que HY5, que interacciona físicament amb COP1 (Ang i col., 1998) i que ha estat genèticament classificat com a tardà en la transducció de la llum durant la desetiolació, com ho estaven COP1 i DET1, no sembla jugar cap paper en aquesta transducció durant la SAS.

Canvis cel·lulars associats a la SAS

Com ja s'ha introduït, les respostes fisiològiques de la SAS són clarament aparents en l'estadi de plàntula. Als 7d de desenvolupament plantes silvestres sotmeses a un tractament d'ombra simulada presenten els hipocòtils, els cotilèdons i les fulles primàries més allargats que quan són cultivades en W, i l'allargament dels cotilèdons i les fulles primàries es deu essencialment a l'allargament dels pecíols (**figura R.15**). A més hem vist que les plantes sotmeses a ombra simulada acumulen menor quantitat de pigments fotosintètics clorofil·les i carotenoides que les cultivades en W (**figura R.15**). A nivell ultraestructural, presenten una major acumulació de grana als tilacoides que les plantes cultivades en W (**figura 16**). S'ha postulat que la major acumulació de grana provoca una major captació de llum pels cloroplasts, ja que els complexos antena associats amb el PSII es troben majoritàriament associats a aquestes estructures (Weston i col., 2000). Sembla doncs, que les plantes sotmeses a ombra simulada s'estan preparant per captar més eficientment la llum quan estiguin ombrejades. Aquestes plantes també presenten menor quantitat de grans de midó que els de plantes cultivades en W. Això podria estar reflectint la mobilització de les reserves en la planta, possiblement per la inversió en el creixement longitudinal dels hipocòtils, els cotilèdons i les fulles. Aquesta major acumulació de grana i menor de midó també s'ha observat en plantes cultivades en baixa intensitat de llum, respecte plantes cultivades en alta intensitat de llum (Weston i col., 2000), que els autors interpreten com un aclimatament de les fulles de la planta a la quantitat de llum rebuda. Per últim, les plantes tractades amb ombra simulada presenten una menor quantitat de plastoglòbuls, estructures enriquides en lipoproteïnes, entre elles carotenoides (Austin i col., 2006), que són electrodenses al microscopi electrònic. Aquesta menor quantitat de plastoglòbuls podria estar relacionada amb la reducció en la quantitat de carotenoides observada. En resum, suggerim que l'ombra simulada, que mimetitza la proximitat vegetal abans de l'ombregat físic, provoca en les plàntules d'*Arabidopsis* canvis tant a nivell morfològic com subcel·lular (canvis a diferents nivells en l'estructura i el metabolisme dels seus cloroplasts) que la preparen per a un probable ombregat posterior.

A part d'*Arabidopsis thaliana*, la nostra planta model, les respostes fisiològiques i moleculars de la SAS també són evidents als 7d de desenvolupament de plàntules de les espècies properes *A. griffithiana*, *A. korshinskyi* i *A. pumila*. A nivell fisiològic, les plantes d'aquestes espècies també mostren un allargament dels hipocòtils, cotilèdons i fulles primàries en resposta a l'ombra, essent les diferències en l'allargament entre W i W+FR més grans que a *A. thaliana* possiblement perquè les plàntules d'aquestes espècies són lleugerament més grans (*A. korshinskyi*) o bastant més grans (*A. griffithiana* i *A. pumila*) (**figura R.17**). Pel que fa a les respostes moleculars que es donen en la transducció del

senyal lumínic durant la SAS, sembla que algunes d'elles s'han conservat, com és el cas d'*ATHB2*, *HFR1*, i *PAR1* (**figura R.18**). A més que sondes obtingudes en *A. thaliana* són capaces de reconèixer els gens homòlegs en les altres 3 espècies, la seva expressió està fotoregulada de la mateixa manera en les 4 espècies d'*Arabidopsis* (**figura R.18 i R.19**). Tot i haver-nos cenyit a l'estudi de les respostes moleculars i fisiològiques de la SAS en espècies properes a *A. thaliana*, totes elles pertanyents al mateix gènere, aquests resultats suggereixen la conservació durant l'evolució dels mecanismes d'acció primaris dels fitocroms durant la posta en marxa de la SAS, tals com els seus gens diana primaris. Seria interessant adreçar aquest punt en espècies vegetals més allunyades, tals com meló o tomàquet, per tal de saber si els gens diana primaris de l'acció dels fitocroms durant la iniciació de la SAS estan conservats. De ser així, aquesta conservació podria ser deguda al fet que les respostes de la SAS són claus per la supervivència de nombroses espècies vegetals, principalment les angiospermes.

L'estudi de l'expressió dels *PARs* en diferents moments del desenvolupament de la plàntula d'*Arabidopsis thaliana* posa de manifest que aquests s'expressen en baixos nivells en plàntules de 4, 7 i 10d d'edat cultivades en Wc, i que la seva expressió s'indueix per l'ombra en tots tres moments del desenvolupament. Aquest experiment també ha determinat els 7d de desenvolupament com un moment òptim per a l'estudi de les respostes moleculars a la SAS (**figura R.14**), així com de les respostes fisiològiques (**figura R.15**). El fet però, que l'expressió dels *PARs* individuals sigui més alta en un determinat moment del desenvolupament que no sempre coincideix per a tots els *PARs* (4d per a *RIP*, 7d per a *PAR1*, per exemple), implica l'existència d'una nova variable a tenir en compte en l'estudi de les respostes de la SAS: el moment del desenvolupament, que podria estar reflectint els diferents òrgans presents a les plàntules de 4d, 7d i 10d. És molt probable que en els diferents estadis de desenvolupament hi hagi un o més *PARs* que tinguin un paper principal, assumint que els canvis d'expressió es tradueixin en canvis en els nivells de proteïna i per tant en l'abundància d'aquests factors, modulant així les respostes de la planta a l'ombra en funció del seu estadi de desenvolupament. Els canvis en les proporcions relatives d'un conjunt de factors (els *PARs*) permetrien una regulació molt fina de les respostes de la SAS en els diferents estadis de desenvolupament de la planta.

Cerca d'altres components de la SAS

Per tal d'aïllar nous components moleculars que controlen la SAS hem utilitzat una estratègia genètica. La caracterització prèvia del gen *PHYB* com un dels *PARs* primaris de l'acció dels fitocroms durant la SAS (**figura R.24**) ens ha permès dissenyar i dur a terme una estratègia consistent en mutagenitzar llavors transgèniques PBL, que contenen el promotor de *PHYB* dirigint l'expressió del gen *LUCIFERASA* (*LUC*), i buscar mutants amb l'activitat luciferasa alterada en resposta al tractament d'ombra simulada. Com a resultat d'aquesta estratègia hem aïllat un conjunt de mutants que presentaven la resposta a l'ombra simulada alterada.

Tal i com esperàvem, l'activitat luciferasa de les plantes PBL augmentava al tractar-les amb ombra simulada (**figura R.25**). L'anàlisi dels canvis en l'activitat luciferasa de les plantes PBL en resposta a l'ombra simulada té l'avantatge front a la mesura d'altres respostes fenotípiques de la SAS (allargament d'hipocòtil, cotilèdons...) de ser fàcilment quantificable i no implicar cap mena de manipulació traumàtica per a la planta. Per tant aquest cribratge pot permetre la identificació més senzilla de mutants que un de basat en les diferències en paràmetres fenotípics, sovint subtils.

Un cop establert el comportament d'aquesta línia en resposta a l'ombra simulada, es va realitzar la mutació i el cribratge d'individus amb l'activitat luciferasa alterada. Malgrat no realitzar un cribratge que saturés el genoma, a partir de l'anàlisi de 30.000 plantes M2 hem identificat 554 possibles mutants. D'aquests n'hem reanalitzat 220, i 28 han estat confirmats a la següent generació com a vertaders mutants. A partir de la confirmació dels mutants, en el nostre laboratori i també en col·laboració amb el laboratori del Dr. Devlin s'estan caracteritzant fisiològicament els mutants en condicions de LD, en resposta a l'ombra i en resposta a la desetiolació sota llum monocromàtica Rc i FRc. Aquí es mostra una de les primeres caracteritzacions dutes a terme, la del mutant I2.164, identificat per la seva baixa activitat luciferasa després del tractament d'ombra simulada (**figura R.30**).

Degut a què la identificació dels mutants es basa en la mesura dels canvis en l'activitat luciferasa en resposta a l'ombra simulada, existia la possibilitat de que alguna de les mutacions estigués afectant al gen *PHYB*, que participa en la percepció de l'ombra simulada. De fet, a la línia PBL s'ha descrit que el *phyB* reprimeix clarament l'activitat luciferasa en plàntules cultivades en llum (Hall i col., 2002). De ser així, l'alteració en els nivells de proteïna PHYB resultant provocaria canvis en l'activitat luciferasa. L'anàlisi per *western-blot* en el mutant I2.164 ens permet afirmar que els nivells de proteïna PHYB són essencialment idèntics als de les plantes PBL (**figura R.33**), indicant que la mutació I2.164 no està afectant al gen *PHYB* endogen. El fet que el mutant I2.164 presenti fenotips morfològics en diferents qualitats i/o quantitats de llum indica que la mutació no recau en el promotor del transgen, ja que no esperaríem que els canvis en els nivells de luciferasa de la planta provoquin canvis fisiològics en aquesta.

Els fenotips mutants de la línia I2.164 en resposta a l'ombra simulada (**figura R.31**) i en la desetiolació sota llum monocromàtica R o FR (**figura R.32**), indiquen que el gen on recau la mutació està implicat en la resposta de la planta a la llum. El mapatge groller d'aquesta mutació ens ha permès localitzar-la en una regió del cromosoma 1 corresponent a 61 BACs. En aquesta regió es troben diferents gens que codifiquen proteïnes relacionades amb la captació i/o transducció del senyal lumínic, candidats a ser els afectats en aquest mutant, tals com *LHY*, *HFR1*, *CRY2*, *PIF3*, *PHYA* o *GAI*. La comparació més detallada dels fenotips ja descrits per als mutants d'aquests gens amb els fenotips del mutant I2.164 possiblement ens aportarà dades que ens permetin prioritzar la seqüenciació d'algun d'ells en el mutant I2.164 i potser així identificar el gen que ha resultat mutat. Per exemple, els gens *LHY* i *GAI* es troben massa prop dels marcadors

nga59 i JV18/19 que acoten la mutació, pel que a la vista dels valors dels percentatges de recombinació calculats (**figura R.34**) resulta poc probable que siguin els afectats en el mutant I2.164. A més, els fenotips dels mutants de pèrdua de funció *gai*, *pif3* i *cry2* (Peng i col., 1997; Guo i col., 1998; Kim i col., 2003) i de guany de funció *lhy* (Schaffer i col., 1998) no són consistents amb el presentat pel mutant I2.164. D'entrada, el mutant I2.164 i els mutants *phyA* i *hfr1* comparteixen la ceguesa, total o parcial, a llum FRC, tot i que no s'ha descrit hiposensibilitat a Rc en cap dels dos casos (Nagatani i col., 1993; Fairchild i col., 2000). És d'esperar que el mapatge refinat d'aquesta mutació permeti finalment la seva identificació, aportant nova informació sobre la transducció del senyal lumínic.

La caracterització i identificació de la resta de mutants obtinguts en aquest cribratge de ben segur aportarà nous coneixements sobre els mecanismes pels quals la llum regula el desenvolupament vegetal.

Caracterització d'alguns gens *PAR*

Alternativament a l'estratègia genètica comentada anteriorment, ens hem centrat en l'anàlisi funcional de gens *PAR* en la regulació de les respostes de la SAS. Aquesta aproximació es basa en la idea que els gens que presenten una expressió ràpidament regulada per l'ombra simulada i que codifiquen per proteïnes amb activitat potencialment reguladora (per exemple, TFs), poden tenir algun paper en la regulació d'aquests processos. Del conjunt de gens *PAR* diana primaris de l'acció dels fitocroms durant la SAS identificats en aquest treball, hem analitzat el paper d'*ATHB2*, *ATHB4*, i amb més profunditat *PAR1*, en el desenvolupament de la planta i en la SAS.

Caracterització d'*ATHB2* i *ATHB4*

Tant *ATHB2* com *ATHB4* pertanyen a la classe II d'una família gènica de FT: HD-Zip, que també inclou *HAT2*, un altre dels *PARs* identificats en aquest treball. La funció dels gens de la classe II (que consta de 9 membres), junt amb els de la classe I (que consta de 17 membres), no ha estat tan ben caracteritzada com la dels gens de les classes III i IV, implicats en multitud de processos del desenvolupament. Nombrosos estudis funcionals han mostrat que els 5 membres de la classe III estan implicats en el manteniment de la identitat del meristem apical de la tija i en l'establiment de la polaritat dels òrgans (Prigge i col., 2005; Byrne 2006), mentre els 16 membres de la classe IV semblen jugar un paper en la diferenciació i/o manteniment de la capa epidèrmica (Schrack i col., 2004; Nakamura i col., 2006). A més, s'ha suggerit certa redundància entre els membres de cada classe.

Com ja s'ha comentat a la introducció, ha estat descrita la inducció de l'expressió d'*ATHB2* per ombra simulada (Carabelli i col., 1993; 1996), a més de proposar-se un paper d'aquest factor en el desenvolupament de la planta i en les respostes de la SAS (Scheda i col., 1993; Steindler i col., 1999), ja que la sobreexpressió d'*ATHB2* resulta en plantes en les que algunes de les respostes de la SAS estan activades. Per *ATHB4* en

canvi, només s'ha descrit la inducció de la seva expressió per ombra simulada (Carabelli i col., 1993).

En aquest treball s'ha volgut iniciar l'estudi de la funció d'aquests dos factors mitjançant una estratègia de genètica inversa, generant línies de sobreexpressió i obtenint plantes mutants de pèrdua de funció a partir de la col·lecció SALK de mutants d'arabidopsis per ambdós gens. El motiu pel qual s'han generat línies de sobreexpressió d'*ATHB2* havent ja estat generades i caracteritzades per altres autors ha estat el no poder disposar d'elles i voler caracteritzar-les en les nostres condicions experimentals i comparar-les amb les línies de sobreexpressió d'*ATHB4*, altament homòleg a *ATHB2*, i amb les línies de pèrdua de funció.

El fenotip descrit per a les línies de sobreexpressió d'*ATHB2* en la bibliografia era una inhibició de l'allargament dels cotilèdons (degut a la inhibició de l'allargament tant de les cèl·lules epidèmiques com de les del mesòfil i en palissada), inducció de l'allargament de l'hipocòtil (degut a la inducció de l'allargament apical-basal de les cèl·lules epidèmiques, corticals i endodèmiques), inhibició de la formació d'arrels laterals i inhibició del creixement secundari dels sistema vascular tant de l'arrel com de l'hipocòtil (Steindler i col., 1999). Els autors postulen que *ATHB2* provoca tots aquests efectes redistribuint lateralment les auxines en la planta, augmentant la quantitat d'auxines transportada activament pels teixits no vasculars en detriment de la quantitat d'auxines transportada pels teixits vasculars (Steindler i col., 1999; Morelli i Ruberti, 2000).

Les plantes de sobreexpressió d'*ATHB2* i d'*ATHB4* generades en el nostre laboratori tenien un fenotip similar al descrit per la sobreexpressió d'*ATHB2* a la bibliografia. En estadi de roseta presentaven pecíols de les fulles allargats, i fulles estretes i hiponàstiques (**figura R.36**). A més, aquestes plantes en estadi adult presenten inflorescències epinàstiques i síliques curtes, fenotips no mostrats pels autors que van descriure la sobreexpressió d'*ATHB2*. El fet que la sobreexpressió d'*ATHB4* resulti en un fenotip molt similar a la sobreexpressió d'*ATHB2* (ja descrit com a regulador de les respostes de la SAS), junt amb el fet que *ATHB4* sigui un *PAR* primari de l'acció dels fitocroms (**figura R.10**), suggereixen que *ATHB4* podria ser també regulador de les respostes de la SAS. Experiments realitzats en el nostre laboratori en els que s'estudià les respostes fisiològiques a l'ombra simulada en les plantes que sobreexpressen *ATHB2* i *ATHB4* mostraren que aquestes presentaven una resposta més atenuada que la de plantes silvestres. Aquests resultats recolzen la idea de que *ATHB2* i *ATHB4* siguin reguladors de la SAS. A més, la similitud de fenotips en les plantes de sobreexpressió d'*ATHB2* i *ATHB4* podria estar indicant que aquests dos factors realitzen funcions similars en la planta, de manera que *ATHB4* també podria estar implicat en la distribució d'auxines en la planta.

També s'han obtingut mutants simples de la col·lecció SALK per a tots dos gens. Per anàlisis *northern-blot* hem establert que en tots dos casos es tracta de mutants nuls (**figura R.37**) ja que no es detecta expressió del corresponent gen endogen en cap dels dos mutants. Els mutants simples *athb2-1* i *athb4-1* i el doble mutant *athb2/athb4* no

presenten cap fenotip obvi ni al ser cultivats a l'hivernacle, ni en resposta a tractaments d'ombra simulada (**figura R.38**), ni durant la desetioliació sota diferents intensitats de llum monocromàtica Rc i FRc (**figura R.39**).

El fet que les plantes de sobreexpressió tinguin un fenotip clar, mentre que els mutants simples i el doble mutant no presentin cap tret fenotípic diferent a les plantes silvestres podria estar suggerint una redundància de funció amb altres membres de la família. Així, és possible que altres membres de la classe II estiguin jugant un paper redundat amb *ATHB2* i *ATHB4*, almenys parcialment, en el control de les respostes de la SAS. En el cas dels HD-Zip de la classe III, s'ha descrit que dels cinc membres que componen aquesta classe, només el mutant simple del gen *REVOLUTA* (*rev*), presenta un clar fenotip, el bloqueig del desenvolupament dels meristems secundaris de la roseta i les fulles caulinars que resulta en una menor producció de branques en la planta (Byrne, 2006). Els mutants simples dels gens *PHABULOSA* i *PHAVOLUTA* (*phb* i *phs*, respectivament), no mostren cap fenotip, i tampoc el seu doble mutant. Només quan s'obté el triple mutant *phb/phv/rev* es veu com el fenotip degut a *rev* s'agreuja, establint-se el paper redundat de *PHB* i *PHV* entre ells i amb *REV*. De manera similar, els mutants simples dels altres dos gens d'aquesta classe, *ATHB8* i *ATHB15* (*athb8* i *athb15*, respectivament) no mostren cap fenotip, i tampoc el seu doble mutant, però en el triple mutant *athb8/athb15/rev* es veu com els defectes en el desenvolupament dels meristems axil·lars i florals del mutant *rev* es suprimeixen, establint-se així la funció d'*ATHB8* i *ATHB15* (Byrne, 2006).

Estudis paral·lels a aquesta tesi realitzats en el nostre laboratori han mostrat que a part d'*ATHB2*, *ATHB4* i *HAT2*, l'expressió d'altres dos membres de la classe II de proteïnes HD-Zip, *HAT1* i *HAT3*, també està induïda per tractaments d'ombra simulada. L'estudi del fenotip de plantes de sobreexpressió i mutants per aquests dos gens, així com la obtenció de mutants múltiples dels membres d'aquesta família ens permetrien esbrinar si la hipòtesi de la redundància dels membres de la classe II en la regulació de les respostes de la SAS és certa.

Caracterització de *PAR1*

PAR1 va ser inicialment identificat en base la seva ràpida resposta a l'ombra a nivell d'expressió gènica (**figura R.3**), i classificat com a *PAR* diana primari de l'acció dels fitocroms en els experiments d'aplicació de CHX (**figura R.10**). Anàlisis paral·leles a aquesta tesi realitzades en el laboratori han identificat un gen altament homòleg a *PAR1*, al que hem anomenat *PAR2*, també induït per ombra, tot i que més lentament que *PAR1*. L'anàlisi de les seqüències de *PAR1* i *PAR2* ens ha permès classificar-los dins la superfamília de proteïnes bHLH (**figura R.40**). En estudis filogenètics realitzats en col·laboració amb el Dr.L. Carretero (Universitat d'Almeria) hem classificat *PAR1* i *PAR2* com part del grup de bHLH VIII-A (**figura R.40**), els membres del qual tenen un sol exó codificant el domini bHLH (Heim i col., 2003). *PAR1* i *PAR2* es localitzen en regions dels cromosomes 2 i 3 respectivament, les quals han patit duplicacions segmentals (Blanc i

col., 2000; Vision i col., 2000), suggerint que són el resultat d'un esdeveniment de duplicació recent. Fins al nostre coneixement, no hi ha cap informació funcional sobre cap dels membres del grup VIII. Durant aquesta tesi ens hem centrat en la caracterització de *PAR1*, un d'aquests dos nous membres de la subfamília VIII-A dels bHLH.

A través d'una estratègia de genètica inversa, generant plantes de sobreexpressió i silenciament de *PAR1*, hem vist que aquest factor té un efecte clar sobre el desenvolupament, sobretot sobre l'allargament i la pigmentació de la planta. Els caràcters afectats per la sobreexpressió de *PAR1* en plàntules transgèniques també estan afectats per tractaments d'ombra simulada, però en direccions oposades: mentre les plantes tractades amb ombra simulada són típicament allargades i més pàl·lides que les no tractades (**figura R.15**), les plàntules que sobreexpressen *PAR1* són més curtes i més fosques que les silvestres (**figura R.42**). A més, aquestes plantes presenten un hipocòtil més curt que el de les plantes silvestres en D i són lleugerament hipersensibles a fluències baixes i intermèdies de llum R i FR (**figura R.44**). També tenen una arrel més curta que la de plantes silvestres en W (**figura R.49**). Tots aquests resultats indiquen que *PAR1* és un regulador negatiu del creixement longitudinal de la planta, que a més té un paper específic en les respostes de la SAS. Plantes de sobreexpressió de *PAR2* generades també en el laboratori mostraven un fenotip i unes respostes de la SAS molt similars a les de la sobreexpressió de *PAR1*.

L'estratègia del RNA d'interferència utilitzada per silenciar l'expressió de *PAR1* va resultar també en el silenciament del seu homòleg *PAR2* (**figura R.45**). La reducció en els nivells de *PAR1* i *PAR2* resulta en un lleuger allargament dels cotilèdons i les fulles primàries en llum W, molt similar a una resposta de la SAS suau constitutiva (**figura R.47**). A més, aquestes plantes responen lleugerament més a l'ombra simulada (**figura R.47**). La reducció dels nivells de *PAR1* i *PAR2* també provoca una severa disminució de la producció de llavors (**figura R.46**), un tret fenotípic que s'ha descrit que està afectat de manera similar per la SAS (Smith i Whitelam, 1997). La correlació negativa entre els nivells de *PAR1* i *PAR2* i les respostes de desenvolupament a l'ombra simulada suggereix de nou que *PAR1* i *PAR2* són reguladors negatius de la SAS. Les plantes *PAR1*-RNAi presenten un hipocòtil lleugerament més llarg que el de les plantes silvestres en D i fluències intermèdies de R (**figura R.48**). Tot i que l'anàlisi d'una sola línia no és suficient per concloure el comportament de les plantes *PAR1*-RNAi durant la desetiolació, aquests resultats suggereixen que les línies *PAR1*-RNAi de *PAR1* podrien ser hiposensibles a R en fluències intermèdies de llum. També presenten arrel més llargues que les silvestres en W (**figura R.49**). Tots aquests fenotips, contraris als de les plantes de sobreexpressió, de nou recolzen la idea que *PAR1* és un regulador del creixement longitudinal de la planta, que a més té un paper específic en les respostes de la SAS.

Que les plantes *PAR1*-RNAi presentin fenotips més subtils que les de sobreexpressió és consistent amb el fet que l'ombra simulada no només afecta l'expressió de *PAR1*, sinó també una àmplia varietat de reguladors tant positius com negatius de la SAS. En aquest context de xarxa transcripcional, els mutants deficients en un sol gen

diana primari o primerenc dels fitocroms, com els silenciats en aquest treball, s'espera que tinguin un efecte suau en els fenotips estudiats. Consistentment, en el nostre laboratori les plantes mutants per HFR1, un regulador negatiu mestre durant la SAS (Sessa i col., 2005) mostren un fenotip moderat qualitativa i quantitativament similar al de les línies PAR1-RNAi. La sobreproducció o el silenciament de cadascun dels factors individuals que participen en la regulació de les respostes de la SAS adreçarà la contribució de cada component a diferents aspectes del desenvolupament de la planta induït per ombra, tals com l'allargament de la planta i el metabolisme.

Quant a l'estructura subcel·lular, les plantes que sobreexpressen PAR1 tenen cloroplasts amb grans de midó més petits i menys abundants que els dels cloroplasts silvestres (**figura R.43**). Tot i no haver-ho quantificat, aquestes cèl·lules semblen tenir menor quantitat de cloroplasts. S'ha descrit que el número de cloroplasts per cèl·lula està altament correlacionat amb la mida d'aquesta (Lopez-Juez i Pyke, 2005). De manera que el nanisme de les plantes de sobreexpressió de *PAR1* podria provocar el menor número de cloroplasts. La reducció del número i mida dels grans de midó provocaria una menor acumulació de midó en les plantes que sobreexpressen *PAR1*. En aquest cas no podem correlacionar aquesta disminució amb una inversió en el creixement de la planta, ja que les plantes de sobreexpressió de *PAR1* són nanes. En aquestes plantes també observem un menor número de plastoglòbuls que en les plantes silvestres. En canvi, la reducció comentada en la mida i el número de grans de midó resulta en un increment d'estructures membranoses, tot i que aquestes no semblen estar organitzades en grana. Podria ser, per tant, que aquesta major presència de membranes permetés la major acumulació de carotenoides i clorofil·les observada en aquestes plantes transgèniques (**figura R.42C**), ja que les clorofil·les es troben associades als complexos antena dels tilacoides, com ho estan part dels carotenoides. PAR1 està clarament implicat en la regulació dels canvis en l'estructura i metabolisme dels cloroplasts, tot i que es necessitarien més anàlisis per poder correlacionar aquests canvis amb el paper de PAR1 com a regulador negatiu de la SAS.

Les plantes de sobreexpressió de *PAR1* i de silenciament de *PAR1* i *PAR2* mostren fenotips semblants als de mutants de diferents hormones: auxines, BRs, CKs, o GAs (Halliday i Fankhauser, 2003). Per intentar identificar si hi ha una hormona responsable del fenotip de les plantes mutants *PAR1*, hem testat la sensibilitat dels mutants a una determinada hormona i/o a un agent que bloqueja la biosíntesi d'aquesta. Sovint diferents hormones estan implicades en la regulació d'un mateix procés (com passa en el control de la expansió i divisió cel·lular...), de manera que no resulta possible identificar una única hormona responsable del fenotip d'un determinat mutant.

Els mutants deficients en la biosíntesi de GAs (mutants *ga*) (Davies, 2004) tenen un fenotip nan i verd fosc característic. A més, sovint tenen defectes en la germinació de les llavors i/o el desenvolupament de la flor i el fruit en certes espècies. Aquests mutants presenten baixos nivells de GAs bioactives, i es pot recuperar el fenotip silvestre mitjançant l'aplicació de GAs. Els mutants deficients en la senyalització de GAs tenen

fenotips similars, però un alt contingut en GAs bioactives i el fenotip silvestre no es pot recuperar mitjançant l'aplicació de GAs (per exemple, mutant *gai-1d*) (Davies, 2004). Contràriament, els mutants amb les respostes a GAs constitutivament actives són molt llargs i tenen un color verd pàl·lid (per exemple, mutant *spy*) (Davies, 2004). El fenotip nan de les plantes de sobreexpressió de *PAR1* no es recuperava per l'aplicació exògena de GA_3 (**figura R.50**) i la quantificació dels nivells de GAs endògenes aquestes plantes no va mostrar diferències significatives amb el contingut de GAs de les plantes silvestres (**figura R.51**), indicant que aquestes plantes no eren deficientes en la biosíntesi ni en la senyalització de GAs. Per tant, es va descartar la relació de les GAs amb el fenotip de les plantes mutants *PAR1*.

Els mutants deficientes en la biosíntesi de BRs (mutants *dwf*) (Davies, 2004) tenen un fenotip nan però robust, baixa fertilitat, fulles petites i arrodonides, diferenciació vascular irregular i estan desetiolats en la foscor. Es caracteritzen perquè el fenotip silvestre es pot recuperar mitjançant l'aplicació de BRs. El fenotip nan de les plantes de sobreexpressió de *PAR1* però, tampoc es recuperava per l'aplicació exògena de BRs, concretament BL (**figura R.52**), el que ens va fer descartar que el fenotip nan d'aquestes plantes es degués a nivells baixos de BRs. El mutant *bri1*, que acumula brassinòlide en quantitats 40 cops més altes que les plantes silvestres, també presenta un fenotip nan que recorda al de les plantes de sobreexpressió de *PAR1* (Davies, 2004). Aquest mutant és insensible a l'aplicació exògena de BRs, però té la sensibilitat a BRZ, inhibidor de la biosíntesi de BRs, alterada (Yin i col., 2005). És per això que vam testar la resposta de les plantes mutants de *PAR1* a BRZ (**figura R.53**), no podent correlacionar els nivells de *PAR1* amb la resposta al BRZ. El conjunt d'aquests resultats ens va fer descartar els BRs com a hormones responsables del fenotip de les plantes mutants *PAR1*.

De la mateixa manera que existeixen mutants insensibles a l'aplicació de GAs o BRs, també s'han identificat mutants com *cre1*, insensibles a l'aplicació de CKs (Davies, 2004). El mutant *cre1* presenta una sensibilitat a CKs reduïda, i l'allargament de les seves arrels, al contrari del que passa en plantes silvestres, no s'inhibeix al aplicar CKs, concretament 6-BAP. Al aplicar 6-BAP a les plantes *PAR1*-RNAi i mesurar la resposta en la inhibició de l'allargament respecte a plantes silvestres vam veure que la taxa d'inhibició en ambdues línies era la mateixa, indicant que les plantes *PAR1*-RNAi no tenen alterada la sensibilitat a CKs (**figura R.54**). Això ens ha fet descartar la insensibilitat a CKs com a causa del fenotip de les línies mutants *PAR1*.

Finalment es va estudiar la relació de les hormones auxines amb el fenotip de les plantes mutants *PAR1*, ja que els mutants insensibles a auxines també presenten fenotip nan. La resposta a l'aplicació d'auxines exògenes no està afectada en les plantes *PAR1*-RNAi (**figura R.55**), la qual cosa indicaria que la sensibilitat a auxines no està alterada en aquestes plantes. Tenim previst la quantificació en breu del contingut d'auxines en plantes silvestres i de sobreexpressió de *PAR1*. Aquestes dades ens permetran esbrinar si les auxines estan implicades en el fenotip nan d'aquestes plantes.

El conjunt dels nostres resultats d'aplicació exògena d'una determinada hormona i/o un inhibidor de la biosíntesi d'aquesta no ens ha permès concloure la implicació única de cap hormona en el fenotip de les plantes mutants *PAR1*, i per tant en la seva acció.

Tot i no haver establert el paper de cap hormona en l'acció de *PAR1*, l'estudi de la seva seqüència va aportar informació sobre la seva possible acció. Com s'ha comentat, la comparació de la seqüència de *PAR1* amb altres proteïnes conegudes ens va indicar que podia tractar-se d'una proteïna bHLH atípica. Malgrat no poder identificar senyals de localització nuclear en *PAR1* amb cap programa informàtic, la fusió de *PAR1* al gen reporter *GFP* ha mostrat que *PAR1* és una proteïna nuclear (**figura R.55**). Paral·lelament en el laboratori es va observar la localització nuclear de *PAR2*. A més, mitjançant l'ús de línies transgèniques en les que podíem induir la localització nuclear de *PAR1* observarem que aquesta localització nuclear és necessària per a que el fenotip nan característic de les plantes de sobreexpressió de *PAR1* es manifesti (**figura R.56**). Aquestes dades demostren que la localització nuclear es requereix per l'activitat de *PAR1*, suggerint un paper d'aquest atípic bHLH com a regulador transcripcional. Per adreçar aquest punt vam estudiar si la fotoregulació de l'expressió de *PARs* primaris (com *ATHB2*, *PIL1* i *HFR1*) estava alterada per diferents nivells de *PAR1*. No es van observar canvis en l'expressió d'aquests *PAR* en cap de les línies mutants de *PAR1* utilitzades respecte a les silvestres (**figures R.58 i R.59**), indicant que *PAR1* no és un regulador mestre d'aquests 3 gens en la resposta de la SAS. Això contrastava amb els resultats obtinguts per altres autors per a *HFR1*, per al que s'havia descrit que regulava l'expressió d'alguns *PAR* primaris, entre ells *PAR1* (Sessa i col., 2005). Vam cercar gens regulats per *PAR1* en una estratègia de molt més gran abast comparant el transcriptoma de plantes silvestres amb el de plàntules de sobreexpressió de *PAR1* (que presenten nivells d'expressió aproximadament 20 cops més elevats que les silvestres, **figura R.60**) mitjançant l'anàlisi de micromatrius de RNA. Segons les dades d'aquesta anàlisi, l'expressió de *PAR1* en les plantes de sobreexpressió només era 2.05 cops més alta que en les silvestres (**figura R.60**), la qual cosa ens fa pensar que els nivells d'inducció de l'expressió dels gens presents al xip estan en general subestimats en aquesta anàlisi de micromatrius.

Tot i això, cal destacar la identificació d'un grup de gens significativament reduïts en les plantes de sobreexpressió de *PAR1*, els *SAURs* (**figura R.61**). Els 23 *SAURs* identificats van ser classificats en tres grups basant-nos en la similitud de la seva seqüència (**figura R.62**), i es procedí a l'estudi més detallat de l'efecte de *PAR1* sobre l'expressió d'un representant de cada grup. L'expressió d'un d'ells no era detectable per *northern-blot*, la qual cosa va fer descartar el seu estudi, centrant-nos només en *SAUR15* i *SAUR68*.

La comprovació per *northern-blot* de les dades de les micromatrius sembla confirmar que l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68* estava reprimida per *PAR1* (**figura R.63**), tot i que la baixa expressió de *SAUR15* i *SAUR68* dificultà aquestes anàlisis. És per això que, basant-nos en la informació disponible que descrivia els *SAURs* com a gens induïts per auxines i BRs (Goda i col., 2002; Goda i col., 2004), vam realitzar tractaments amb

l'auxina sintètica 2,4-D i el BL, per augmentar els nivells d'expressió d'aquests dos gens i així fer més evident la repressió exercida per PAR1. El que vam veure és que PAR1 reprimeix la inducció per auxines i també per BRs de l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68* (**figura R.64**). Aquests resultats junt amb els mostrats a la **figura R.63** indiquen que PAR1 actuaria *in vivo* com a repressor transcripcional de com a mínim dos gens, *SAUR15* i *SAUR68*.

Per testar si l'efecte de PAR1 sobre l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68* era directe, vam realitzar els tractaments amb auxines i BRs sobre línies transgèniques 35S:PAR1-GR en les que podíem induir la localització nuclear de PAR1 mitjançant l'aplicació de DEX. L'efecte repressor de PAR1 en l'expressió induïda per auxines i BRs dels dos *SAURs* es va observar només 4h i 2h després de l'aplicació de DEX, respectivament (**figura R.65**). Aquests temps d'acció són semblants amb els que s'han observat per altres fusions FT-GR sobre els seus gens diana directes (Sablowski i Meyerowitz, 1998; Ohgishi i col., 2001; Craft i col., 2005). Això reforça la idea de que l'acció de PAR1 en la regulació de l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68* podria ser directa. Per demostrar-ho hauríem de realitzar experiments similars als que ens vam permetre identificar els gens diana primaris dels fitocroms en la SAS (**figura R.10**), però ens trobem amb l'inconvenient que l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68* està induïda per CHX (**figura R.66**), tal i com hem vist que passa per altres gens induïts per auxines, com HAT2 (**figura R.10**).

Les vies de senyalització d'auxines i BRs convergeixen al nivell de la regulació transcripcional de gens diana amb elements reguladors comuns (revisat a Halliday, 2004), essent *SAUR15* i *SAUR68* dues d'aquestes dianes duals (Goda i col., 2004). Anàlisis de promotors només regulats per auxines i de promotors regulats per auxines i BRs van identificar elements G-box i E-box, respectivament (Nemhauser i col., 2004), ambdós reconeguts per com a mínim alguns membres bHLH. Malgrat no haver-se caracteritzat molecular o bioquímicament cap membre bHLH del grup VIII (al qual pertany PAR1), s'ha suggerit que no tenen cap habilitat per unir DNA. El que sí podrien formar són heterodímers, actuant com a reguladors negatius d'altres FTs, en particular de les proteïnes bHLH (Atchley i col., 1999; Heim i col., 2003; Toledo-Ortiz i col., 2003). Podem doncs especular que el mecanisme molecular rere aquest efecte repressor de PAR1 estaria la seva habilitat per inhibir l'activitat d'unió a DNA d'activadors de la transcripció després d'heterodimeritzar amb ells (Cahill i col., 1994) (**figura D.1**).

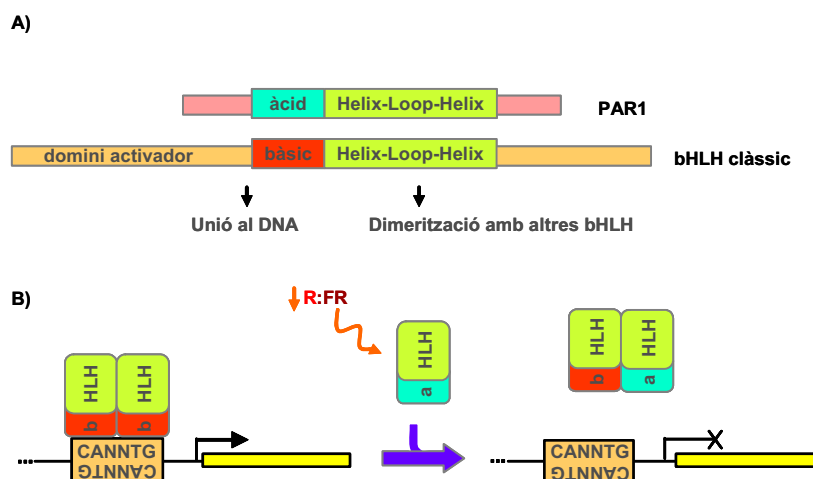


Figura D.1. Esquema de l'hipotètic mecanisme d'acció de PAR1. **A**, dominis estructurals de PAR1 i d'un FT bHLH clàssic. **B**, en absència de PAR1, un FT bHLH determinat es trobaria en forma de dímer unit a la caixa E-box del promotor del gen al que regula mitjançant el domini bàsic, induint la seva transcripció. En presència de PAR1, aquest heterodimeritzaria amb el factor bHLH, impedit-li la unió al promotor del gen al que regula, la transcripció del qual estaria reprimida.

La identificació, d'entre els gens regulats per PAR1, del grup de gens *SAUR* i el fet que PAR1 estigui regulant la seva inducció per les hormones auxines i BRs resulta molt atractiu, ja que aquests resultats ens porten a hipotetitzar que la senyalització per llum i la senyalització per hormones conflueixen a nivell dels gens *SAUR*, més concretament a nivell de la regulació de la seva expressió, i que PAR1 n'és un dels contribuents. El fet que PAR1 reguli l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68*, que alhora estan regulats per auxines i BRs, i en canvi no haver trobat cap efecte d'aquestes hormones sobre les plantes mutants *PAR1* podria estar indicant que PAR1 afecta només una branca comuna de la senyalització d'aquestes dues hormones (uns determinats gens *SAUR*, per exemple), sense tenir un efecte global en la biosíntesi o senyalització d'aquestes.

L'anàlisi de la relació SAS-hormones (auxines i BRs) ha mostrat una clara implicació de les auxines en les respostes primerenques de la SAS. Tractaments d'ombra simulada provoquen un augment en l'activitat GUS de la línia transgènica DR5:GUS, descrita com a induïble per auxines i BRs, el que pot estar indicant un augment d'auxines i BRs en la planta en resposta a l'ombra simulada (**figura R.69**). La combinació de tractaments d'ombra simulada amb l'aplicació de NPA, inhibidor del transport polar d'auxines, ens indicà que s'està produint un clar augment dels nivells d'auxines en la planta, ja que l'activitat GUS s'acumula a la part apical de la planta (**figura R.70**). Degut a que l'aplicació de BL en aquestes línies no provoca canvis en l'activitat GUS durant almenys 12h de tractament (**figura R.68**) estaria indicant que en les nostres condicions experimentals el promotor DR5 no respon a aquesta hormona, pel que el tractament amb ombra simulada estaria detectant únicament un increment en els nivells d'auxines de la planta. La quantificació directa dels nivells d'auxines i de BRs ens permetria clarificar aquests punts.

Després de la percepció de l'ombra simulada, les xarxes de senyalització per llum s'encreuen amb les hormonals, responsables de moltes de les respostes fototròpiques de la planta. Així, se sap que les auxines juguen un paper en les respostes de la planta a la qualitat de la llum (Steindler i col., 1999; Tian i col., 2002; Halliday i Fankhauser, 2003). Després del transport i l'acumulació d'auxines, els gens de resposta a auxines (incloent *Aux/IAA*, *GH3* i els gens *SAUR*) són induïts, iniciant cascades de senyalització (cascades transcripcionals) que finalment porten a l'expansió cel·lular. Nosaltres hem trobat que l'ombra simulada també afecta ràpida però transitòriament l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68* (**figura R.63**). Altres autors han trobat que l'ombra simulada afecta ràpidament l'expressió d'altres gens de resposta a auxines, com cinc membres del grup *Aux/IAA* i dos membres de la família *PIN* que codifiquen proteïnes transportadores d'auxines, entre altres (Devlin i col., 2003). Els canvis en l'expressió dels gens *SAUR* en resposta a auxines i BRs podrien ser un marcador de la sensibilitat a auxines i BRs exògens, i per extensió, endògens. Les nostres dades poden doncs ser interpretades com una atenuació de la sensibilitat a aquestes hormones per nivells elevats de *PAR1* (**figura R.64A**). Així, l'efecte repressor primerenc de *PAR1* sobre la inducció de *SAUR15* i *SAUR68* en resposta a auxines i BRs estableix un mecanisme dual (i potencialment directe) per integrar la percepció de l'ombra i les vies de senyalització hormonals, en el que *PAR1* podria tenir un paper clau.

5. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Dels resultats que s'exposen en aquest treball es poden extreure les següents conclusions:

1. L'ombra simulada resulta en la ràpida inducció d'almenys 8 gens: *ATHB2*, *ATHB4*, *GAI*, *HAT2*, *PAR1*, *PHYB*, *PIL1* i *RIP*, en aràbidopsis, als que hem anomenat *PARs*. La regulació de l'expressió dels *PARs* per ombra simulada és exclusivament dependent dels fotoreceptors fitocroms, essent la inducció de la seva expressió per l'ombra simulada un alliberament de la repressió que exerceix la forma activa dels fitocroms.
2. *ATHB2*, *ATHB4*, *GAI*, *PAR1*, *PHYB* i *PIL1* són dianes directes de l'acció dels fitocroms durant la SAS. La fotoregulació d'*ATHB2*, *ATHB4*, *GAI*, *PAR1* i *RIP* es dona, almenys en part, pel seu control transcripcional. No obstant, les seves regions promotores no contenen cap dels elements de regulació per PIFs descrits fins ara.
3. COP1 i DET1, factors identificats genèticament com a reguladors tardans de la transducció del senyal lumínic durant la desetioliació, també participen en la fotoregulació d'*ATHB2*, *ATHB4*, *GAI*, *PAR1*, i *PIL1* per l'ombra simulada, revelant que COP1 i DET1 són reguladors primerencs de la transducció del senyal lumínic durant la SAS. En canvi, altres factors com HY5, només juguen un paper en la desetioliació.
4. Les plàntules d'aràbidopsis responen fenotípicament a l'ombra simulada de manera clara, allargant els hipocòtils, els cotilèdons i les fulles primàries. L'ombra simulada també provoca una disminució dels pigments clorofil·les i carotenoides, i canvis en l'estructura i metabolisme dels cloroplasts. Espècies properes a *Arabidopsis thaliana* mostren respostes fisiològiques i moleculars a l'ombra simulada similars.
5. L'estratègia genètica iniciada per a la identificació de mutants amb resposta a l'ombra alterada ens ha permès obtenir 28 línies mutants amb respostes moleculars a l'ombra simulada alterades. Les anàlisis fisiològiques del mutant I2.164 mostren que es tracta d'un mutant autènticament fotomorfogènic, el que valida l'estratègia emprada.
6. L'estudi del fenotip de plantes que sobreexpressen *ATHB4* suggereix un paper per aquest factor molt similar al descrit per a *ATHB2* en la regulació de les respostes de la SAS. L'absència d'un fenotip obvi en les plantes mutants *athb2-1*, *athb4-1* i *athb2/athb4* podria estar indicant una redundància de funció amb altres membres de la mateixa família en la regulació d'aquestes respostes.

7. Les anàlisis funcionals de PAR1 per genètica inversa indiquen que PAR1 és un regulador negatiu de la SAS.
8. PAR1 és una proteïna bHLH atípica, perquè presenta una regió àcida enlloc de la regió bàsica típica dels membres d'aquesta superfamília. A més, és una proteïna nuclear, que necessita ser al nucli per ser activa. Això suggereix que es tracta d'un factor o cofactor de la transcripció.
9. PAR1 reprimeix ràpidament la inducció per auxines i brassinosteroides de l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68*. Això suggereix que la senyalització per hormones (auxines i brassinosteroides) i la senyalització per llum conflueixen a nivell dels promotors d'aquests dos gens.
10. L'ús de la línia marcador dels nivells d'auxines en la planta DR5:GUS suggereix que els tractaments d'ombra simulada provoquen ràpids increments dels nivells d'aquestes hormones als cotilèdons.

5. MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

A continuació es descriuen tant els materials com els protocols més utilitzats durant el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral. Els mètodes generals de manipulació d'àcids nucleics i proteïnes, així com els relacionats amb el cultiu i manipulació de bacteris es van realitzar segons els protocols descrits a *Molecular cloning: A laboratory Manual* (Sambrook, 2001) i *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, 1989).

Els mètodes que es descriuen s'han optimitzat durant aquest treball o es consideren d'especial interès en la realització d'aquesta tesi.

L'aigua utilitzada va ser aigua destil·lada o, en el cas de les solucions utilitzades en els experiments de bioquímica i biologia molecular, aigua bidestil·lada (amb el destil·lador i desionitzador d'aigua Millipore Milli-Q).

Les solucions utilitzades es van esterilitzar per calor humit (mitjançant autoclau de vapor d'aigua a 120°C i una atmosfera de pressió, durant 20 min, s'indica com (autoclau)) o mitjançant filtració (s'indica com (filtració)). El pH dels medis i solucions s'ajusta abans de sotmetre'ls als cicles d'autoclau.

1. Material biològic

1.1. MATERIAL BACTERIÀ

1.1.1. Soques bacterianes

En aquest treball s'han utilitzat les següents soques bacterianes:

- **DH5 α F'**: soca d'*Escherichia coli* utilitzada per als clonatges de vectors.
- **TOP10**: soca d'*Escherichia coli* utilitzada per als clonatges de vectors.
- **C₁C₅₈/GV2260**: soca d'*Agrobacterium tumefaciens* utilitzada per al clonatge de vectors binaris utilitzats per a la transformació de plantes.

1.1.2. Obtenció de cèl·lules competents per xoc tèrmic

El protocol que es descriu a continuació el vam utilitzar per obtenir les cèl·lules competents per xoc tèrmic d'*Escherichia coli*.

Convé que les cèl·lules de partida siguin recents i vigoroses, per la qual cosa vam refrescar les cèl·lules fent un cultiu en placa i fent créixer aquest cultiu en líquid.

Procediment:

1. Inocular 4 ó 5 colònies aïllades de la soca utilitzada en 50 mL de medi LB.
2. Incubar en agitació (300 rpm) a 37°C fins que la D.O.₆₀₀ = 0.5 ± 0.1 (2-3h).

3. Refredar el cultiu en gel durant 10 min.
4. Centrifugar el cultiu 10 min. a 4000xg a 4°C.
5. Descartar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 15 mL de TBF1.
6. Incubar en gel durant 10 min.
7. Centrifugar 10 min. a 4000xg a 4°C.
8. Descartar el sobrenedant i invertir el tub durant 1 min., per tal d'eliminar totalment les restes del tampó TBF1.
9. Resuspendre el sediment en 2 mL de TBF2 fred.
10. Aliquotar les cèl·lules en fraccions de 100 µL en tubs eppendorf estèrils i congelar-les en neu carbònica. Guardar-les a -80°C (es poden guardar durant 1 any).

Solucions:

- **Tampó TBF1 (filtració):** KOAc 30 mM pH 5.8 (equilibrar amb AcOH 2N), MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10 mM, RbCl 100 mM, glicerol 15 % (v/v).

- **Tampó TBF2 (filtració):** MOPS pH 7.0 10 mM (equilibrar amb NaOH 10N), CaCl₂ 75 mM, RbCl 10 mM, glicerol 15 % (v/v).

1.1.3. Obtenció de cèl·lules electrocompetents

El protocol que es descriu a continuació el vam utilitzar per obtenir les cèl·lules electrocompetents d'*Agrobacterium tumefaciens*. De nou convé que les cèl·lules de partida siguin recents i vigoroses, per la qual cosa es recomana refrescar les cèl·lules fent-les créixer en placa i posteriorment fent un cultiu líquid.

Procediment:

1. Créixer O/N un cultiu de la soca C₁C₅₈ GV2260 d'*A.tumefaciens* en medi YEB amb rifampicina i carbenicil.lina, en agitació a 28°C.
2. Inocular un cultiu de 200 mL amb 2 mL (1/100 volums) del cultiu crescut O/N i incubar a 28°C en agitació fins que la D.O.₆₀₀ = 0.5-0.8 (aproximadament unes 2.5-3h).
3. Refredar el cultiu en gel de 15 a 30 min.
4. Centrifugar 20 min. a 4000xg a 4°C i descartar el sobrenedant.
5. Resuspendre les cèl·lules en 1 volum del cultiu inicial d'aigua estèril refredada en gel. Anar en compte de no lisar les cèl·lules.
6. Centrifugar 20 min. a 4000xg a 4°C i descartar el sobrenedant.
7. Repetir els passos 5 i 6, resuspenent les cèl·lules en ½ volum del cultiu inicial d'aigua estèril refredat en gel.
8. Resuspendre les cèl·lules en 1/50 volum del cultiu inicial en glicerol 10% refredat en gel.

9. Centrifugar 20 min. a 4000xg a 4°C i descartar el sobrenedant.
10. Resuspendre les cèl·lules en 1/100 volums del cultiu inicial de glicerol 10% refredat en gel. La concentració de cèl·lules ha de ser $1-3 \times 10^{10}$ cèl·lules/mL.
11. Fer alíquotes de 50 µL, congelar en neu carbònica i guardar a -80°C.

1.1.4. Medis de cultiu bacterians

Els medis, tampons i solucions utilitzats rutinàriament per al treball amb bacteris en aquesta tesi van ser:

- **Medi LB pH 7.5 (autoclau):** bactotripton 100 g/L, extracte de llevat 5 g/L i NaCl 10 g/L. Ajustar el pH amb NaOH. Per al medi sòlid s'afegeix 15 g/L d'agar.

- **Medi YEB pH 7.2 (autoclau):** extracte de carn 5 g/L, extracte de llevat 1 g/L, peptona 5 g/L, sacarosa 5 g/L i $MgSO_4$ 1 M 2 mL/L. Per al medi sòlid s'afegeix 15 g/L d'agar.

1.1.5. Suplements dels medis de cultiu bacterians

Els únics suplements que s'han afegit als medis bacterians han estat antibiòtics. A la **taula M.I** es mostren els diferents antibiòtics utilitzats, les concentracions de les solucions estoc i el dissolvent en el que es preparen, i les concentracions de treball.

Antibiòtic	Estoc	Dissolvent	Concentració de treball		
			<i>E.coli</i>	<i>A.tumefaciens</i>	<i>A.thaliana</i>
Ampicil·lina (Amp) Carbenicilina (Cb)	100 mg/mL	etanol 50%	100 µg/mL	100 µg/mL	-
Kanamicina (Km)	50 mg/mL	aigua	25 µg/mL	25 µg/mL	25 mg/L
IPTG	23.8 mg/mL	aigua	23.8 µg/mL	-	-
X-GAL	20 mg/mL	DMF	40 µg/mL	-	-
Rifampicina (Rf)	50 mg/mL	DMSO	-	100 µg/mL	-
Higromicina (Hyg)	50 mg/mL	?	-	-	30 mg/L
Cefotaxima (Cf)	100 mg/mL				100 mg/L

Taula M.I. Antibiòtics utilitzats en el treball amb els bacteris *E.coli* i *A.tumefaciens* i amb plantes d'*A. thaliana*.

1.1.6. Condicions de cultiu de bacteris

El cultiu líquid de cèl·lules d'*E.coli* es realitza en tubs de cultiu a 37°C en agitació a 250 rpm. El cultiu sòlid es realitza en placa a 37°C.

El cultiu líquid de cèl·lules d'*A.tumefaciens* es realitza en tubs de cultiu a 28°C en agitació a 250 rpm. El cultiu sòlid es realitza en placa a 28°C.

Els cultius o soques bacterianes s'emmagatzemen permanentment en glicerol 25% a -80°C.

1.2. MATERIAL VEGETAL

1.2.1. Ecotips silvestres

En aquest treball s'han emprat plantes d'*Arabidopsis thaliana* dels ecotips Columbia-0 (Col-0), Nossen (No-0), Landsberg *erecta* (Ler) i Wassilewskija (Ws). A part d'*Arabidopsis thaliana* s'han utilitzat les espècies *Arabidopsis griffithiana*, *Arabidopsis korshinskyi* i *Arabidopsis pumila*.

1.2.2. Línies transgèniques

- **LhGR-4c**: La línia transgènica en la que el gen reporter GUS és un gen diana directe del FT LhGR (Craft i col., 2005). Cedida pel Dr. I. Moore.

- **AOX i ABO**: Línies de sobreexpressió del *PHYA* d'avena (Boylan i Quail, 1991) i del *PHYB* d'arabidopsis (Wagner i col., 1991) respectivament. Cedides pel Prof. P. Quail.

➤ Línies utilitzades en les anàlisis dels promotors dels gens *PAR* (la generació d'aquestes construccions s'explica a l'apartat 1.3.2):

- **P_{ATHB4}:GG**: línia que sobreexpressa la fusió dels gens reporters *GFP-GUS* sota el control de 1 kb del promotor del gen *ATHB4*.

- **P_{GAI}:GG**: línia que sobreexpressa la fusió dels gens reporters *GFP-GUS* sota el control de 1 kb del promotor del gen *GAI*.

- **P_{PAR1}:GG**: línia que sobreexpressa la fusió dels gens reporters *GFP-GUS* sota el control del 1 kb del promotor del gen *PAR1*.

- **P_{RIP}:GG**: línia que sobreexpressa la fusió dels gens reporters *GFP-GUS* sota el control de 1 kb del promotor del gen *RIP*.

- **P_{ATHB2}:GG**: línia que sobreexpressa la fusió dels gens reporters *GFP-GUS* sota el control de 1 kb del promotor del gen *ATHB2*.

- **500 pb P_{ATHB2}:GG**: línia que sobreexpressa la fusió dels gens reporters *GFP-GUS* sota el control de 500 pb del promotor del gen *ATHB2*.

- **250 pb P_{ATHB2}:GG**: línia que sobreexpressa la fusió dels gens reporters *GFP-GUS* sota el control de 250 pb del promotor del gen *ATHB2*.

- **200 pb P_{ATHB2}:GG**: línia que sobreexpressa la fusió dels gens reporters *GFP-GUS* sota el control de 200 pb del promotor del gen *ATHB2*.

- **150 pb P_{ATHB2}:GG**: línia que sobreexpressa la fusió dels gens reporters *GFP-GUS* sota el control de 150 pb del promotor del gen *ATHB2*.

- **100 pb P_{ATHB2}:GG**: línia que sobreexpressa la fusió dels gens reporters *GFP-GUS* sota el control de 100 pb del promotor del gen *ATHB2*.

- **P_{35S}:G**: línia que sobreexpressa el gen reporters *GUS* sota el control del promotor constitutiu 35S.

- **P_{35S}:GG**: línia que sobreexpressa la fusió dels gens reporters *GFP-GUS* sota el control del promotor constitutiu 35S.

➤ Línia utilitzada en l'estratègia genètica per buscar nous factors de la transducció de la llum en resposta a l'ombra:

- **PBL**: línia que sobreexpressa el gen reporter de la luciferasa sota el control de 2290 pb del promotor del gen *PHYB*, en el fons genètic Ws (Bognar i col., 1999). Cedida pel Dr. A. Millar.

➤ Línies de sobreexpressió utilitzades en les anàlisis de la funció d'ATHB2 i ATHB4 (la generació d'aquestes construccions s'explica a l'apartat 1.3.2):

- **P_{35S}:ATHB2**: línia que sobreexpressa el gen *ATHB2* sota el control del promotor constitutiu 35S.

- **P_{35S}:ATHB4**: línia que sobreexpressa el gen *ATHB4* sota el control del promotor constitutiu 35S.

➤ Línies de sobreexpressió utilitzades en les anàlisis de la funció de PAR1 (la generació d'aquestes construccions s'explica a l'apartat 1.3.2):

- **P_{35S}:PAR1**: línia que sobreexpressa el gen *PAR1* sota el control del promotor constitutiu 35S.

- **P_{35S}:PAR1-G**: línia que sobreexpressa la fusió del gen *PAR1* i el gen reporter *GFP* sota el control del promotor constitutiu 35S.

- **P_{35S}:PAR1-GG**: línia que sobreexpressa la fusió del gen *PAR1* i el gens reporters *GUS-GFP* sota el control del promotor constitutiu 35S.

- **P_{35S}:GFP**: línia que sobreexpressa el gen reporter *GFP* sota el control del promotor constitutiu 35S.

- **P_{35S}:GUS-GFP**: línia que sobreexpressa els gens reporters *GUS-GFP* sota el control del promotor constitutiu 35S.

- **P_{35S}:PAR1-GR**: línia que sobreexpressa el gen *PAR1* fusionat al receptor de glucocorticoides (GR) sota el control del promotor constitutiu 35S.

➤ Línia utilitzada en les anàlisis de la relació entre les hormones auxines i BRs i la SAS:

- **DR5:GUS:** Línia que conté l'element sintètic de resposta a auxines DR5 fusionat al gen reporter GUS (Ulmasov i col., 1997).

1.2.3. Línies mutants de pèrdua de funció:

- **phyB-1:** La línia mutant va ser cedida pel Dr. R. Sharrock.

- **cop1-4 i cop1-6:** Les línies mutants foren cedides per Dr. X. W. Deng.

- **det1-1, det2-1, hy4 i hy5-1:** Les línies mutants van ser proveïdes pel Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC).

- **athb2-1:** Línia Salk_106790, proveïda pel NASC. Els mutants que procedeixen de la col·lecció SALK s'han generat per inserció del T-DNA del vector pROK2 amb el gen NPTII de resistència a Km en el genoma d'*Arabidopsis thaliana*, en fons genètic Col-0. Han estat generades en el laboratori del Dr. J. Ecker al SIGnAL (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, <http://signal.salk.edu/index.html>).

- **athb4-1:** Línia Salk_104843, proveïda pel NASC.

- **doblet mutant athb2/athb4:** línia obtinguda pel creuament de *athb2-1* i *athb4-1*.

- **PAR1-RNAi:** línia que sobreexpressa *PAR1* en direcció sentit i antisentit units per un intró sota el control del promotor constitutiu 35S amb la finalitat de silenciar l'expressió de *PAR1*.

1.2.4. Condicions de cultiu a l'hivernacle i al fitotró

Les plantes han estat cultivades en testos amb una barreja a parts iguals de torba, perlita i vermiculita.

Les condicions de cultiu a l'hivernacle han estat de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, una humitat ambiental del 55%, i 14h de llum i 10h de fosc, aproximadament. Al fitotró de SD les condicions han estat de $22\text{-}24^\circ\text{C}$, sense control d'humitat i 8h de llum i 16h de fosc.

En ambdós llocs les plantes han estat regades per inundació de les safates que contenen els testos 2-3 cops per setmana, segons les necessitats de les plantes. Dels 3 regs, 2 són amb aigua normal i un tercer amb una solució de fertirrigació molt diluïda (1:240).

Solucions:

- **Solució de fertirrigació:** Solució de Hoagli i Arnon (Hoagli i Arnold, 1938) modificada per Johnson i col., (1957). NO_3K 8.4 mM, NH_4NO_3 1.2 mM, K_2HPO_4 1.2 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7 mM, $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 mM. Aquesta solució es complementa amb el quelant de ferro Kelamix 35 mg/L i amb microelements 0.4 g/L.

1.2.5. Medis de cultiu de plantes

El medi Murashige i Skoog (medi MS) va ser utilitzat per germinar llavors i créixer les plantes en plaques de Petri i en condicions estèrils. En les ocasions que s'indica, s'ha afegit sacarosa al 2% al medi (20 g/L).

- **Medi MS 0.5% pH 5.8 (autoclau):** *Murashige & Skoog medium including vitamins* 2.15 g/L, MES 0.25 g/L. Ajustar el pH amb KOH. S'afegeix 8 g/L d'agar.

1.2.6. Suplements dels medis de cultiu de plantes

Els suplements que s'han afegit als medis bacterians han estat antibiòtics i hormones. A la **taula M.I** es mostren els diferents antibiòtics utilitzats, les concentracions de les solucions estoc i el dissolvent en el que es preparen, i les concentracions de treball. Les hormones i reguladors del creixement es detallen a l'apartat 2.4.6, quan es descriuen els diferents tractaments hormonalts duts a terme.

1.2.7. Condicions de cultiu *in vitro*

En condicions *in vitro*, les plàntules es van cultivar sota llum contínua o cicles de dia llarg (LD). Les condicions de cultiu en llum contínua s'especifiquen més endavant quan s'expliquen els diferents tractaments. Les condicions de cultiu en LD van ser de 14h llum i 10h fosc a 22-24°C de Ta, i humitat no controlada.

1.3. PLASMIDIS

1.3.1. Vectors

1.3.1.1. **Vectors de clonatge de productes de PCR**

- **pGEM-T Easy vector (Promega):** Vector utilitzat pel clonatge de productes de PCR pel sistema *T/A cloning*, Amp^R.

- **pTZ57R (Fermentas):** Vector utilitzat pel clonatge de productes de PCR pel sistema *T/A cloning*, Amp^R.

- **pCRII-TOPO (Invitrogen):** Vector utilitzat pel clonatge de productes de PCR pel sistema *T/A cloning*, Amp^R, Km^R.

- **PCR-Blunt (Invitrogen):** Vector utilitzat pel clonatge de productes de PCR pel sistema *T/A cloning*, Amp^R, Km^R.

1.3.1.2. **Vectors binaris**

- **pCAMBIA1302:** Vector binari per a la transformació d'agrobacterium que permet clonar un gen d'interès fusionat al gen reporter *GFP* sota el promotor constitutiu 35S. Km^R en bacteris i Hyg^R en plantes.

- **pCAMBIA1303:** Vector binari per a la transformació d'agrobacterium que permet clonar un gen d'interès fusionat als gens reporters *GUS-GFP* sota el promotor constitutiu 35S. Km^R en bacteris i Hyg^R en plantes.
- **pCAMBIA1304:** Vector binari per a la transformació d'agrobacterium que permet clonar un gen d'interès fusionat als gens reporters *GFP-GUS* sota el promotor constitutiu 35S. Km^R en bacteris i Hyg^R en plantes.
- **pCAMBIA2300:** Vector binari per a la transformació d'agrobacterium que permet clonar un gen d'interès sota el promotor constitutiu 35S. Km^R en bacteris i plantes.
- **pGI0029/35S/GR:** Variant del vector pGreen que permet clonar un gen d'interès fusionat al receptor de glucocorticoides (GR) sota el promotor constitutiu 35S. Km^R en bacteris i plantes.
- **pBinAr:** Vector binari per a la transformació d'agrobacterium que permet clonar un gen d'interès sota el promotor constitutiu 35S. Km^R en bacteris i plantes.

1.3.1.3. Altres vectors

- **pBS-SK+ (Stratagene):** Vector utilitzat pel clonatge intermedi de fragments. Amp^R.
- **pHANNIBAL:** Vector que permet clonar direccionalment fragments de PCR a banda i banda de l'intró PDK (Wesley i col., 2001), utilitzat per al silenciament gènic. Amp^R.

1.3.2. Construccions

CONSTRUCCIÓ	DESCRIPCIÓ
Construccions relacionades amb els promotors dels gens <i>PAR</i>	
pJF287	1 kb del promotor del gen <i>ATHB4</i> amplificada amb els encebadors JO291 i JO292 i subclonada en el vector pGEM-T <i>Easy</i>
pJF288= 1 kb P_{ATHB4}:GG	Fragment del pJF287 digerit amb HindIII-BamHI i subclonat en el vector binari pCAMBIA1304 digerit amb HindIII-BglII
pACV1	1 kb del promotor del gen <i>GAI</i> amplificada amb els encebadors JO319 i JO320 i subclonada en el vector pTZ57R
pACV3=1 kb P_{GAI}:GG	Fragment del pACV1 digerit amb PstI-BamHI i subclonat en el vector binari pCAMBIA1304 digerit amb PstI-BglII
pJF297	1 kb del promotor del gen <i>PAR1</i> amplificada amb els encebadors JO301 i JO302 i subclonada en el vector pGEM-T <i>Easy</i>
pJF299=1 kb P_{PAR1}:GG	Fragment del pJF297 digerit amb HindIII-BamHI i subclonat en el vector binari pCAMBIA1304 digerit amb HindIII-BglII
pJF298	1 kb del promotor del gen <i>RIP</i> amplificada amb els encebadors JO303 i JO304 i subclonada en el vector pGEM T-easy
pJF300=1 kb P_{RIP}:GG	Fragment del pJF298 digerit amb HindIII-BamHI i subclonat en el vector binari pCAMBIA1304 digerit amb HindIII-BglII

pJF278	1 kb del promotor del gen <i>ATHB2</i> amplificada amb els encebadors JO280 i JO281 i subclonada en el vector pGEM-T <i>Easy</i>
PJF279=1 kb P_{ATHB2}:GG	Fragment del pJF278 digerit amb HindIII-BamHI i subclonat en el vector binari pCAMBIA1304 digerit amb HindIII-BglII
pSP7	500 pb del promotor del gen <i>ATHB2</i> amplificada amb els encebadors JO280 i JO335 i subclonada en el vector pTZ57R
pSP10=500 pb P_{ATHB2}:GG	Fragment del pSP7 digerit amb HindIII-BamHI i subclonat en el vector binari pCAMBIA1304 digerit amb HindIII-BglII
pSP8	250 pb del promotor del gen <i>ATHB2</i> amplificada amb els encebadors JO280 i JO336 i subclonada en el vector pTZ57R
pSP11=250 pb P_{ATHB2}:GG	Fragment del pSP8 digerit amb HindIII-BamHI i subclonat en el vector binari pCAMBIA1304 digerit amb HindIII-BglII
pIR23	200 pb del promotor del gen <i>ATHB2</i> amplificada amb els encebadors JO280 i JO355 i subclonada en el vector pTZ57R
pIR27=200 pb P_{ATHB2}:GG	Fragment del pIR23 digerit amb HindIII-BamHI i subclonat en el vector binari pCAMBIA1304 digerit amb HindIII-BglII
pIR24	150 pb del promotor del gen <i>ATHB2</i> amplificada amb els encebadors JO 280 i JO356 i subclonada en el vector pTZ57R
pIR28=150 pb P_{ATHB2}:GG	Fragment del pIR24 digerit amb HindIII-BamHI i subclonat en el vector binari pCAMBIA1304 digerit amb HindIII-BglII
pIR25	100 pb del promotor del gen <i>ATHB2</i> amplificada amb els encebadors JO280 i JO357 i subclonada en el vector pTZ57R
pIR29=100 pb P_{ATHB2}:GG	Fragment del pIR25 digerit amb HindIII-BamHI i subclonat en el vector binari pCAMBIA1304 digerit amb HindIII-BglII
Construccions relacionades amb <i>ATHB2</i> i <i>ATHB4</i>	
pSP20	cDNA d' <i>ATHB2</i> amplificat per RT-PCR amb els encebadors JO282 i JO283 subclonat en el vector pTZ57R
pBF9= P_{35S}:ATHB2	Fragment del pSP20 digerit amb KpnI-BamHI i subclonat dins d'aquestes dianes en el vector binari pBinAr
pSP22	cDNA d' <i>ATHB4</i> amplificat per RT-PCR amb els encebadors JO284 i JO285 subclonat en el vector pTZ57R
pBF10= P_{35S}:ATHB4	Fragment del pSP22 digerit amb KpnI-BamHI i subclonat dins d'aquestes dianes en el vector binari pBinAr
Construccions relacionades amb <i>PAR1</i>	
pJF285n	cDNA de <i>PAR1</i> amplificat amb els encebadors JO289 i JO290 i subclonat en el vector pGEM-T <i>Easy</i>
pBF7	<i>PAR1</i> aïllat del vector pJF285 per digestió amb EcoRI i subclonat dins d'aquesta diana en el vector pBS-SK+

pJB1= P_{35S}:PAR1	<i>PAR1</i> aïllat del vector pBF7 per digestió amb KpnI i BamHI i subclonat dins d'aquestes dianes en el vector binari pBinAr
pACV9	cDNA de <i>PAR1</i> amplificat amb els encebadors JO329 i JO330 i subclonat en el vector pTZ57R
pBF1= P_{35S}:PAR1-G	<i>PAR1</i> aïllat del vector pACV9 per digestió amb NcoI i SpeI i subclonat dins d'aquestes dianes en el vector binari pCAMBIA1302
pSP14= P_{35S}:PAR1-GG	<i>PAR1</i> aïllat del vector pACV9 per digestió amb NcoI i SpeI i subclonat dins d'aquestes dianes en el vector binari pCAMBIA1303
pBF6	<i>PAR1</i> aïllat del vector pACV9 per digestió amb XbaI i BamHI i subclonat dins d'aquestes dianes en el vector pGreen0029
pIR33= P_{35S}:PAR1-GR	<i>PAR1-GR</i> aïllat del vector pBF6 per digestió amb XbaI i EcoRI i convertit en extrems roms amb l'enzim Klenow i subclonat en el vector binari pBinAr digerit amb SmaI
pACV4	cDNA de <i>PAR1</i> amplificat amb els encebadors JO331 i JO332 i subclonat en el vector pTZ57R
pACV5	<i>PAR1</i> aïllat del vector pACV4 per digestió amb XhoI-KpnI i subclonat dins d'aquestes dianes en el vector pHANNIBAL
pACV6	<i>PAR1</i> aïllat del vector pACV4 per digestió amb XbaI-HindIII i subclonat dins d'aquestes dianes en el vector pACV5
pACV7= PAR1-RNAi	Fragment del pACV6 digerit amb PstI-SacI i subclonat dins d'aquestes dianes en el vector binari pCAMBIA2300
Construccions per obtenir sondes	
pJF281	DNA genòmic d' <i>ATHB2</i> amplificat per PCR amb els encebadors JO282 i JO283 i subclonat dins del vector pGEM-T Easy
pJF282	DNA genòmic d' <i>ATHB4</i> amplificat per PCR amb els encebadors JO284 i JO285 i subclonat dins del vector pGEM-T Easy
pOX3	cDNA de <i>GAI</i> amplificat per PCR amb els encebadors JO297 i JO298 i subclonat dins del vector pCR-Blunt
pIR4	Fragment de 1173 pb de <i>HAT2</i> amplificat per PCR sobre DNA genòmic amb els encebadors RO3 i RO4 i subclonat dins del vector pTZ57R
pIR5	Fragment de 1600 pb de <i>HAT7</i> amplificat per PCR sobre DNA genòmic amb els encebadors RO5 i RO6 i subclonat dins del vector pTZ57R
pIR35	Fragment de 600 pb de <i>HFR1</i> amplificat per PCR sobre DNA genòmic amb els encebadors RO25 i RO26 i subclonat dins del vector pCRII-TOPO
pJB3	DNA genòmic de <i>PAR2</i> amplificat amb els encebadors BO1 i BO2 i subclonat dins del vector pTZ57R
pSP2	Fragment de 390 pb de <i>PHYB</i> amplificat per PCR sobre DNA genòmic amb els encebadors JO197 i JO305 i subclonat dins del vector pTZ57R

pSP3	Fragment del pSP2 digerit amb EcoRI i subclonat dins la mateixa diana en el vector pET3a
pJF284	Fragment de 1200 pb de <i>PIL1</i> amplificat per PCR sobre DNA genòmic amb els encebadors JO287 i JO288 i subclonat dins del vector pGEM-T Easy
pJF290	cDNA de <i>RIP</i> amplificat per PCR sobre DNA genòmic amb els encebadors JO293 i JO294 i subclonat dins del vector pGEM-T Easy
pAG3	cDNA de <i>SAUR15</i> amplificat per PCR sobre DNA genòmic amb els encebadors RO28 i RO29 i subclonat en el vector pCRII-TOPO
pAG1	cDNA de <i>SAUR57</i> amplificat per PCR sobre DNA genòmic amb els encebadors RO30 i RO31 i subclonat en el vector pCRII-TOPO
pAG2	cDNA de <i>SAUR68</i> amplificat per PCR sobre DNA genòmic amb els encebadors RO32 i RO33 i subclonat en el vector pCRII-TOPO
pJF302	cDNA de <i>SCL21</i> amplificat per PCR sobre DNA genòmic amb els encebadors JO315 i JO316 i subclonat en el vector pTZ57R
pJF291	cDNA de <i>β-expansina</i> amplificada sobre DNA genòmic amb els encebadors JO295 i JO296 i subclonat en el vector pGEM-T Easy

Taula M.II. Construccions emprades en aquest treball.

A la següent figura s'esquematisa al títol d'exemple el clonatge de 1 kb P_{ATHB2} :GG.

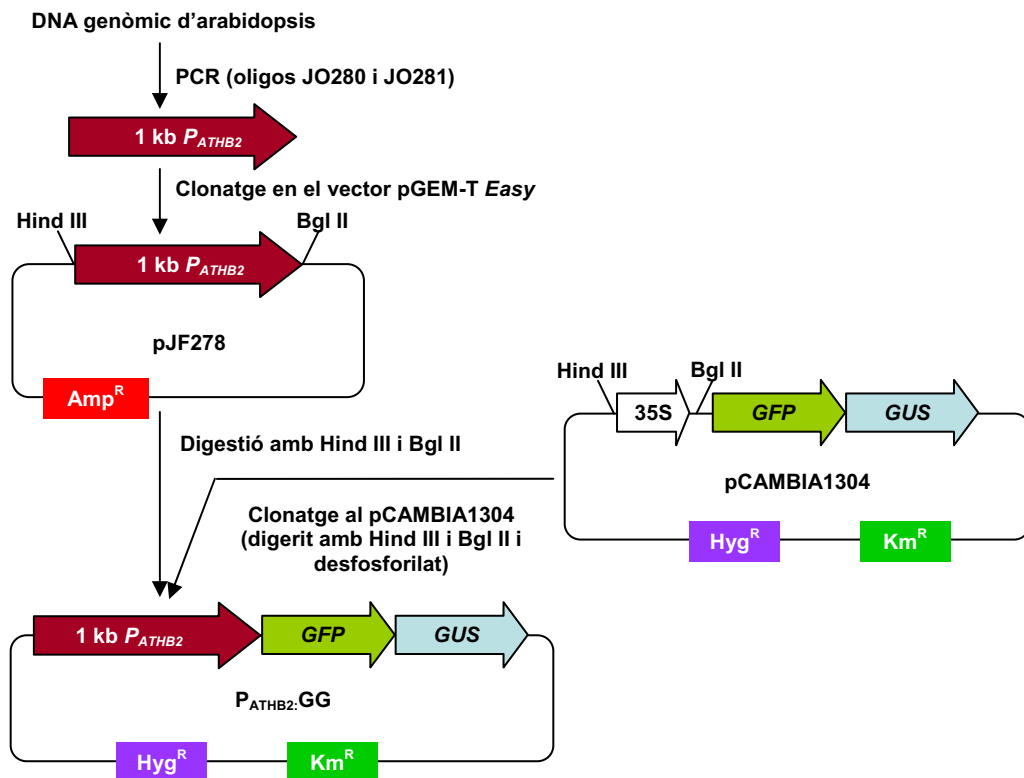


Figura M.1. Esquema de l'estratègia emprada per a les construccions de fusió dels promotors dels gens PAR als gens reporters GFP-GUS. El promotor CaMV 35S s'assenyala com 35S. S'indiquen els gens de selecció de cada plasmidi.

1.4. ENCEBADORS

NOM	SEQÜÈNCIA	LONG (pb)	T _m (°C)	DIRECCIÓ
BO1	5'-GGC-CAT-GGA-GGA-AAC-CCT-AGC-CAC-3'	24	62.1	directe
BO2	5'-GGA-CTA-GTA-CCT-CCA-AAC-TTC-ATA-TC-3'	26	55	complementari
JO197	5'-TTA-TCA-TCC-GTG-ATG-GTG-ATG-GTG-ATG-CGA-TCC-TGG-ATA-TGG-CAT-CAT-CAG-CAT-CAT-GTC-3'	63	73.1	directe
JO280	5'-GTC-GGA-TCC-ACC-ATC-TTC-TGT-TGA-ACT-TTC-TCA-AG-3'	35	60.5	directe
JO281	5'-GGA-AGC-TTT-CAA-CCG-TTT-TTG-TTT-AGT-TCT-TC-3'	32	64.4	complementari
JO282	5'-CAG-AAG-ATG-ATG-TTC-GAG-AAA-GAC-3'	24	59.3	directe
JO283	5'-AAA-GAC-TTA-GGA-CCT-AGG-ACG-AAG-3'	24	61	complementari
JO284	5'-AGG-ACA-ATG-GGG-GAA-AGA-GAT-GAT-3'	24	61	directe
JO285	5'-CCT-TCC-CTA-GCG-ACC-TGA-TTT-TTG-3'	24	62.7	complementari
JO287	5'-ATG-GAA-GCA-AAA-CCC-TTA-GCA-TC-3'	23	58.9	directe
JO288	5'-TTA-GTT-TGG-CGA-GCG-ATA-ATA-AC-3'	23	57.1	complementari
JO289	5'-TCA-ATG-GAA-GAA-ACT-CTA-GCC-AC-3'	23	58.9	directe
JO290	5'-TCA-ACC-TCC-GAA-CTT-CAT-GTC-TTC-3'	24	61	complementari
JO291	5'-GGA-AGC-TTA-CTC-TAC-CAT-CCA-CTA-ATG-TTT-TC-3'	32	65.6	directe
JO292	5'-GTC-GGA-TCC-ACC-ATT-GTC-CTC-AAC-AGA-AAG-AAC-TT-3'	35	69.5	complementari
JO293	5'-ATG-GCT-AGA-AAT-TTC-GAG-CCT-3'	21	54	directe
JO294	5'-TCA-ATG-CTT-GGA-AGC-AAA-GTC-3'	21	55.9	complementari
JO295	5'-ATG-CAG-CTC-TTT-CCG-GTC-ATC-3'	21	59.8	directe
JO296	5'-TAG-AGA-ACA-GGG-GAG-AAG-TTG-3'	21	57.9	complementari
JO297	5'-CCC-AAC-CAT-GAA-GAG-AGA-TCA-TC-3'	23	60.6	directe
JO298	5'-TCT-AAT-TGG-TGG-AGA-GTT-TCC-3'	21	55.9	complementari
JO301	5'-GGA-AGC-TTA-CCA-GGC-ACC-ACC-CGA-ATG-GC-3'	29	72.3	directe
JO302	5'-CGG-ATC-CAC-CAT-TGA-AAG-AAA-GAG-AGA-GAT-G-3'	31	66.8	complementari
JO303	5'-GGA-AGC-TTG-ATG-GAG-AGA-GGT-TGT-TCT-CTT-TG-3'	32	68.2	directe
JO304	5'-CAG-ATC-TAC-CAT-TTT-AGA-TTT-AAA-ACA-CAA-ATG-3'	33	60.8	complementari
JO305	5'-CCA-TCT-CAA-GAG-TGG-GTG-GAG-TAC-3'	24	64.4	complementari
JO313	5'-GAT-TGA-TCT-TTG-GAA-AGT-CTA-AGC-3'	24	57.6	directe
JO314	5'-GTG-TGG-TTT-CAG-AAC-CGT-AGG-3'	21	59.8	complementari
JO315	5'-TAT-TTG-TGA-TGG-ACA-ATG-TAA-GAG-3'	24	59.3	directe
JO316	5'-TCT-TTC-ACT-TCC-ATG-CAC-AAG-ATG-3'	21	59.8	complementari
JO319	5'-ATA-TAC-TGC-AGT-TTA-CTT-TTC-TAC-3'	24	54.2	directe
JO320	5'-GCG-GAT-CCA-CCA-TGG-TTG-GTT-TTT-TTT-CAG-AGA-TG-3'	35	69.5	complementari
JO329	5'-GGC-TCG-AGC-ATG-GAA-ACT-CTA-GCC-AC-3'	26	68	directe
JO330	5'-CGA-AGC-TTG-GTA-CCT-CAA-CCT-CCG-AAC-TTC-ATG-TC-3'	35	71.8	complementari
JO331	5'-GGC-CAT-GGA-AGA-AAC-TCT-AGC-CAC-3'	24	64.4	directe
JO332	5'-CGA-CTA-GTA-CCT-CCG-AAC-TTC-ATG-TCT-TC-3'	29	66.7	complementari
JO335	5'-GGA-AGC-TTA-AAA-GGC-AAA-ATA-AGA-TAA-CTA-CG-3'	32	63.1	directe
JO336	5'-GGA-AGC-TTT-GAT-TAT-AAA-ATT-ATT-TCC-ATT-G-3'	31	58.9	complementari
JO355	5'-GGA-AGC-TTG-ACT-TTA-ATA-ATA-ATA-ACT-ATT-TTG-3'	33	54.8	complementari
JO356	5'-GGA-AGC-TTT-TGC-AAA-ATC-TCT-CTC-TCT-CTC-TG-3'	32	63.9	complementari
JO357	5'-GGA-AGC-TTT-CCT-TTA-CTT-TCT-CAT-CTT-C-3'	28	57	complementari
RO3	5'-AAC-ATG-ATG-ATG-ATG-GGC-AAA-GAA-G-3'	22	68	directe
RO4	5'-AAA-TCA-CGA-TCG-TGG-ACG-CAA-GGC-3'	24	59	complementari
RO5	5'-GAG-ATT-GGA-GAT-GGC-CTT-TCC-TC-3'	23	64	directe
RO6	5'-GAC-AAT-ATG-ATC-AAT-TGA-ACT-G-3'	18	67	complementari
RO25	5'-AAC-ATG-TCG-AAT-AAT-CAA-GCT-TTC-ATG-3'	27	56.8	directe
RO26	5'-TAC-GGA-AAA-GAC-TAG-ACA-CTC-3'	21	43	complementari
RO27	5'-TAC-TTA-TCA-TAG-TCT-TCT-CAT-CGC-3'	24	47.3	complementari
RO28	5'-ATG-GCT-TTT-TTG-AGG-AGT-TTC-TTG-3'	24	55	directe
RO29	5'-TCA-TTG-TAT-CTG-AGA-TGT-GAC-3'	21	41.5	complementari
RO30	5'-ATC-ATG-AAG-AGC-AAA-TCC-ATA-G-3'	22	48	directe
RO31	5'-TTA-CAT-GCC-AAT-GCA-GTT-TCT-C-3'	22	52.1	complementari

RO32	5'-ATG-GCT-AAG-AAA-TGG-CAA-CAA-AG-3'	23	54.4	directe
RO33	5'-CTA-TAA-TAC-AAG-CAA-TTG-TTG-3'	21	40.2	complementari
35S	5'-CGT-AAA-GAC-TGG-AGA-AC-3'	17	52	
2X35S	5'-CTT-CGC-AAG-ACC-CTT-CC-3'	17	54	
LBb1	5'-CGT-GGA-CCG-CTT-GCT-GCA-ACT-3'	21	58	
Universal	5'-GTA-AAA-CGA-CGG-CCA-GT-3'	20	52	
Reverse	5'-CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-AC-3'	20	50	
GUS upper	5'-CAA-CGA-ACT-GAA-CTG-GCA-GA-3'	20	52	directe
GUS lower	5'-GGC-ACA-GCA-CAT-CAA-AGA-GA-3'	20	52	complementari

Taula M.III. Encebadors utilitzats en aquest treball. Es mostren tant els encebadors utilitzats en la generació de fragments per clonatge i per ser utilitzats com a sonda, com els comunament utilitzats per comprovar clonatges.

2. Metodologies

2.1. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR DELS ÀCIDS NUCLEICS

2.1.1. Obtenció de DNA plasmídic

En aquest treball s'han emprat 2 mètodes d'extracció de DNA plasmídic depenent del grau de puresa desitjat.

Minipreparació mitjançant lisi alcalina

L'extracció de DNA plasmídic s'ha realitzat per lisi alcalina segons el mètode descrit per Bimboin i Doly (1979), amb modificacions posteriors de Sambrook (2001). Aquest mètode s'ha utilitzat en passos intermedis de clonatges i per a la comprovació d'aquests mitjançant digestió o PCR.

Procediment:

1. Inocular una colònia aïllada en 3 mL de cultiu amb l'antibiòtic adient, incubar a 37°C en agitació a 250 rpm O/N.
2. Transferir tot el cultiu a un tub eppendorf i centrifugar 1 min. a velocitat màxima (\approx 13000 rpm). Descartar el sobrenedant.
3. Afegir 150 μ L de tampó P1. Resuspendre bé el sediment de bacteris amb l'ajuda del vòrtex.
4. Afegir 150 μ L del tampó P2. Agitar suaument el tub per inversió unes 4-5 vegades. Incubar no més de 5 min. a TA.
5. Afegir 150 μ L del tampó P3 i barrejar immediatament per inversió unes 4-5 vegades. Deixar reposar 15-20 min. en gel. Centrifugar 10 min a velocitat màxima (\approx 13000 rpm).
6. Passar el sobrenedant a un nou tub eppendorf, afegint-hi 900 μ L d'etanol 100%. Incubar 2 min. a TA. Centrifugar 10 min a velocitat màxima (\approx 13000 rpm).
7. Descartar el sobrenedant i afegir 700 μ L d'etanol 70%. Centrifugar 5 min. a velocitat màxima (\approx 13000 rpm).
8. Decantar l'etanol i deixar assecat el DNA a l'aire 10 min. o fins que s'evapori tot l'etanol.
9. Afegir 50 μ L de TE 1x o aigua. Guardar a 4°C.

Solucions:

- **Tampó P1 pH 8.0 (guardar a 4°C):** Tris-HCl 50mM, EDTA 10 mM, RNasa A 100µg/mL.
- **Tampó P2 pH 8.0 (guardar a TA):** 200 mM NaOH, SDS 1%.
- **Tampó P3 pH 5.5(guardar a 4°C):** KAc 3M. Ajustar el pH amb àcid acètic.
- **Tampó TE 1x pH 7.4:** Tris-HCl pH 7.5 10mM, EDTA pH 8 1mM

Minipreparació de DNA plasmídic d'alta qualitat

Mètode utilitzat per obtenir DNA d'alta qualitat que volem seqüenciar. Es realitza amb el kit *QIAprep Spin Miniprep* de Qiagen, seguint les indicacions del fabricant.

2.1.2. Subclonatge de fragments de DNA en vectors

Durant la realització d'aquesta tesi s'han emprat les principals tècniques d'enginyeria genètica, les quals els detallen a continuació.

2.1.2.1. Reaccions de modificació del DNA

Per a les reaccions de modificació de DNA realitzades, com ara la digestió de fragments de DNA amb enzims de restricció, lligacions, desfosforilació d'extrems de DNA, emplenat d'extrems protuberants, etc. s'han utilitzat diferents enzims de restricció de DNA i lligases (Promega, Boehringer-Manheim, NewEngli Biolabs, etc.), seguint el protocol general descrit per Sambrook (2001) i Ausubel (1989), i les condicions aconsellades pel fabricant en cada cas. És per això que en el present treball només es detallen aquelles que han estat de rellevant importància o bé si el protocol seguit suposa alguna modificació sobre l'original.

2.1.2.2. Transformació de cèl·lules competents d'*E.coli* per xoc tèrmic

La transformació de cèl·lules d'*E.coli* s'utilitza per amplificar DNA plasmídic. Les cèl·lules competents, preparades segons es descriu a l'apartat 1.1.2, es van transformar per xoc tèrmic segons el següent protocol.

Procediment:

1. Descongelar en gel el tub que conté una alíquota de cèl·lules competents.
2. Afegir 1-5 µL (10-20 ng) de DNA i barrejar suaument.
3. Mantenir la barreja 30 min. en gel.
4. Fer un xoc tèrmic 1.5 min. a 42°C.
5. Transferir el tub a gel durant 2 min.
6. Afegir 900 µL de medi LB fresc sense antibiòtics. Posar el tub en agitació a 250 rpm a 37°C 1h.
7. Plaquejar diferents volums de la transformació en dues plaques de LB sòlid amb l'antibiòtic selectiu escaient.
8. Incubar els bacteris a 37°C O/N.

Les colònies es seleccionen per PCR utilitzant encebadors específics i/o minipreparacions.

2.1.2.3. Transformació de cèl·lules competents d'*A.tumefaciens* per electroporació

La transformació de cèl·lules d'*A.tumefaciens* s'utilitza per augmentar la quantitat de DNA plasmídic, concretament plasmidis binaris, que després s'introduirà a la planta mitjançant transformació per *floral dip* (apartat 2.4.3.1). Les cèl·lules competents, preparades segons es descriu a l'apartat 1.1.3, es van transformar per electroporació segons el següent protocol.

Procediment:

1. Descongelar una alíquota (50 µL) de cèl·lules electrocompetents en gel i afegir 1-2 µL de DNA (el DNA ha d'estar dissolt en una solució de baixa força iònica, com per exemple TE, o H₂O). Barrejar bé i incubar en gel durant 5 min.
2. Refredar les cubetes d'electroporació (de 0.1 cm) en gel, prèviament esterilitzades rentant-les amb etanol, i afegir-hi la barreja de cèl·lules i DNA.
3. Electroporar a 1.5 kV. Immediatament, transferir les cèl·lules a un tub amb 1 mL de YEB fresc sense antibiòtics.
4. Incubar les cèl·lules a 28°C durant 2h per recuperar-les de l'electroporació.
5. Plaquejar diferents volums en medi YEB amb els antibiòtics selectius adients.
6. Incubar a 28°C 2-3 dies fins l'aparició de colònies.

Comprovar les colònies per PCR utilitzant encebadors específics.

2.1.3. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Per tal d'amplificar fragments de DNA s'ha emprat el mètode de la reacció en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction* o PCR) (Saiki i col., 1988), fent servir oligonucleòtids específics i DNA plasmídic complementari (cDNA) o genòmic (segons el cas) com a substrat.

La seva base teòrica es troba descrita en tots els manuals de biologia molecular (Sambrook, 2001).

Per amplificar els fragments per PCR es van utilitzar dos tipus d'enzims DNA polimerasa termoestable: un de no comercial, utilitzat per a la comprovació de clonatges i colònies, i un de comercial. Les comercials utilitzades segons la seva disponibilitat han estat *Pfu DNA Polymerase* (Stratagene), *Ex TaqTM Polymerase* (Takara) i *Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen). Totes elles es caracteritzen per tenir una baixa taxa d'error (HF, *High Fidelity*). Aquests enzims disposen dels seus propis tampons i es van utilitzar seguint les instruccions del fabricant.

Els encebadors emprats per les PCR varen ser elaborats majoritàriament per MWG Biotech i Thermo Scientific. Les seves seqüències s'especifiquen a l'apartat 1.4.

2.1.3.1. Retrotranscripció

Aquesta tècnica s'ha utilitzat per amplificar la primera cadena de cDNAs específics a partir de RNA total. En el nostre treball s'han emprat encebadors homòlegs a la seqüència d'interès. Per a la síntesi de la primera cadena de cDNA s'ha utilitzat la *M-MLV Reverse Transcriptase* d'Invitrogen, enzim que permet la transcripció de fragments de RNA de fins a 7 kb a partir de 1 ng-5 µg de RNA.

Procediment:

1. Barrejar en un tub eppendorf RNAsa Free:

X µl	RNA (1 µg)
4 µl	encebador específic complementari 5 µM
fins a 15 µl	H ₂ O

Incubar 5 min. a 70°C. Posar en gel

2. Afegir al tub:

5 µl	RT buffer 5X
1.25 µl	dNTPs 10 mM
1 µl	RNA guard
2 µl	DTT 0.1M
1 µl	RT M-MLV

Incubar 1h a 42°C.

3. Inactivar la reacció incubant 15 min. a 70°C.
4. Mantenir en gel fins al moment de fer la PCR, o guardar a 4°C.

A partir del 10% de la reacció de retrotranscripció es varen fer les ampliacions per PCR amb una polimerasa amb baixa taxa d'error (HF, *High Fidelity*).

2.1.3.2. Amplificació per PCR

En cada cicle de PCR hi ha tres etapes que precisen de temperatures diferents i es duen a terme en l'aparell de PCR o termociclador, el qual permet una transició molt ràpida entre una temperatura i una altra. Les tres etapes de cada cicle són:

1. Desnaturalització del DNA en presència dels oligonucleòtids encebadors. Es realitza a una temperatura alta, generalment 94°C, durant 30 seg.
2. Hibridació dels encebadors a les seqüències complementàries del DNA motlle a amplificar. Es realitza a la temperatura T_m de l'oligonucleòtid, que ve donada per la seqüència i la llargada d'aquest. Acostuma a estar compresa entre 45 i 65°C. El temps d'hibridació és d'uns 30 seg.
3. Un cop els encebadors s'han unit al DNA, actua la DNA polimerasa termoestable, sintetitzant les cadenes de DNA complementàries en direcció 5' a 3', amb activitat exonucleasa en direcció 3' a 5' *proofreading* per corregir els possibles errors en l'activitat anterior. Aquesta etapa es realitza a 68-

72°C durant un temps que depèn de la mida del fragment a amplificar (aproximadament 1 min. per 1 kb de DNA).

Les condicions generals de PCR emprades per a l'amplificació de DNA, les quals s'han modificat en cada cas per optimitzar la reacció, han estat:

10 ⁴ -10 ⁶ còpies	DNA motllo
1X	Tampó PCR
1.5mM	MgCl ₂
200 µM	dNTPs
200 nM	Encebador directe
200 nM	Encebador complementari
1-2 unitats	DNA polimerasa termoestable
	En H ₂ O

amb els cicles de PCR:

Desnaturalització inicial	5 min. a 94°C	
Desnaturalització	30 seg. a 94°C	} 30 cicles
Aparellament	30 seg. a 55°C	
Extensió	X seg. a 72°C	
Extensió final	3 min. a 72°C	

Solucions:

- **Tampó PCR 10X:** TrisCl 200 mM, KCl 500 mM. Al tampó se pot afegir MgCl₂ 15 mM.

Nota:

En el cas de PCR de colònies, el DNA motllo de la PCR s'hi afegeix picant amb una punta la colònia i submergint la punta a la barreja de PCR, si la colònia és d'*E.coli*. Per a colònies d'*A.tumefaciens*, es pica amb una punta la colònia i es disol en 25 µL d'aigua. D'aquests, utilitzem 2 µL per fer la PCR.

La comprovació dels fragments amplificats es realitza carregant una part del volum obtingut en un gel d'agarosa (apartat 2.1.4).

Quan va ser necessari, els fragments obtinguts van ser clonats per posteriorment ser seqüenciats (apartat 2.1.5).

2.1.3.3. Clonatge de fragments de DNA amplificats per PCR

Els productes de la reacció de PCR es van purificar utilitzant el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* de Qiagen, seguint les indicacions del fabricant, i van ser subclonats emprant

3 kits de clonatge de PCR, també seguint les indicacions dels fabricants (els vectors es descriuen a l'apartat 1.3.1.)

2.1.4. Separació de DNA en gels d'agarosa

Els productes de PCR o els fragments de DNA procedents de digestions s'han separat en gels d'agarosa/TBE amb agarosa 1% (p/v) i bromur d'etidi 0.05% (p/v), en TBE 0.5X, al costat d'un marcador de pes molecular adient per a la mida de banda esperada.

Solucions:

- **Tampó de càrrega 6X:** glicerol 30% (v/v), xilencianol FF 0.25% (p/v), blau de bromofenol 0.25% (p/v), EDTA 0.5M pH 8.

- **Tampó TBE 10x:** Tris base 0.089 M, àcid bòric 0.089 M, EDTA 20 mM pH 8.

2.1.5. Seqüenciació del DNA

La determinació de les seqüències de DNA preparat com s'indica a l'apartat 2.1.1.2 ha estat realitzada pel Servei de Seqüenciació de l'IBMB mitjançant seqüenciació automàtica, emprant el sistema Applied Biosystems de Pharmacia (*Automated Laser Fluorecence*). Aquest sistema es basa en el mètode del *dye terminator*. La mitjana de lectura amb aquest mètode va ser de 600-700 pb.

Les seqüències obtingudes han estat processades informàticament mitjançant programes bioinformàtics gratuïts a Internet, com Bioedit, l'algoritme ClustalW, BLAST de l'NCBI, Fasta i Genedoc.

2.1.6. Purificació de fragments de DNA

El DNA va ser purificat seguint diferents protocols segons la seva procedència i la puresa final desitjada. A continuació es presenten els principals mètodes de purificació utilitzats.

Precipitació de DNA

Per la precipitació de fragments de DNA es va seguir el protocol de precipitació d'àcids nucleics per acetat de sodi (Sambrook, 2001).

Procediment:

1. Afegir 1 volum de fenol:cloroform, barrejar amb el vòrtex i centrifugar 5 min. A velocitat màxima. Recuperar la fase aquosa (superior).
2. Afegir 0.1 volums d'AcNa 3M pH 5.2, i 2.5 volums d'etanol absolut.
3. Barrejar i deixar 2-5 min. en gel.
4. Centrifugar 10 min. a velocitat màxima. Descartar el sobrenedant.
5. Afegir 250 µL d'etanol 70%. Centrifugar 5 min. a velocitat màxima i descartar el sobrenedant.
6. Resuspendre l'àcid nucleic en 50 µL o el volum escaient d'aigua milliQ o tampó TE.

Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa/TBE

Els fragments de DNA resolts en gels d'agarosa/TBE s'han utilitzant el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* de Qiagen, seguint les indicacions del fabricant.

Purificació de productes de PCR

Els productes de PCR es van purificar utilitzant el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* de Qiagen, seguint les indicacions del fabricant.

2.1.7. Obtenció de RNA total d'arabidopsis

En l'aïllament de RNA partim de plàntules d'arabidopsis congelades en nitrogen líquid i emmagatzemades a -80°C.

Procediment:

1. Triturar la mostra (100-300 mg) en un morter amb nitrogen líquid fins que quedi una pols fina. La mostra no s'ha de descongelar en cap moment.
2. Passar el teixit triturat a un tub eppendorf de 2 mL prèviament refredat en nitrogen líquid. Afegir 500 µL de tampó d'extracció i 500 µL de fenol:cloroform. Barrejar bé amb el vòrtex i mantenir el tub en gel fins que s'hagin triturat totes les mostres.
3. Centrifugar en microfuga 10 min. a 13000 rpm a 4°C.
4. Transferir la fase aquosa (superior) a un eppendorf nou de 1.5 mL. Afegir 1 volum de cloroform, barrejar amb el vòrtex.
5. Centrifugar 10 min. a 13000 rpm a 4°C.
6. Transferir la fase aquosa (superior) a un eppendorf nou de 1.5mL. Afegir 1 volum d'acetat de liti 4M, barrejar amb el vòrtex. Deixar-ho en gel O/N (almenys 4h).
7. Centrifugar 10 min. a 13000 rpm a 4°C.
8. Eliminar el sobrenedant i resuspendre immediatament el sediment en 300 µL d'aigua estèril i 30 µL d'acetat sòdic 3M.
9. Afegir 2.5 volums d'etanol 100% per precipitar l'RNA.
10. Centrifugar 10 min. a 13000 rpm a 4°C.
11. Eliminar el sobrenedant i afegir 500 µL d'etanol 70% (v/v).
12. Centrifugar 10 min. a 13000 rpm a 4°C.
13. Eliminar el sobrenedant i deixar que el sediment s'assequi totalment a TA.
14. Resuspendre el sediment en 50-100 µL d'aigua estèril. Guardar l'RNA a -20°C o -80°C.

Solucions:

- **Tampó d'extracció (autoclau):** Tris-HCl 10 mM pH7.5, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM. Després d'autoclavar se li afegeix SDS 1% (p/v).

- **Acetat de liti 4M (autoclau):** 40.8 g d'acetat de liti en 100 mL d'aigua.

2.1.8. Quantificació d'àcids nucleics

La quantitat de DNA o de RNA present en una mostra es va mesurar a l'espectrofotòmetre, llegint la D.O. a una λ de 260 nm. Un valor 1 de D.O. a 260 nm es correspon aproximadament a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA bicatenari i 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNA. La puresa de les mostres d'àcids nucleics es va determinar calculant les relacions entre les absorbàncies a 260 nm, 280 nm i 230 nm. La relació entre l'absorbància a 260 i 280 nm indica la presència de proteïnes si dóna per fora del rang de 1.7-2. La relació entre l'absorbància a 260 nm i 230 nm proporciona informació sobre la presència de polifenols a la mostra.

2.1.9. Anàlisi de l'RNA per northern-blot

Preparació de les mostres

Les mostres es preparen afegint 16 μL del tampó de càrrega per RNA a 10 μg de RNA total en un volum de 10 μL . Les mostres es desnaturalitzen 15 min. a 65°C i es mantenen en gel fins al moment de carregar-les, quan els afegim 4 μL de tampó de càrrega 6x (apartat 2.1.4) per facilitar la seva càrrega en el gel.

Preparació del gel d'agarosa al 1.2% i electroforesi

El gel es prepara fonent 1.8 g d'agarosa en 105 mL d'aigua i 15 mL de MEN 10X. Es deixa refredar fins aproximadament 65°C i s'afegeixen 30 mL de formaldehid al 37.5%. Es barreja bé i s'aboca al portagels. El tampó d'electroforesi és MEN 1X, que s'afegeix fins al nivell del gel, sense arribar a cobrir-lo. Es carreguen les mostres i s'acaben de cobrir els pous amb tampó MEN 1X, i es corre l'electroforesi a 100V durant 1h en campana de gasos.

Transferència a membrana de niló

Després de l'electroforesi el gel de RNA es renta amb aigua durant 10 min. per tal d'eliminar l'excés de formaldehid, i es procedeix a transferir l'RNA a una membrana de niló per capil·laritat i en presència d'un tampó d'elevada força iònica (SSC 10X).

1. Col·locar el gel invertit sobre un paper Whatman 3MM prèviament mullat amb el tampó, que fa de pont per a l'absorció per capil·laritat del tampó de transferència SSC 10X. Les bombolles que puguin quedar entre el gel i el paper Whatman s'eliminen amb l'ajut d'una vareta de vidre.
2. Humitejar la membrana de niló de la mida del gel en aigua i col·locar-la sobre el gel, eliminant les bombolles de la manera descrita anteriorment.
3. Humitejar un paper Whatman 3MM de la mida del gel, col·locar-lo sobre la membrana de niló i eliminar les bombolles.
4. Afegir uns quants papers Whatman 3MM secs i una pila de papers absorbents.
5. Col·locar un vidre al damunt i un pes per a fer pressió sobre el gel. Deixar transferint O/N a TA.
6. Retirar la membrana de niló i fixar l'RNA a la membrana amb un aparell *stratalinker* (Stratagene) que uneix covalentment l'RNA a la membrana mitjançant radiació UV.

Solucions:

- **tampó de càrrega per RNA:** formamida desionitzada, formaldehid 37.5% i tampó MEN 10X (30:9:7, v:v:v).
- **Tampó SSC 20X (filtració):** NaCl 3M, C₆H₅Na₃O₇·2H₂O (citrat trisòdic) 0.3M.
- **Tampó MEN 10X:** MOPS 200mM, CH₃COONa (acetat de liti) 50 mM, EDTA 10 mM.

2.1.9.1. Tinció de la membrana per comprovar la transferència de l'RNA

Donat que el gel de RNA no conté bromur d'etidi, la manera que tenim de visualitzar l'RNA a la membrana i comprovar així l'eficiència de la transferència i la qualitat dels RNA és tenyir-la amb una solució de blau de metilè (Wilkinson i col., 1991).

Procediment:

1. Incubar en agitació durant uns min. la membrana de niló després de la transferència amb la quantitat suficient de solució de blau de metilè com per cobrir-la totalment.
2. Quan la membrana es veu tenyida, retirar la solució de blau de metilè i fer uns quants rentats amb aigua destil·lada, fins que s'elimina l'excés de solució i només resten tenyits els RNA.
3. Si es desitja guardar un registre de la tinció, es pot escanejar la membrana o simplement fer-ne una fotocòpia.
4. Rentar la membrana amb la solució de rentat fins que desaparegui totalment la tinció.

Solucions:

- **Solució de blau de metilè:** blau de metilè 0.03% (p/v), NaAc 0.3M, en aigua.
- **Solució de rentat:** SSC 1% (v/v), SDS 1% (v/v).

2.1.10. Obtenció de sondes de DNA i marcatge radioactiu**2.1.10.1. Generació de sondes de DNA**

Les sondes per a les hibridacions *northern-blot* es van generar amplificant per PCR DNA genòmic de l'ecotip Col-0 amb encebadors específics per a cada gen, excepte en el cas de la sonda GUS, en el que s'emprà com a DNA motllo el plàsmid pCAMBIA1304. Els productes de PCR es van subclonar en els vectors pGEM-T *Easy*, PTZ57R o pCRII-TOPO (apartat 1.3.2). La identitat dels inserts es va confirmar per seqüenciació i posteriorment s'aïllaren per digestió amb enzims de restricció o per PCR amb encebadors específics. Aquests productes són els que es marcaren radioactivament. A la següent taula es mostren les diferents sondes generades i la forma d'aïllament.

GEN	PLASMIDI	AÏLLAMENT
<i>ATHB2</i>	pJF281	Digestió EcoRI o PCR (JO282 (D) + JO283 (C))
<i>ATHB4</i>	pJF282	Digestió EcoRI o PCR JO284 ((D) + JO285 (C))
<i>GAI</i>	pOX3	Digestió BamHI

<i>GUS</i>	pCAMBIA1304	GUS upper (D) + GUS lower (C)
<i>HAT2</i>	pIR4	PCR (RO3 (D) + RO4 (C))
<i>HAT7</i>	pIR5	PCR (JO282 (D) + JO283 (C))
<i>HFR1</i>	pIR35	PCR (RO25 (D) + RO26 (C))
<i>PAR1</i>	pJF285	Digestió EcoRI
<i>PAR2</i>	pJB3	Digestió NcoI+SpeI
<i>PHYB</i>	pSP3	Digestió XbaI+KpnI
<i>PIL1</i>	pJF284	Digestió EcoRI
<i>RIP</i>	pJF290	Digestió EcoRI
<i>SAUR15</i>	pAG3	PCR (RO28 (D) + RO29 (C))
<i>SAUR57</i>	PAG1	PCR (RO30 (D) + RO31 (C))
<i>SAUR68</i>	pAG2	PCR (RO32 (D) + RO33 (C))
<i>SCL1</i>	pJF302	PCR (JO315 (D) + JO316 (C))
<i>β-expansina</i>	pJF291	PCR (JO295 (D) + JO296 (C))

La sonda constitutiva 25S ha estat cedida pel Dr.F. Cantón (Universitat de Màlaga).

Taula M.IV. Sondes radioactives utilitzades en aquest treball. D, directe. C, complementari.

2.1.10.2. Marcatge radioactiu de fragments de DNA per *random priming*

Basat en el mètode descrit per Feinberg i col. (1983), es va utilitzar el kit comercial *Random Primed DNA Labeling Kit* de Boehringer i s'han seguit les indicacions del fabricant. Permet l'obtenció de fragments de DNA marcats uniformement i amb una elevada activitat específica (fins a 3.109 cpm/μg DNA). S'utilitzen hexanucleòtids (2 μL) de seqüència a l'atzar, que hibriden amb les seqüències de DNA del nostre fragment a marcar. Un cop reconegudes les seqüències, la polimerasa (1 μL Klenow) omple els forats amb els nucleòtids afegits a la reacció (3μL d'A, T, GTPs + 2μL α32P-dCTP (3000 Ci/mmol)), incubant 30 min. a 37°C. Es purifica la sonda eliminant els nucleòtids no incorporats en una microcolumna de Sephadex G-50 (ProbeQuant G-50, Amersham Biosciences).

2.1.11. Hibridació de membranes *northern-blot* amb sondes de DNA

Procediment:

1. Prehibridar la membrana durant >30 min. en un volum de 10 mL de tampó Church dins d'un cilindre d'hibridació a 65°C.
2. Desnaturalitzar la sonda radioactiva durant 3 min. a 100°C just abans d'utilitzar-la. Posar-la immediatament en gel.
3. Afegir la sonda radioactiva al tampó Church.
4. Hibridar la membrana a 65°C un mínim de 5h (es recomana deixar-la O/N).
5. Fer 3 rentats de 20 min. amb tampó de rentat a 65°C.
6. Segellar la membrana dins una bossa de plàstic i exposar sobre una pantalla *phosphorimager*.

El marcatge es visualitza utilitzant el densitòmetre *Molecular Imager FX* (Biorad), i les intensitats de banda es quantifiquen utilitzant el software Quantity One (BioRad).

Solucions:

- **Tampó Church d'hibridació i prehibridació:** SDS 7% (p/v), EDTA 1 mM, tampó fosfat 0.125 M pH 7.2.

- **Tampó de rentat:** SDS 2% (p/v), EDTA 2 mM, tampó fosfat 40 mM pH 7.2.

2.1.12. Deshibridació de membranes

En el cas de que una membrana s'hagi d'hibridar amb més d'una sonda, la membrana es deshibrida mitjançant 2 rentats amb el tampó de deshibridació durant 20 min. a 42°C.

Solucions:

- **Tampó de deshibridació:** SSC 0.1% (p/v), SDS 0.1% (p/v).

2.2. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR DE PROTEÏNES

2.2.1. Obtenció d'extractes proteics

Per a l'extracció de proteïnes es va utilitzar un mètode desnaturalitzant (Al-Sady i col., 2006).

Procediment:

1. Pesar exactament 200 mg de mostra.
2. Afegir 600 µL de tampó d'extracció de proteïnes bullint.
3. Triturar la mostra en el tampó i transferir-ho tot a un tub eppendorf al que prèviament li hem fet un forat a la tapa.
4. Bullir durant 2 min.
5. Centrifugar 10 min. a 13000 rpm.
6. Recuperar el sobrenedant en un nou tub també foradat.
7. Congelar immediatament en nitrogen líquid.
8. Emmagatzemar les mostres a -80°C.

Solucions:

- **Tampó d'extracció de proteïnes:** MOPS 100 mM pH 7.6, β-mercaptoetanol 40 mM, SDS 5% (p/v), glicerol 10% (v/v), EDTA 4 mM, i inhibidors de proteases (aprotinina 2 µg/L, leupeptina 3 µg/L, pepstatina 1 µg/L i PMSF 2 mM).

2.2.2. Quantificació de proteïnes

Les mostres extretes segons el protocol anterior van ser precipitades i quantificades utilitzant el kit *RC DC protein assay* de BioRad, segons les instruccions del fabricant.

2.2.3. Separació electroforètica de proteïnes

Les proteïnes es van separar mitjançant electroforesi desnaturalitzant per proteïnes (SDS-PAGE) seguint el protocol descrit a Sambrook (2001) i fent servir l'aparell vertical Hoefer o BioRad, seguint les instruccions del fabricant.

2.2.4. Anàlisi de proteïnes per transferència i immunodetecció

2.2.4.1. **Transferència de proteïnes (*Western-blot*)**

A partir d'un gel SDS-PAGE s'ha fet la transferència de les proteïnes a membranes de nitrocel·lulosa o PVDF seguint el mètode humit descrit per Towbin i col. (1979). Es va fer servir l'aparell *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* de BioRad seguint les instruccions del fabricant. S'utilitzaren 750 mL de tampó de transferència, i les condicions de transferència van ser 1h a 4°C, amb el voltatge fixat a 100 V, o bé O/N a 4°C a 20V.

Solucions:

- **Tampó de transferència:** 75 mL de tampó Towbin 10X, 75 mL de metanol i 600 mL de H₂O.

- **Tampó Towbin:** Tris-base 30 g/L, glicina 144 g/L, SDS 10% (p/v) 100 mL/L.

2.2.4.2. **Immunodetecció quimioluminiscent**

La detecció de les proteïnes es va fer per quimioluminescència utilitzant un anticòs primari específic contra la proteïna a detectar i un anticòs secundari anti-anticòs primari conjugat amb una peroxidasa de rave (Amersham Pharmacia), que trenca el reactiu quimioluminescent ECL Plus (*ECL Plus West Blotting detection system*, Amersham Pharmacia).

Procediment:

1. Bloquejar amb TBST 1X + 5 % (p/v) de llet en pols durant 1h a TA en agitació.
2. Retirar el bloqueig i afegir l'anticòs primari en tampó TBST 1X amb 5 % de llet en pols.
3. Incubar amb l'anticòs primari O/N a 4°C en agitació.
4. Rentar 3 x 5 min. amb TBST a TA en agitació.
5. Incubar 30 min. amb l'anticòs secundari anti-anticòs primari en tampó TBST 1X amb 5 % de llet en pols a TA en agitació.
6. Rentar 5 x 5 min. amb TBST a TA en agitació.
7. Reacció ECL Plus i revelat segons les instruccions del fabricant.

Solucions:

- **Tampó TBST 10X:** 200 mL Tris pH7.5 1M, 300 mL NaCl 5M, 10 mL Tween 20 en 1L de H₂O.

2.2.5. **Anticossos utilitzats**

Anticossos primaris:

- α -tubulina. Anticòs monoclonal (mouse IgG1 isotype), Sigma. Dilució de treball 1:10.000.
- α -phyB. Dilució de treball 1:2.000. És la barreja de 2 anticossos monoclonals, B1 i B7). Cedit pel Prof. P. Quail.

Anticossos secundaris:

- α -mouse HRP, Dako. Dilució de treball 1:5.000.

2.3. **TÈCNIQUES BIOQUÍMIQUES**

2.3.1. **Anàlisi dels pigments isoprenoides (clorofil·les i carotenoides)**

Aquestes anàlisis han estat dutes a terme pel laboratori del Dr. M. Rodríguez Concepción seguint un mètode d'extracció de pigments basat en el descrit per Fraser i col. (2000) i posterior separació i anàlisi de pigments mitjançant HPLC-PDA (Rodríguez-Concepcion i col., 2004).

2.4. **MÈTODES DE PLANTES**

2.4.1. **Esterilització de llavors**

Les llavors d'arabidopsis van ser esterilitzades en tots aquells experiments que implicaven sembrar-les per al cultiu en placa.

Procediment:

1. Embeure les llavors en solució d'imbibició (v/v) durant almenys 20 min. A partir d'aquest moment, es treballa en condicions d'esterilitat sota campana de flux laminar utilitzant solucions i materials estèrils.
2. Retirar la solució i afegir solució d'esterilització. Barrejar bé i mantenir les llavors en aquesta solució no més de 10 min.
3. Retirar la solució i afegir aigua estèril. Barrejar bé i deixar que les llavors sedimentin al fons del tub.
4. Repetir el pas número 3, 4 cops més.

Solucions:

- **Solució d'imbibició:** Tween 20 0.1 % (v/v).
- **Solució d'esterilització:** Tween 20 0.1 %, lleixiu 10 % (v/v).

2.4.2. **Sembra de llavors**

Depenent del tipus d'experiment que vulguem dur a terme, les llavors es sembraran de la següent manera:

Sembra de llavors en grup sobre el medi de cultiu

Unes 1000-2000 llavors es sembren en grup directament sobre el medi de cultiu quan es tracta de llavors de la generació T1, procedents de plantes transformades amb agrobacteri, d'entre les quals es volen seleccionar aquelles que continguin el transgen.

Procediment:

1. Retirar l'aigua de l'últim rentat de l'esterilització.
2. Resuspendre les llavors en 2.5 mL d'una solució estèril d'agarosa 0.1 % (p/v), que permet que les llavors s'escampin per la superfície del medi sense que s'agreguin.
3. Abocar les llavors en la solució d'agarosa sobre el medi sòlid MS 0.5 % amb l'antibiòtic de selecció corresponent i l'antibiòtic cefotaxima per eliminar les possibles restes d'agrobacteri, escampar-les per tota la placa i deixar-les assecar sota campana amb les plaques obertes.

Sembra de llavors una a una sobre el medi de cultiu

Les llavors es sembren d'una en una directament sobre el medi de cultiu quan es tracta de facilitar el seu recompte (per exemple, en els estudis de segregació d'un transgen) o per als experiments fisiològics (apartat 2.4.5), en una densitat de 100 llavors per placa.

Procediment:

1. Resuspendre les llavors en l'aigua de l'últim rentat de l'esterilització.
2. Pipetejar les llavors amb una pipeta P1000 i deixar-les anar una a una sobre el medi sòlid corresponent contactant la punta de la pipeta amb el medi.

Sembra de llavors en grup sobre paper de filtre

Les llavors es sembren en grup sobre paper de filtre whatman 3MM quan es volen dur a terme anàlisis de RNA o de proteïnes, o bé realitzar algun tipus de tractament que impliqui transferir les plàntules a una determinada solució. La germinació de les llavors sobre paper de filtre permet que aquestes absorbeixin tots els nutrients del medi alhora que fa possible la collita ràpida del material biològic sense restes de medi de cultiu, facilitant la posterior extracció de RNA o proteïnes, o bé facilitant la transferència de plàntules d'una placa a una altra.

Procediment:

1. Resuspendre les llavors en l'aigua de l'últim rentat de l'esterilització mitjançant pipeteig.
2. Abocar les llavors sobre el paper de filtre situat sobre el medi sòlid. Deixar assecar les plaques per tal d'eliminar el possible excés d'aigua.

Independentment del sistema de sembra utilitzat, un cop sembrades les llavors les plaques es segellen amb cinta porosa *micropore* i s'emmagatzemen en foscor a 4°C durant entre 3 i 5d. Aquest procés, conegut com estratificació, permet el trencament de la dormància de les llavors, assegurant la germinació sincronitzada de totes les llavors quan les posem en les condicions de llum i temperatura indicades als apartats 1.2.3 i 1.2.4.

Quan sembrem les llavors directament en terra per cultivar-les en testos a l'hivernacle, aquestes també es sotmeten al mateix període d'estratificació comentat anteriorment.

2.4.3. Obtenció de plantes transgèniques

2.4.3.1. Transformació de plantes d'arabidopsis

Plantes d'arabidopsis de l'ecotip silvestre Col-0 es van transformar per *floral dip* segons el mètode descrit per Clough i col. (1999), amb un cultiu d'*A.tumefaciens* portador de la construcció que en cada cas es volia introduir a la planta (apartat 1.3.1.2).

Procediment:

1. Cultivar les plantes d'arabidopsis a transformar en testos a l'hivernacle. En testos de 11.5 cm de diàmetre amb la barreja de substrat coberta per una reixeta, es sembren unes 8-10 llavors, densitat que permetrà un creixement òptim de la planta.
2. Quan les plantes han desenvolupat inflorescències de 5-7 cm (aproximadament 6 setmanes després de la sembra), tallar les inflorescències a ran de roseta (tallar la inflorescència principal de la planta fa que es formin noves tiges florals laterals, d'aquesta manera augmentem el número de tiges florals susceptibles a ser transformades). Després de 9-10d aquestes tiges florals estan en un estadi òptim per a la transformació.
3. Dos dies abans de la transformació, inocular 2 mL de medi YEB amb els antibiòtics adequats amb la soca de l'agrobacteri portadora de la construcció a transformar. Incubar O/N a 28°C en agitació.
4. Inocular un cultiu de 1 L de medi YEB amb els antibiòtics adequats amb 1 mL del precultiu. Incubar O/N a 28°C en agitació.
5. Centrifugar el cultiu 10 min. a 4000xg Descartar el sobrenedant.
6. Resuspendre les cèl·lules en 300 mL de sacarosa 5 % (p/v).
7. Just abans de transformar les plantes afegir 0.02 % (v/v) de Silvet al cultiu d'agrobacteri.
8. Abocar el cultiu en un recipient adequat i submergir-hi les inflorescències de les plantes durant 5 min. Convé regar les plantes abans de la transformació, perquè l'aigua saturarà el substrat i en cas de que aquest entri en contacte amb la solució d'agrobacteri no l'absorbirà, impeding futures contaminacions en les plantes. La reixeta que hem posat als testos en el moment de la sembra també impedeix el contacte del substrat amb la solució d'agrobacteri al posar els testos boca avall en el moment de la transformació.
9. Deixar els testos en posició horitzontal en una safata sobre paper de filtre, que absorbirà l'excés d'agrobacteri, i cobrir-la amb un plàstic.
10. Mantenir la safata durant 2-4d al fitotrò amb baixa intensitat de llum.
11. Passat aquest temps, retirar el plàstic que cobreix la safata, el paper de filtre i posar les plantes en posició vertical per a ser cultivades normalment a l'hivernacle.

A la **figura M.2.** s'esquematitzen les diferents generacions de plantes transformants, així com la seva selecció mitjançant l'ús d'antibiòtics.

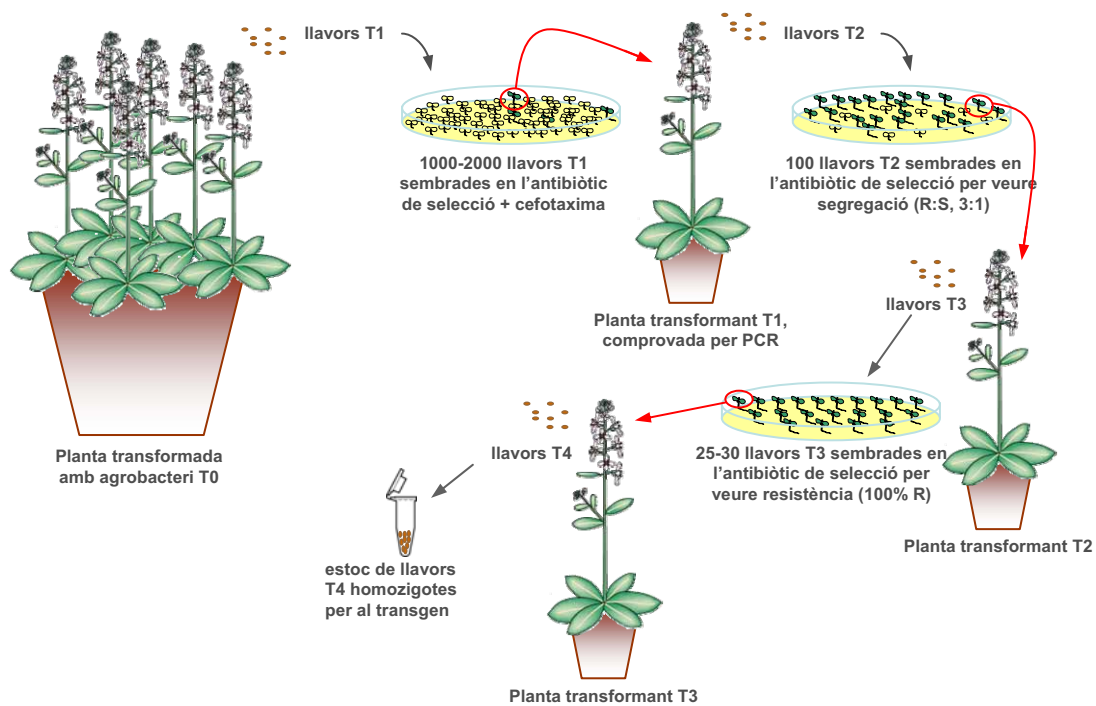


Figura M.2. Esquema de la transformació de plantes d'arabidopsis i selecció de les diferents generacions de transformants.

2.4.3.2. Obtenció de dobles (o múltiples) mutants per creuament

Els creuaments entre una línia 1 i una línia 2 es van realitzar pol·linitzant els ovaris (♀) de flors emasculades (flors a les que se'ls ha eliminat els estams) de la línia 1 amb pol·len (♂) de la línia 2. S'ha de procurar escollir els ovaris que estiguin en un estadi receptiu a la fecundació però que no hagin estat pol·linitzats amb anterioritat (per això s'escullen flors joves abans d'antesi, és a dir, no obertes amb estams no desenvolupats). A més, prèviament a l'emasculació s'eliminen la resta de flors i fruits (síliques) presents a la mateixa inflorescència de la flor a pol·linitzar per assegurar que aquesta rebí suficient aport de nutrients per la formació de llavors i per facilitar la identificació de la síliqua resultat del creuament. Si la fecundació es produeix amb èxit i es desenvolupa una síliqua, aquesta es deixa assecar i es recullen les seves llavors (generació F1 del creuament). L'autofecundació d'individus F1 dona lloc a la generació F2, i successivament, l'autofecundació d'individus F2 a la generació F3.

2.4.4. Anàlisi molecular de les plantes mutants

2.4.4.1. Obtenció ràpida de DNA genòmic de planta

Per a l'extracció del DNA genòmic de les plantes hem seguit el protocol descrit per Edwards i col. (1991).

Procediment:

1. Macerar el teixit (una fulla jove, síliqua o unes quantes llavors) en un tub eppendorf durant no més de 15 seg. amb un èmbol de plàstic (*pellet pestle polypropylene*, SIGMA-Aldrich).

2. Afegir 400 µL de tampó d'extracció, i acabar de macerar el teixit.
3. Barrejar amb el vòrtex.
4. Centrifugar 1 min. a 13000 rpm.
5. Descartar el sediment.
6. Barrejar el sobrenedant (\approx 400 µl) amb 400 µL d'isopropanol.
7. Incubar a TA durant 2 min.
8. Centrifugar 5 min. a 13000 rpm.
9. Descartar el sobrenedant.
10. Rentar el sediment amb 700 µL d'etanol 70%.
11. Centrifugar 5 min. a 13000 rpm.
12. Descartar el sobrenedant.
13. Resuspèndre el sediment en 100 µL d'aigua destil·lada. Guardar a -20°C.

Solucions:

- **Tampó d'extracció:** Tris-HCl 200 mM pH 7.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM i SDS 0.5%.

2.4.4.2. Comprovació del genotip per PCR

La tècnica de la PCR s'utilitza per detectar ràpidament la presència d'un transgen introduït a la planta. Aquesta tècnica també s'usa per genotipar les plantes mutants procedents de col·leccions per inserció d'un T-DNA (SALK), utilitzant oligonucleòtids de l'element d'inserció de cada línia i de la regió genòmica flanquejant al seu lloc d'inserció (un exemple es mostra a la **figura R.37**).

La reacció de PCR utilitza com a motlle 5 µL de DNA procedent de l'extracció ràpida de DNA genòmic (apartat 2.4.4.1) i una parella d'encebadors adequada.

2.4.5. Tractaments i assajos en planta

Les plàntules destinades als tractaments de llum o hormonals han estat cultivades en placa en una cambra de cultiu *in vitro* I-36VL (Percival Scientific Inc, Perry, IA, USA) a 22°C de Ta, i humitat no controlada on la llum Wc és generada per 4 tubs fluorescents verticals *cool-white* (80 µmol/m²s¹ de radiació fotosintèticament activa). Per als tractaments realitzats en foscor, les plaques s'han mantingut a la foscor dins d'aquesta cambra.

2.4.5.1. Tractaments d'ombra simulada

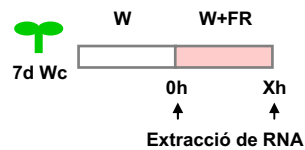
Els tractaments d'ombra simulada han consistit en enriquir W (alta raó R:FR, 3.2-4.5) amb FR ($\lambda=727$ nm) generada per una làmpada LED (QB1310CS-670-735 LED, Quantum Devices Inc, Barneveld, WI, USA), provocant una baixa raó R:FR (0.05). La taxa de fluència s'ha mesurat utilitzant un espectròmetre EPP2000 (StelairNet Inc., Tampa, FL, USA). El disseny

del tractament dependrà de la finalitat amb que es fa: anàlisi del fenotip molecular o anàlisi del fenotip fisiològic.

Tractament d'ombra simulada per les anàlisis del fenotip molecular (RNA)

Es van sembrar llavors de les línies d'interès en placa i en grup sobre paper de filtre. Al setè dia (7d) de la germinació, a no ser que s'indiqui el contrari, les plantes s'han sotmès a W+FR. S'han recollit mostres immediatament abans i X hores (h) després de l'inici del tractament de llum, congelant-les immediatament en nitrogen líquid per a l'extracció de l'RNA. El tractament s'esquemmatitza així:

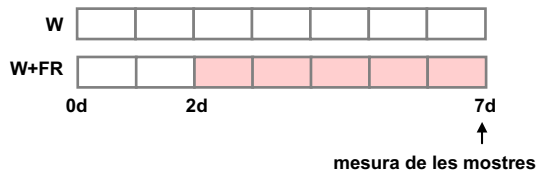
Figura M.3. Esquema del tractament d'ombra simulada per les anàlisis del fenotip molecular.



Tractament d'ombra simulada per les anàlisis de fenotip fisiològic

Aquest tractament d'ombra va consistir en sembrar llavors de les línies d'interès en placa i després de la estratificació cultivar les plantes 2d en Wc. Al segon dia, un grup de plantes s'han mantingut sota Wc mentre que un altre grup de plantes s'han sotmès a W+FR. Cinc dies després, és a dir, als 7d d'edat de les plàntules, s'han pres imatges de les plàntules per analitzar el seu fenotip (apartat 2.4.5.3). El tractament s'esquemmatitza així:

Figura M.4. Esquema del tractament d'ombra simulada per les anàlisis del fenotip fisiològic.

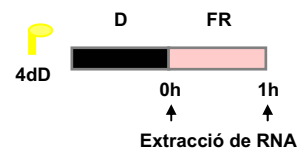


2.4.5.2. Tractaments de desetiolació

Tractaments de desetiolació per als estudis de fenotip molecular

Es van sembrar llavors de les línies d'interès en placa i en grup sobre paper de filtre. La germinació es va induir mitjançant un pols de llum W d'aproximadament 3h de durada. A continuació les plaques es van transferir a la foscor durant 4d. Passat aquest temps, les plàntules es van sotmetre a 1h de llum FR. S'han recollit mostres immediatament abans i 1h després de l'inici del tractament de llum, congelant-les immediatament en nitrogen líquid per a l'extracció de l'RNA. El tractament s'esquemmatitza així:

Figura M.5. Esquema del tractament de desetioliació per les anàlisis del fenotip molecular.



Tractaments de desetioliació per als estudis de fenotip fisiològic

Els tractaments de desetioliació s'han dut a terme al laboratori del Prof. P. Quail a Berkeley, Califòrnia. S'han realitzat en una cambra ENCONAIR model GC8-2H, Canadà. La taxa de fluència s'ha mesurat utilitzant un espectròmetre (LI-1800; LiCor, Lincoln, NE). El tractament va consistir en desetiolar plàntules d'arabidopsis sota diferents fluències de llum R o FR. Es van sembrar llavors de les línies d'interès una a una en placa i després de l'estratificació la germinació es va induir mitjançant un pols de llum W de 3h de durada. A continuació les plaques es van transferir a la foscor durant 21h. Així, a les 24h d'edat de la plàntula les plaques es van mantenir a les fosques, o es van cultivar sota llum R o FR i 3 dies després, és a dir, als 4d d'edat de la plàntula, es van prendre imatges per analitzar el seu fenotip. L'esquema del tractament i l'aspecte de plàntules silvestres sotmeses a les diferents fluències utilitzades en aquests experiments es mostra a continuació:

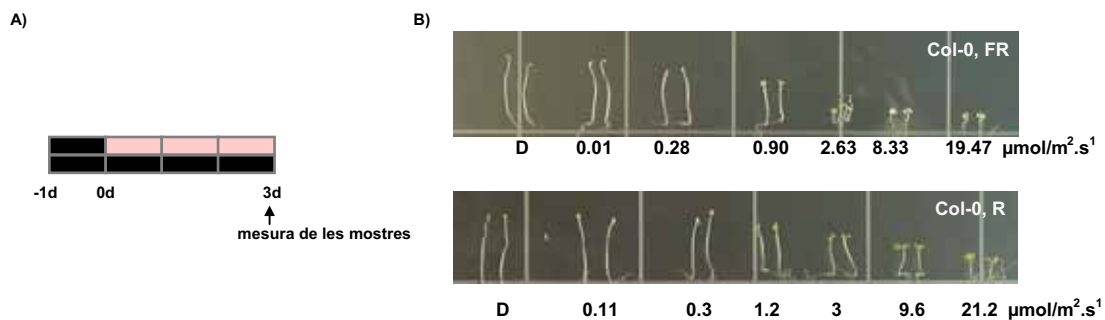


Figura M.6. Tractament de desetioliació sota diferents intensitats de llum per als estudis de fenotip fisiològic. **A**, esquema del tractament de desetioliació. **B**, aspecte de plàntules silvestres (Col-0) sotmeses a diferents fluències de FR o R.

2.4.5.3. Mesura dels fenotips fisiològics

Les anàlisis de fenotip de les plàntules es van realitzar sobre imatges digitals utilitzant el programa ImageJ (*National Institute of Health ImageJ software*. Bethesda, MD, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Per a les mesures dels hipocòtils, aquests es van col·locar plans sobre plaques d'agar per poder prendre les imatges. Per a les mesures de cotilèdons i fulles primàries, plàntules a les que se'ls hi havia tallat l'hipocòtil i les arrels es col·locaven planes sobre un film transparent autoadhesiu, que posteriorment s'escanejà. Es van analitzar un mínim de 15 plàntules per a cada tractament, i cada experiment es va repetir almenys 2 cops.

En aquest tipus d'anàlisis es representa la mitjana de les mesures amb les barres d'error que indiquen l'error estàndard de les mitjanes.

2.4.6. **Tractaments amb reguladors del creixement, cicloheximida i dexametasona**

Els tractaments realitzats han estat de 2 tipus:

A) De llarga durada. Quan les plàntules són cultivades en presència d'una determinat agent, aquest és afegit al medi abans de plaquejar-lo.

B) De curta durada. Els tractaments curts (d'unes poques h a 1d) es realitzen col·locant les plàntules crescudes sobre paper de filtre en una placa que conté 4 mL de la solució en aigua de l'agent amb què les vulguem tractar a la concentració corresponent. A continuació es mostren els diferents agents utilitzats en aquest treball:

AGENT	DESCRIPCIÓ
GA ₃	Àcid gibberèl·lic (GA)
Paclobutrazol (paclo)	Inhibidor de la biosíntesi de GAs
Epibrassinòlide (BL)	Anàleg sintètic dels BRs
Brassinazol (BRZ)	Inhibidor de la biosíntesi de BRs
6-BAP	6-benzil aminopurina (CK)
2,4-D	Àcid 2,4 diclorofenòxiacàtic. Auxina sintètica
NAA	Àcid naftalenacètic. Anàleg sintètic de les auxines
NPA	Àcid naftiltamàmic. Inhibidor del transport polar d'auxines
CHX	Cicloheximida. Inhibidor de la síntesi proteica
DEX	Dexametasona. Corticosteroide químic

Taula M.V. Reguladors de creixement i altres agents utilitzats en aquest treball.

2.4.7. **Quantificació de GAs**

El contingut de GAs en planta va ser analitzat per HPLC pel grup del Dr. García Martínez de l'IBMCP, Universitat de València, CSIC; tal i com es descriu a Vidal i col. (2003).

2.4.8. **Tinció histoquímica GUS**

La tinció histoquímica GUS es va realitzar segons descriuen Craft i col. (2005).

Procediment:

1. Posar les plàntules senceres individualment en plaques de multipouets amb un volum suficient per a cobrir-les d'acetona 90%. Mantenir 20 min. a 20°C.
2. Eliminar l'acetona i fer 2 rentats amb tampó fosfat 50 mM pH 7.2.
3. Eliminar el tampó fosfat i afegir el tampó GUS. Incubar a 37°C des d'unes hores fins O/N.
4. Aturar la reacció eliminant el tampó GUS i afegint etanol 70% (v/v). Guardar a 4°C O/N i fer canvis series creixents d'etanol per decolorar.
5. Per prendre fotografies de les mostres, es van canvis decreixents d'etanol fins al 40%. Llavors es canvia l'etanol 40% per glicerol 50% un parell de cops. Les plàntules es monten sobre un portaobjectes amb una mica de glicerol 50%.
6. Les preparacions de les plantes tenyides amb GUS es van observar en camp clar a la lupa Leica MZFLIII i les imatges es van prendre amb una càmera digital Leica DC200.

Solucions:

- **Tampó fosfat sòdic 1M pH 7.2:** $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 1 M. Ajustar el pH amb NaOH.
- **Tampó GUS:** tampó fosfat sòdic 50 mM, EDTA 10 mM, Tritó X-100 0.1%, ferricianida i ferrocianida en concentració variable, X-Gluc 0.5 mg/mL.

Notes:

- La ferricianida i la ferrocianida eviten la difusió de la tinció GUS en la planta, per això la concentració variable dependrà de la intensitat de la tinció i del tipus d'experiment que realitzem.
- El tampó GUS es pot reutilitzar 2 o 3 vegades, emmagatzemant-se a -20°C.

2.4.9. Localització subcel·lular

Per a l'estudi de la localització subcel·lular de PAR1 de plàntules transgèniques de 7d es van col·locar sobre un portaobjectes amb aigua i es van cobrir amb un cobreobjectes. La fluorescència GFP es va analitzar en un microscopi confocal Leica TCS SP utilitzant una línia d'excitació d'argó a 488 nm (*Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanya*) acoblat a una càmera digital. Es van examinar un mínim de 2 línies transgèniques independents per a cada construcció.

2.4.10. Estudis d'ultraestructura mitjançant microscopia electrònica de transmissió (MET)

L'observació ultraestructural dels cloroplasts mitjançant MET es va realitzar amb mostres de cotilèdons de plàntules silvestres, de 7d cultivades en Wc o sotmeses a un tractament d'ombra simulada (2d Wc+5d W+FR).

Tot el procés de preparació i observació de les mostres es realitzà en col·laboració amb el Servei de Microscòpia Electrònica de Transmissió dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona (UB), situat al Parc Científic de Barcelona, i el grup del Dr. Rodríguez Concepción.

La fixació de la mostra en blocs de resina va ser duta a terme pel personal del servei tal i com es descriu (Sauret, 2005).

2.4.10.1. Obtenció i observació de talls semifins

L'obtenció de talls semifins va ser duta a terme pel personal del servei. Els talls semifins es van dipositar sobre un portaobjectes de vidre i es van tenyir amb una solució de blau de metilè per poder observar-los al microscopi òptic (MO). Aquesta observació permeté determinar si les mostres s'havien processat correctament, visualitzar les estructures i determinar la zona per obtenir els talls ultrafins.

Les imatges de talls semifins s'obtingueren al Laboratori d'Anàlisi i Tractament d'Imatges dels Serveis Científicotècnics de la UB amb un microscopi Olympus Bx60 connectat a una càmera de vídeo JVC-1270. El tractament i les anàlisis de les imatges es realitzaren amb el *software* IMAT.

Solucions:

- **Blau de metilè (filtració 0.2 µm):** blau de metilè 0.5%, BORAX (tetraborat de sodi cristal·litzat) 0.5% en H₂O.

2.4.10.2. Obtenció i observació de talls ultrafins

L'obtenció de talls semifins va ser duta a terme pel personal del servei. Els talls ultrafins es van obtenir utilitzant un ultramicrotòtom *UltraCut-E* (Reichter-Jung) i es dipositaren sobre reixetes de coure. Es van contrastar incubant-los a TA amb acetat d'uranil 30 min. i citrat de plom en presència de NaOH 10 min.

Els talls ultrafins s'observaren amb un MET *JEOL 1010* amb un sistema de digitalització d'imatges *Multiscan* (Gatan), utilitzant l'aplicació informàtica d'adquisició d'imatges *Digital Micrograph* versió 3.3.0. (Gatan).

Solucions:

- **Solució d'acetat d'uranil:** 0.1 g d'acetat d'uranil en 5 mL H₂O.

- **Solució de citrat de plom:** 1.3 g de $Pb(NO_2)_2$, 1.76 g de $Na(C_6H_5O_7) \cdot 2 H_2O$, 8 mL de NaOH 1N, en 50 mL H₂O.

2.4.11. Mutagènesi de llavors de la línia PBL i cribratge de mutants

2.4.11.1. Mutagènesi de llavors amb l'agent químic EMS i obtenció de la generació M2

Procediment:

1. Posar unes 2500 llavors en un tub falcons de 50 mL amb 15 mL de Tween 0.1%. Agitar i deixar reposar 15 min.
2. Eliminar el Tween i afegir 15 mL de H₂O.

3. Sota campana, afegir 45 µL d'EMS (per obtenir una concentració d'EMS al 0.3 %) o 30 µL d'EMS (per obtenir una concentració d'EMS al 0.2 %). Agitar en un agitador orbital O/N.
4. Retirar la solució EMS (que es neutralitza amb NaOH 0.5 M).
5. Realitzar 3 rentats consecutius de les llavors amb H₂O. Rentar de nou les llavors amb H₂O durant 1h.
6. Repetir 2 cops més el pas 5.

Després de la mutagènesi, les llavors es sembren per obtenir la M2:

7. Pipetejar les llavors de l'últim rentat sobre paper de filtre dins d'una placa.
8. Estratificar les llavors mantenint-les a 4°C durant 3d.
9. Sembrar les llavors en test.

Nota:

L'etil metà sulfonat (EMS) és un agent alquilant que provoca canvis puntuals en la seqüència del DNA de G/C a A/T deguts a errors en la replicació o reparació del DNA. Donada la seva elevada mutagenicitat, s'ha de manipular amb extremada precaució.

2.4.11.2. Mesura de l'activitat luciferasa

Les llavors M2 es van esterilitzar tal i com s'indica a l'apartat 2.4.1. i cultivar durant 7d en Wc a 22°C en plaques amb medi amb un 2% de sacarosa. 24h abans de mesurar l'activitat luciferasa es vaporitzà les plantes amb quantitats saturants d'una solució de luciferina 1mM, el substrat de la luciferasa. Per a la mesura de la luminiscència es van prendre imatges de les plàntules utilitzant un temps d'exposició de 20 min. mitjançant el sistema de captació d'imatges *Night Owl Molecular Light Imager EG & G Berthold*, i les imatges es van processar amb el software *Wlightver27*. Les anàlisis de les dades es va dur a terme mitjançant el programa *Ianda Excel macrosuite* (<http://www.scripps.edu/cb/kay>).

Solucions:

- **Solució de luciferina (filtració 0.2 µm):** luciferina 100 mM, Tritó 0.01 % (v/v).

2.4.12. Anàlisi de micromatrius de RNA

Les anàlisis de micromatrius de RNA van ser dutes a terme pel Servei de Transcriptòmica del Proyecto GEFA del CNB de Madrid, i les dades van ser processades mitjançant el software Bioalma (<http://www.bioalma.com/spanish/index.php>).

3. Bioinformàtica

A més dels programes i softwares especificats en els diferents apartats anteriors, durant aquesta tesi s'han utilitzat les següents eines bioinformàtiques:

- Genevestigator: <https://www.genevestigator.ethz.ch/> (Zimmermann i col, 2004).

- MEGA (Molecular Evolutionary Genetica Anaylisis): <http://www.megasoftware.net/>. Utilitzat en la realització de l'arbre filogenètic dels gens *SAUR* en col·laboració amb el Dr. L. Carretero.

7. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

A

- Al-Sady, B., Ni, W., Kircher, S., Schäfer, E. i Quail, P.H.** 2006. Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Mol Cell*. 23(3): 439-446.
- Ang, L.H., Chattopadhyay, S., Wei, N., Oyama, T., Okada, K., Batschauer, A. i Deng, X.W.** 1998. Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of Arabidopsis development. *Mol Cell*. 1(2): 213-222.
- Atchley, W.R., Terhalle, W. i Dress, A.** 1999. Positional dependence, cliques, and predictive motifs in the bHLH protein domain. *J Mol Evol*. 48(5): 501-516.
- Aukerman, M.J., Hirschfeld, M., Wester, L., Weaver, M., Clack, T., Amasino, R.M. i Sharrock, R.A.** 1997. A deletion in the PHYD gene of the Arabidopsis Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/far-red light sensing. *Plant Cell*. 9(8): 1317-1326.
- Austin, J.R., 2nd, Frost, E., Vidi, P.A., Kessler, F. i Staehelin, L.A.** 2006. Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes i contain biosynthetic enzymes. *Plant Cell*. 18(7): 1693-1703.
- Ausubel, F.** 1989. Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Association, Brooklyn, NY.

B

- Ballaré, J.C.S., Schopel, A.L. i Sánchez, R.A.** 1990. Far-Red Radiation Reflected from Adjacent Leaves: An Early Signal of Competition in plant canopies. *Science*. 247(19): 329-332.
- Bauer, D., Viczian, A., Kircher, S., Nobis, T., Nitschke, R., Kunkel, T., Panigrahi, K.C., Adam, E., Fejes, E., Schäfer, E. i Nagy, F.** 2004. Constitutive Photomorphogenesis 1 and Multiple Photoreceptors Control Degradation of Phytochrome Interacting Factor 3, a Transcription Factor Required for Light Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*. 16:1433-1445.
- Benvenuto, G., Formiggini, F., Laflamme, P., Malakhov, M. i Bowler, C.** 2002. The photomorphogenesis regulator DET1 binds the amino-terminal tail of histone H2B in a nucleosome context. *Curr Biol*. 12(17): 1529-1534.
- Bimboin, H. i Doly, J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 7(6): 1613-1623.
- Blanc, G., Barakat, A., Guyot, R., Cooke, R. i Delseny, M.** 2000. Extensive duplication and reshuffling in the Arabidopsis genome. *Plant Cell*. 12(7): 1093-1101.
- Boccalandro, H.E., Rossi, M.C., Saijo, Y., Deng, X.W. i Casal, J.J.** 2004. Promotion of photomorphogenesis by COP1. *Plant Mol Biol*. 56(6): 905-915.
- Bognar, L.K., Hall, A., Adam, E., Thain, S.C., Nagy, F. i Millar, A.J.** 1999. The circadian clock controls the expression pattern of the circadian input photoreceptor, phytochrome B. *PNAS*. 96(25): 14652-14657.
- Bolle, C., Koncz, C. i Chua, N.H.** 2000. PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev*. 14(10): 1269-1278.
- Boylan, M.T. i Quail, P.H.** 1991. Phytochrome a overexpression inhibits hypocotyl elongation in transgenic Arabidopsis. *PNAS*. 88(23): 10806-10810.
- Bretagne-Sagnard, B., Guy Fouilloux, B. i Chupeau, Y.** 1996. Induced albina mutations as a tool for genetic analysis and cell biology in flax (*Linum usitatissimum*). *J. Exp. Bot*. 47: 189-194.
- Briggs, W.R. i Christie, J.M.** 2002. Phototropins 1 i 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci*. 7(5): 204-210.
- Byrne, M.E.** 2006. Shoot meristem function and leaf polarity: the role of class III HD-ZIP genes. *PLoS Genet*. 2(6): e89.

C

- Cahill, M.A., Ernst, W.H., Janknecht, R. i Nordheim, A.** 1994. Regulatory squelching. *FEBS Lett.* 344(2-3): 105-108.
- Carabelli, M., Morelli, G., Whitelam, G. i Ruberti, I.** 1996. Twilight-zone and canopy shade induction of the Athb-2 homeobox gene in green plants. *PNAS.* 93(8): 3530-3535.
- Carabelli, M., Sessa, G., Baima, S., Morelli, G. i Ruberti, I.** 1993. The Arabidopsis Athb-2 and -4 genes are strongly induced by far-red-rich light. *Plant J.* 4(3): 469-479.
- Cerdan, P.D., Staneloni, R.J., Casal, J.J. i Sanchez, R.A.** 1997. A 146 bp fragment of the tobacco Lhcb1*2 promoter confers very-low-fluence, low-fluence and high-irradiance responses of phytochrome to a minimal CaMV 35S promoter. *Plant Mol Biol.* 33(2): 245-255.
- Chen, M., Chory, J. i Fankhauser, C.** 2004. Light Signal Transduction in Higher Plants. *Annu Rev Genet.* 38:87-117.
- Choi, G., Yi, H., Lee, J., Kwon, Y.K., Soh, M.S., Shin, B., Luka, Z., Hahn, T.R. i Song, P.S.** 1999. Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature.* 401(6753): 610-613.
- Clough, R.C., Jordan-Beebe, E.T., Lohman, K.N., Marita, J.M., Walker, J.M., Gatz, C. i Vierstra, R.D.** 1999. Sequences within both the N- and C-terminal domains of phytochrome A are required for PFR ubiquitination and degradation. *Plant J.* 17(2): 155-167.
- Craft, J., Samalova, M., Baroux, C., Townley, H., Martinez, A., Jepson, I., Tsiantis, M. i Moore, I.** 2005. New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in Arabidopsis. *Plant J.* 41(6): 899-918.

D

- Davies, P.J.** 2004. Plant hormones. Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- De Grauwe, L., Vienbussche, F., Tietz, O., Palme, K. i Van Der Straeten, D.** 2005. Auxin, ethylene and brassinosteroids: tripartite control of growth in the Arabidopsis hypocotyl. *Plant Cell. Physiol* 46(6): 827-836.
- Deng, X.W., Matsui, M., Wei, N., Wagner, D., Chu, A.M., Feldmann, K.A. i Quail, P.H.** 1992. COP1, an Arabidopsis regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G beta homologous domain. *Cell.* 71(5): 791-801.
- Desnos, T., Puente, P., Whitelam, G.C. i Harberd, N.P.** 2001. FHY1: a phytochrome A-specific signal transducer. *Genes Dev.* 15(22): 2980-2990.
- Devlin, P.F., Patel, S.R. i Whitelam, G.C.** 1998. Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell.* 10(9): 1479-1487.
- Devlin, P.F., Robson, P.R., Patel, S.R., Goosey, L., Sharrock, R.A. i Whitelam, G.C.** 1999. Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in Arabidopsis by controlling elongation growth i flowering time. *Plant Physiol.* 119(3): 909-915.
- Devlin, P.F., Rood, S.B., Somers, D.E., Quail, P.H. i Whitelam, G.C.** 1992. Photophysiology of the Elongated Internode (ein) Mutant of Brassica rapa: ein Mutant Lacks a Detectable Phytochrome B-Like Polypeptide. *Plant Physiol.* 100(3): 1442-1447.
- Devlin, P.F., Yanovsky, M.J. i Kay, S.A.** 2003. A genomic analysis of the shade avoidance response in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 133(4): 1617-1629.
- Duek, P.D., Elmer, M.V., van Oosten, V.R. i Fankhauser, C.** 2004. The degradation of HFR1, a putative bHLH class transcription factor involved in light signaling, is regulated by phosphorylation and requires COP1. *Curr Biol.* 14(24): 2296-2301.

E

- Edwards, K., Johnstone, C. i Thompson, C.** 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19(6): 1349.

F

- Fairchild, C.D., Schumaker, M.A. i Quail, P.H.** 2000. HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev.* 14(18): 2377-2391.
- Fankhauser, C.** 2000. Phytochromes as light-modulated protein kinases. *Semin Cell Dev Biol.* 11(6): 467-473.
- Fankhauser, C., Yeh, K.C., Lagarias, J.C., Zhang, H., Elich, T.D. i Chory, J.** 1999. PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in Arabidopsis. *Science.* 284(5419): 1539-1541.
- Feinberg, A. i Vogelstein, B.,** 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity *Anal Biochem.* 132(1): 6-13.
- Franklin, K.A. i Whitelam, G.C.** 2004. Light signals, phytochromes and cross-talk with other environmental cues. *J Exp Bot.* 55(395): 271-276.
- Franklin, K.A. i Whitelam, G.C.** 2005. Phytochromes and Shade-avoidance Responses in Plants. *Ann Bot. (Lond).*
- Franklin, K.A., Davis, S.J., Stoddart, W.M., Vierstra, R.D. i Whitelam, G.C. 2003a.** Mutant analyses define multiple roles for phytochrome C in Arabidopsis photomorphogenesis. *Plant Cell.* 15(9): 1981-1989.
- Franklin, K.A., Praekelt, U., Stoddart, W.M., Billingham, O.E., Halliday, K.J. i Whitelam, G.C. 2003b.** Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 131(3): 1340-1346.
- Fraser, P., Pinto, M., Holloway, D. i Bramley, P.** 2000. Technical advance: application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *Plant J.* 24(4): 551-558.
- Friedrichsen, D.M., Nemhauser, J., Muramitsu, T., Maloof, J.N., Alonso, J., Ecker, J.R., Furuya, M. i Chory, J.** 2002. Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth. *Genetics.* 162(3): 1445-1456.

G

- Gil, P. i Green, P.J. 1996.** Multiple regions of the Arabidopsis SAUR-AC1 gene control transcript abundance: the 3' untranslated region functions as an mRNA instability determinant. *Embo J.* 15(7): 1678-1686.
- Gil, P., Liu, Y., Orbovic, V., Verkamp, E., Poff, K.L. i Green, P.J.** 1994. Characterization of the auxin-inducible SAUR-AC1 gene for use as a molecular genetic tool in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 104(2): 777-784.
- Goda, H., Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y. i Yoshida, S.** 2004. Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134(4): 1555-1573.
- Goda, H., Shimada, Y., Asami, T., Fujioka, S. i Yoshida, S.** 2002. Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 130(3): 1319-1334.
- Guo, H., Yang, H., Mockler, T.C. i Lin, C.** 1998. Regulation of flowering time by Arabidopsis photoreceptors. *Science.* 279(5355): 1360-1363.

H

- Hagen, G. i Guilfoyle, T.** 2002. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol.* 49(3-4): 373-385.
- Hall, A., Kozma-Bognar, L., Bastow, R.M., Nagy, F. i Millar, A.J.** 2002. Distinct regulation of CAB i PHYB gene expression by similar circadian clocks. *Plant J.* 32(4): 529-537.
- Halliday K.J.** (2004) Plant hormones: The interplay of brassinosteroids and auxin. *Curr Biol.* 14: R1008-R1010.

- Halliday, K.J. i Fankhauser, C.** 2003. Phytochrome-hormonal signaling networks. *New Phytol.*(157): 449-463.
- Hamazato, F., Shinomura, T., Hanzawa, H., Chory, J. i Furuya, M.** 1997. Fluence and wavelength requirements for Arabidopsis CAB gene induction by different phytochromes. *Plant Physiol.* 115(4): 1533-1540.
- Hardtke, C.S., Gohda, K., Osterlund, M.T., Oyama, T., Okada, K. i Deng, X.W.** 2000. HY5 stability and activity in Arabidopsis is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *Embo J.* 19(18): 4997-5006.
- Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B. i Bailey, P.C.** 2003. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol Biol Evol.* 20(5): 735-747.
- Hensel, L.L., Nelson, M.A., Richmond, T.A. i Bleecker, A.B.** 1994. The fate of inflorescence meristems is controlled by developing fruits in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 106(3): 863-876.
- Hoagli, D. i Arnold, D.** 1938. The water culture method for growing plants without soil. *Univ Calif Agric Exp Stu Circ.* 347: 39.
- Hoecker, U., Toledo-Ortiz, G., Bender, J. i Quail, P.H.** 2004. The photomorphogenesis-related mutant red1 is defective in CYP83B1, a red light-induced gene encoding a cytochrome P450 required for normal auxin homeostasis. *Planta.* 219(2): 195-200.
- Holm, M., Ma, L.G., Qu, L.J. i Deng, X.W.** 2002. Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in Arabidopsis. *Genes Dev.* 16(10): 1247-1259.
- Hsieh, H.L., Okamoto, H., Wang, M., Ang, L.H., Matsui, M., Goodman, H. i Deng, X.W.** 2000. FIN219, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of Arabidopsis development. *Genes Dev.* 14(15): 1958-1970.
- Huq, E. i Quail, P.H.** 2002. PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in Arabidopsis. *Embo J.* 21(10): 2441-2450.
- Huq, E., Al-Sady, B., Hudson, M., Kim, C., Apel, K. i Quail, P.H.** 2004. PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science.* 305(5692): 1937-1941.
- Huq, E., Kang, Y., Halliday, K.J., Qin, M. i Quail, P.H.** 2000. SRL1: a new locus specific to the phyB-signaling pathway in Arabidopsis. *Plant J.* 23(4): 461-470.
- J**
- Jan, Y.N. i Jan, L.Y.** 1993. Functional gene cassettes in development. *PNAS.* 90(18): 8305-8307.
- Jiao, Y., Lau, O.S. i Deng, X.W.** 2007. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet.* 8(3): 217-230.
- Johnson, C., Stout, P., Broyer, T. i Carlton, A.** 1957. Comparative chlorine requirements of different plant species. *Plant Soil.* 8(337-353).
- K**
- Karniol, B., Wagner, J.R., Walker, J.M. i Vierstra, R.D.** 2005. Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. *Biochem J.* 392(Pt 1): 103-116.
- Kehoe, D.M. i Grossman, A.R.** 1996. Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science.* 273(5280): 1409-1412.
- Kendrick, R.E. i Kronenberg, GHM.** 1994. Photomorphogenesis in Plants Kluwer Academic Publishers.
- Khanna, R., Huq, E., Kikis, E.A., Al-Sady, B., Lanzatella, C. i Quail, P.H.** 2004. A Novel Molecular Recognition Motif Necessary for Targeting Photoactivated Phytochrome Signaling to Specific Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors. *Plant Cell.*16(11):3033-44.

- Kim, B.C., Tennessen, D.J. i Last, R.L.** 1998. UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 15(5): 667-674.
- Kim, D.H., Kang, J.G., Yang, S.S., Chung, K.S., Song, P.S. i Park, C.M.** 2002. A phytochrome-associated protein phosphatase 2A modulates light signals in flowering time control in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 14(12): 3043-3056.
- Kim, J., Yi, H., Choi, G., Shin, B. i Song, P.S.** 2003. Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction. *Plant Cell.* 15(10): 2399-2407.
- Kim, J.A., Lee, M., Kim, Y.S., Woo, J.C. i Park, C.M.** 2005a. A basic helix-loop-helix transcription factor regulates cell elongation and seed germination. *Mol Cells.* 19(3): 334-341.
- Kim, J.I., Park, J.E., Zarate, X. i Song, P.S.** 2005b. Phytochrome phosphorylation in plant light signaling. *Photochem Photobiol Sci.* 4(9): 681-687.
- Kim, J.I., Shen, Y., Han, Y.J., Park, J.E., Kirchenbauer, D., Soh, M.S., Nagy, F., Schäfer, E. i Song, P.S.** 2004. Phytochrome phosphorylation modulates light signaling by influencing the protein-protein interaction. *Plant Cell.* 16(10): 2629-2640.
- Kircher, S., Gil, P., Kozma-Bognar, L., Fejes, E., Speth, V., Husselstein-Muller, T., Bauer, D., Adam, E., Schäfer, E. i Nagy, F.** 2002. Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, i E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell.* 14(7): 1541-1555.
- Kircher, S., Kozma-Bognar, L., Kim, L., Adam, E., Harter, K., Schäfer, E. i Nagy, F.** 1999. Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell.* 11(8): 1445-1456.
- L**
- Li, J., Nagpal, P., Vitart, V., McMorris, T.C. i Chory, J.** 1996. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science.* 272(5260): 398-401.
- Lin, C. i Shalitin, D.** 2003. Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 54: 469-496.
- Lin, R. i Wang, H.** 2005. Two homologous ATP-binding cassette transporter proteins, AtMDR1 i AtPGP1, regulate *Arabidopsis* photomorphogenesis and root development by mediating polar auxin transport. *Plant Physiol.* 138(2): 949-964.
- Lopez-Juez, E. i Pyke, K.A.** 2005. Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *Int J Dev Biol.* 49(5-6): 557-577.
- Lopez-Juez, E., Nagatani, A., Tomizawa, K., Deak, M., Kern, R., Kendrick, R.E. i Furuya, M.** 1992. The cucumber long hypocotyl mutant lacks a light-stable PHYB-like phytochrome. *Plant Cell.* 4(3): 241-251.
- Luccioni, L.G., Oliverio, K.A., Yanovsky, M.J., Boccaliro, H.E. i Casal, J.J.** 2002. Brassinosteroid mutants uncover fine tuning of phytochrome signaling. *Plant Physiol.* 128(1): 173-181.
- M**
- Ma, L., Li, J., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H. i Deng, X.W.** 2001. Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell.* 13(12): 2589-2607.
- Ma, L., Zhao, H. i Deng, X.W.** 2003. Analysis of the mutational effects of the COP/DET/FUS loci on genome expression profiles reveals their overlapping yet not identical roles in regulating *Arabidopsis* seedling development. *Development.* 130(5): 969-981.
- Makino, S., Matsushika, A., Kojima, M., Yamashino, T. i Mizuno, T.** 2002. The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of *Arabidopsis thaliana*: I. Characterization with APRR1-overexpressing plants. *Plant Cell Physiol.* 43(1): 58-69.
- Mancinelli, A.** 1994. The physiology of phytochrome action. in *Photomorphogenesis in plants* (ed. K.R.a.K. GHM), pp. 211-269. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam.

- Martinez-Garcia, J.F., Huq, E. i Quail, P.H.** 2000. Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science*. 288(5467): 859-863.
- Mathews, S. i Sharrock, R.A.** 1997. Phytochrome gene diversity. *Plant, Cell & Environment*. 20(6): 666-671.
- Matsushita, T., Mochizuki, N. i Nagatani, A.** 2003. Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature*. 424(6948): 571-574.
- Millenaar, F.F., Cox, M.C., van Berkel, Y.E., Welschen, R.A., Pierik, R., Voesenek, L.A. i Peeters, A.J.** 2005. Ethylene-induced differential growth of petioles in Arabidopsis. Analyzing natural variation, response kinetics, and regulation. *Plant Physiol*. 137(3): 998-1008.
- Monte, E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Zhang, Y., Li, X., Young, J., Austin-Phillips, S. i Quail, P.H.** 2003. Isolation and characterization of phyC mutants in Arabidopsis reveals complex crosstalk between phytochrome signaling pathways. *Plant Cell*. 15(9): 1962-1980.
- Monte, E., Tepperman, J.M., Al-Sady, B., Kaczorowski, K.A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Li, X., Zhang, Y. i Quail, P.H.** 2004. Inaugural Article: The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *PNAS*. 101(46): 16091-16098.
- Morelli, G. i Ruberti, I.** 2000. Shade avoidance responses. Driving auxin along lateral routes. *Plant Physiol*. 122(3): 621-626.
- Morelli, G. i Ruberti, I.** 2002. Light and shade in the photocontrol of Arabidopsis growth. *Trends Plant Sci*. 7(9): 399-404.
- N**
- Nagatani, A., Reed, J.W. i Chory, J.** 1993. Isolation and Initial Characterization of Arabidopsis Mutants That Are Deficient in Phytochrome A. *Plant Physiol*. 102(1): 269-277.
- Nagy, F. i Schäfer, E.** 2000. Control of nuclear import and phytochromes. *Curr Opin Plant Biol*. 3(6): 450-454.
- Nagy, F. i Schäfer, E.** 2002. Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*. 53: 329-355.
- Nakamura, A., Higuchi, K., Goda, H., Fujiwara, M.T., Sawa, S., Koshiba, T., Shimada, Y. i Yoshida, S.** 2003. Brassinolide induces IAA5, IAA19, i DR5, a synthetic auxin response element in Arabidopsis, implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signaling. *Plant Physiol*. 133(4): 1843-1853.
- Nakamura, M., Katsumata, H., Abe, M., Yabe, N., Komeda, Y., Yamamoto, K.T. i Takahashi, T.** 2006. Characterization of the class IV homeodomain-Leucine Zipper gene family in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 141(4): 1363-1375.
- Neff, M.M., Fankhauser, C. i Chory, J.** 2000. Light: an indicator of time and place. *Genes Dev*. 14(3): 257-271.
- Neff, M.M., Nguyen, S.M., Malancharuvil, E.J., Fujioka, S., Noguchi, T., Seto, H., Tsubuki, M., Honda, T., Takatsuto, S., Yoshida, S. i Chory, J.** 1999. BAS1: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in Arabidopsis. *PNAS*. 96(26): 15316-15323.
- Nemhauser, J.L., Mockler, T.C. i Chory, J.** 2004. Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis. *PLoS Biol*. 2(9): E258.
- Ni, M., Tepperman, J.M. i Quail, P.H.** 1998. PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell*. 95(5): 657-667.
- O**
- Ohgishi, M., Oka, A., Morelli, G., Ruberti, I. i Aoyama, T.** 2001. Negative autoregulation of the Arabidopsis homeobox gene ATHB-2. *Plant J*. 25(4): 389-398.
- Olsen, J.J., O, Nielsen, J., Eriksson, M.E., Martinussen, I., Olsson, O., Siberg, G. i Moritz, T.** 1997. Ectopic expression of oat phytochrome A in hybrid aspen changes critical daylength for growth and prevents cold acclimatization. *Plant J*. 12: 1339-1350.

Osterlund, M.T., Ang, L.H. i Deng, X.W. 1999. The role of COP1 in repression of Arabidopsis photomorphogenic development. *Trends Cell Biol.* 9(3): 113-118.

Osterlund, M.T., Wei, N. i Deng, X.W. 2000. The roles of photoreceptor systems and the COP1-targeted destabilization of HY5 in light control of Arabidopsis seedling development. *Plant Physiol.* 124(4): 1520-1524.

Oyama, T., Shimura, Y. i Okada, K. 1997. The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev.* 11(22): 2983-2995.

P

Peng, J. i Harberd, N.P. 1993. Derivative Alleles of the Arabidopsis Gibberellin-Insensitive (gai) Mutation Confer a Wild-Type Phenotype. *Plant Cell.* 5(3): 351-360.

Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P. i Harberd, N.P. 1997. The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* 11(23): 3194-3205.

Pepper, A., Delaney, T., Washburn, T., Poole, D. i Chory, J. 1994. DET1, a negative regulator of light-mediated development and gene expression in arabidopsis, encodes a novel nuclear-localized protein. *Cell.* 78(1): 109-116.

Pierik, R., Whitelam, G.C., Voesenek, L.A., de Kroon, H. i Visser, E.J. 2004. Canopy studies on ethylene-insensitive tobacco identify ethylene as a novel element in blue light and plant-plant signalling. *Plant J.* 38(2): 310-319.

Prigge, M.J., Otsuga, D., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Drews, G.N. i Clark, S.E. 2005. Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in Arabidopsis development. *Plant Cell.* 17(1): 61-76.

Q

Quail, P. 1997. An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant, Cell & Environment.* 20: 657-665.

Quail, P.H. 2000. Phytochrome-interacting factors. *Semin Cell Dev Biol.* 11(6): 457-466.

Quail, P.H. 2002a. Photosensory perception i signalling in plant cells: new paradigms? *Curr Opin Cell Biol.* 14(2): 180-188.

Quail, P.H. 2002b. Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(2): 85-93.

R

Robson, P. i Smith, H. 1997. Fundamental and biotechnological applications of phytochrome transgenes. *Plant Cell & Environment.* 20: 831-839.

Robson, P.R., McCormac, A.C., Irvine, A.S. i Smith, H. 1996. Genetic engineering of harvest index in tobacco through overexpression of a phytochrome gene. *Nat Biotechnol.* 14(8): 995-998.

Rodriguez-Concepcion, M., Fores, O., Martinez-Garcia, J.F., Gonzalez, V., Phillips, M.A., Ferrer, A. i Boronat, A. 2004. Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during Arabidopsis seedling development. *Plant Cell.* 16(1): 144-156

Ryu, J.S., Kim, J.I., Kunkel, T., Kim, B.C., Cho, D.S., Hong, S.H., Kim, S.H., Ferniez, A.P., Kim, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Nagy, F., Lim, P.O., Song, P.S., Schäfer, E. i Nam, H.G. 2005. Phytochrome-specific type 5 phosphatase controls light signal flux by enhancing phytochrome stability and affinity for a signal transducer. *Cell.* 120(3): 395-406.

S

- Sablowski, R.W. i Meyerowitz, E.M.** 1998. A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell*. 92(1): 93-103.
- Saibo, N.J., Vriezen, W.H., Beemster, G.T. i Van Der Straeten, D.** 2003. Growth and stomata development of Arabidopsis hypocotyls are controlled by gibberellins i modulated by ethylene and auxins. *Plant J*. 33(6): 989-1000.
- Saijo, Y., Sullivan, J.A., Wang, H., Yang, J., Shen, Y., Rubio, V., Ma, L., Hoecker, U. i Deng, X.W.** 2003. The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes Dev*. 17(21): 2642-2647.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. i Erlich, H.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239(4839): 487-491.
- Salter, M.G., Franklin, K.A. i Whitelam, G.C.** 2003. Gating of the rapid shade-avoidance response by the circadian clock in plants. *Nature*. 426(6967): 680-683.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F. i Coupli, G.** 2000. Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science*. 288(5471): 1613-1616.
- Sambrook, J.** 2001. Molecular cloning: A Laboratory Manual
- Sauret, G., S.** 2005. Estrategias genéticas para el estudio de la síntesis de isoprenoides en bacterias y plastos. Tesis doctoral.
- Sawa, S., Ohgishi, M., Goda, H., Higuchi, K., Shimada, Y., Yoshida, S. i Koshiba, T.** 2002. The HAT2 gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in Arabidopsis. *Plant J*. 32(6): 1011-1022.
- Sawers, R.J., Sheehan, M.J. i Brutnell, T.P.** 2005. Cereal phytochromes: targets of selection, targets for manipulation? *Trends Plant Sci*. 10(3): 138-143.
- Schäfer, E. i Bowler, C.** 2002. Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO reports*. 3: 1042-1048
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carre, I.A. i Coupland, G.** 1998. The late elongated hypocotyl mutation of Arabidopsis disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell*. 93(7): 1219-1229.
- Schena, M., Lloyd, A.M. i Davis, R.W.** 1993. The HAT4 gene of Arabidopsis encodes a developmental regulator. *Genes Dev*. 7(3): 367-379.
- Schepens, I., Duek, P. i Fankhauser, C.** 2004. Phytochrome-mediated light signalling in Arabidopsis. *Curr Opin Plant Biol*. 7(5): 564-569.
- Schrick, K., Nguyen, D., Karlowski, W.M. i Mayer, K.F.** 2004. START lipid/sterol-binding domains are amplified in plants and are predominantly associated with homeodomain transcription factors. *Genome Biol*. 5(6): R41.
- Schroeder, D.F., Gahrtz, M., Maxwell, B.B., Cook, R.K., Kan, J.M., Alonso, J.M., Ecker, J.R. i Chory, J.** 2002. De-etiolated 1 and damaged DNA binding protein 1 interact to regulate Arabidopsis photomorphogenesis. *Curr Biol*. 12(17): 1462-1472.
- Seo, H.S., Watanabe, E., Tokutomi, S., Nagatani, A. i Chua, N.H.** 2004. Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes Dev*. 18:617-622.
- Seo, H.S., Yang, J.Y., Ishikawa, M., Bolle, C., Ballesteros, M.L. i Chua, N.H.** 2003. LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature*. 424(6943): 995-999.
- Sessa, G., Carabelli, M., Sassi, M., Ciolfi, A., Possenti, M., Mittempergher, F., Becker, J., Morelli, G. i Ruberti, I.** 2005. A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in Arabidopsis. *Genes Dev*. 19(23): 2811-2815.

- Sharrock, R.A. i Quail, P.H.** 1989. Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev.* 3(11): 1745-1757.
- Smith, H.** 1982. Light quality, photoreception, and plant strategy. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 481-518.
- Smith, H.** 2000. Phytochromes and light signal perception by plants--an emerging synthesis. *Nature.* 407(6804): 585-591.
- Smith, H. i Whitelam, G.C.** 1997. The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes *Plant, Cell & Environment.* 20(6): 840-844.
- Staiger, D., Allenbach, L., Salathia, N., Fiechter, V., Davis, S.J., Millar, A.J., Chory, J. i Fankhauser, C.** 2003. The *Arabidopsis* SRR1 gene mediates phyB signaling and is required for normal circadian clock function. *Genes Dev.* 17(2): 256-268.
- Steindler, C., Matteucci, A., Sessa, G., Weimar, T., Ohgishi, M., Aoyama, T., Morelli, G. i Ruberti, I.** 1999. Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development.* 126(19): 4235-4245.
- T**
- Tepperman, J.M., Zhu, T., Chang, H.S., Wang, X. i Quail, P.H.** 2001. Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *PNAS.* 98(16): 9437-9442.
- Thiele, A., Herold, M., Lenk, I., Quail, P.H. i Gatz, C.** 1999. Heterologous expression of *Arabidopsis* phytochrome B in transgenic potato influences photosynthetic performance and tuber development. *Plant Physiol.* 120(1): 73-82.
- Tian, Q., Uhlir, N.J. i Reed, J.W.** 2002. *Arabidopsis* SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *Plant Cell.* 14(2): 301-319.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E. i Quail, P.H.** 2003. The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell.* 15(8): 1749-1770.
- Towbin, H., Staehelin, T. i Gordon, J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS.* 76(9): 4350-4354.
- U**
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.Y., Hsing, Y.I., Kitano, H., Yamaguchi, I. i Matsuoka, M.** 2005. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature.* 437(7059): 693-698.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. i Guilfoyle, T.J.** 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell.* 9(11): 1963-1971.
- V**
- Vandenbussche, F., Pierik, R., Millenaar, F.F., Voeselek, L.A. i Van Der Straeten, D.** 2005. Reaching out of the shade. *Curr Opin Plant Biol.* 8:1-7.
- Vandenbussche, F., Vriezen, W.H., Smalle, J., Laarhoven, L.J., Harren, F.J. i Van Der Straeten, D.** 2003. Ethylene and auxin control the *Arabidopsis* response to decreased light intensity. *Plant Physiol.* 133(2): 517-527.
- Vidal, A.M., Ben-Cheikh, W., Talon, M. i Garcia-Martinez, J.L.** 2003. Regulation of gibberellin 20-oxidase gene expression and gibberellin content in citrus by temperature and citrus exocortis viroid. *Planta.* 217(3): 442-448.
- Vision, T.J., Brown, D.G. i Tanksley, S.D.** 2000. The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. *Science.* 290(5499): 2114-2117.
- von Arnim, A.G., Osterlund, M.T., Kwok, S.F. i Deng, X.W.** 1997. Genetic and developmental control of nuclear accumulation of COP1, a repressor of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 114(3): 779-788.

Vriezen, W.H., Achard, P., Harberd, N.P. i Van Der Straeten, D. 2004. Ethylene-mediated enhancement of apical hook formation in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings is gibberellin dependent. *Plant J.* 37(4): 505-516.

W

Wagner, D., Fairchild, C.D., Kuhn, R.M. i Quail, P.H. 1996. Chromophore-bearing NH₂-terminal domains of phytochromes A and B determine their photosensory specificity i differential light lability. *PNAS.* 93(9): 4011-4015.

Wagner, D., Tepperman, J.M. i Quail, P.H. 1991. Overexpression of Phytochrome B Induces a Short Hypocotyl Phenotype in Transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 3(12): 1275-1288.

Wagner, J.R., Brunzelle, J.S., Forest, K.T. i Vierstra, R.D. 2005. A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature.* 438(7066): 325-331.

Wagner, J.R., Zhang, J., Brunzelle, J.S., Vierstra, R.D. i Forest, K.T. 2007. High resolution structure of deinococcus bacteriophytochrome yields new insights into phytochrome architecture i evolution. *J Biol Chem.* 282(16): 12298-12309.

Wang, H. i Deng, X. 2002. Phytochrome Signaling Mechanism. in *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists.

Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G. i Waterhouse, P.M. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27(6): 581-590.

Weston, E., Thorogood, K., Vinti, G. i Lopez-Juez, E. 2000. Light quantity controls leaf-cell and chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* wild type i blue-light-perception mutants. *Planta.* 211(6): 807-815.

Whitelam, G.C. i Smith, H. 1991. Retention of phytochrome-mediated shade avoidance responses in phytochrome-deficient mutants of *Arabidopsis*, cucumber i tomato. *J. Plant Phys.* 139(1): 119-125.

Whitelam, G.C., Johnson, E., Peng, J., Carol, P., Ierson, M.L., Cowl, J.S. i Harberd, N.P. 1993. Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell.* 5(7): 757-768.

Wilkinson, M., Doskow, J. i Lindsey, S. 1991. RNA blots: staining procedures and optimization of conditions. *Nucleic Acids Res.* 19(3): 679.

Y

Yamashino, T., Matsushika, A., Fujimori, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. i Mizuno, T. 2003. A Link between circadian-controlled bHLH factors and the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 44(6): 619-629.

Yanagawa, Y., Sullivan, J.A., Komatsu, S., Gusmaroli, G., Suzuki, G., Yin, J., Ishibashi, T., Saijo, Y., Rubio, V., Kimura, S., Wang, J. i Deng, X.W. 2004. *Arabidopsis* COP10 forms a complex with DDB1 i DET1 in vivo and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes. *Genes Dev.* 18(17): 2172-2181.

Yang, H.Q., Tang, R.H. i Cashmore, A.R. 2001. The signaling mechanism of *Arabidopsis* CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell.* 13(12): 2573-2587.

Yeh, K.C. i Lagarias, J.C. 1998. Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *PNAS.* 95(23): 13976-13981.

Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T. i Chory, J. 2005. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell.* 120(2): 249-259.

Yin, Y., Wang, Z.Y., Mora-Garcia, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T. i Chory, J. 2002. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell.* 109(2): 181-191.

Z

- Zhu, Y., Tepperman, J.M., Fairchild, C.D. i Quail, P.H.** 2000. Phytochrome B binds with greater apparent affinity than phytochrome A to the basic helix-loop-helix factor PIF3 in a reaction requiring the PAS domain of PIF3. *PNAS*. 97(24): 13419-13424.
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L i Grissem W.** 2004. GENEVESTIGATOR. Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiol*. 136: 2621-2632.
- Zimmermann, S., Baumann, A., Jaekel, K., Marbach, I., Engelberg, D. i Frohnmeyer, H.** 1999. UV-responsive genes of arabidopsis revealed by similarity to the Gcn4-mediated UV response in yeast. *J Biol Chem*. 274(24): 17017-17024.

8. ANNEX

ANNEX

Del treball presentat en aquesta tesi n'han resultat dos articles, els quals s'indiquen a continuació:

Roig-Villanova, I., Bou, J., Sorin, C., Devlin, P.F., and Martinez-Garcia, J.F. 2006. Identification of Primary Target Genes of Phytochrome Signaling. Early Transcriptional Control during Shade Avoidance Responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* **141**(1): 85-96.

Roig-Villanova, I., Bou-Torrent, J., Galstyan, A., Carretero-Paulet, L., Portoles, S., Rodriguez-Concepcion, M., and Martinez-Garcia, J.F. 2007. Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins. *Embo J* **26**(22): 4756-4767.