



Control hormonal i genètic de la síndrome de fugida de l'ombra en *Arabidopsis thaliana*

Mercè Salla i Martret

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG)
Departament de Genètica Molecular



Universitat de Barcelona
Facultat de Farmàcia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Màster de Biotecnologia
bienni 2007-2008

CONTROL HORMONAL I GENÈTIC DE LA SÍNDROME DE FUGIDA DE L'OMBRA EN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Mercè Salla i Martret
Barcelona, 2012



Universitat de Barcelona
Facultat de Farmàcia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Doctorat de Biotecnologia

CONTROL HORMONAL I GENÈTIC DE LA SÍNDROME DE FUGIDA DE L'OMBRA EN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Memoria presentada per Mercè Salla i Martret per optar al títol
de doctora de la Universitat de Barcelona

Aquest treball, realitzat al Laboratori de Genètica Molecular Vegetal
del CRAG, ha estat finançat pel CSIC amb la beca predoctoral JAE-Pre2007.

Vist-i-plau de:

el director de la tesi

l'autora

Dr. Jaime F. Martinez Garcia

Mercè Salla-Martret

Barcelona, 2012

Diuen que escriure una tesi és com tenir un fill...

Agraïments

agraïment

n. m. Sentiment de qui reconeix i correspon a les atencions rebudes

Ho reconec: plasmar en paraules tot el que un vol agrair, i citar a tots els que mereixen ser citats -que no seran ni la meitat dels que citaré-, és més complicat del que em pensava. I confesso que se m'escapa un somriure quan em venen al cap les paraules de la Carmen, un cop acabada la tesi del Ramón, quan ens explicava amb to de sorna que quan la convidaven com a membre del tribunal en una tesi "lo primero que me leo son los agradecimientos, y con eso decido si vale la pena o no leer la tesis".

Conseqüència inevitable començo a fer una mena de *brainstorming terapèutic* de tot el que vull dir i ubicar totes les persones a les que els hi vull agrair quelcom. Aquests tres anys i mig de tesi no haurien estat el que han estat sense els que m'han acompanyat, ja fos un trosset de camí llarg (santa paciència la vostra) o curt. D'aquesta manera, i avançant-me al que vindrà, a tots els que directa o indirectament us anomenaré us dono les gràcies per avançat, sabeu que us estimo ^_^; als que m'oblidaré mencionar us demano perdó ☹ (sóc un cap de pardals, ho sabeu), i als que esteu llegint aquestes pàgines us demano disculpes per ser tan emfàtica en alguns comentaris, però és que poques vegades ens parem a mirar enrere i valorem tot allò que hem rebut. I sabeu el més curiós? Que em sorprenc a mi mateixa somrient davant l'ordinador (un altre cop), orgullosa d'haver triat aquest camí.

Us prometo que intentaré ser breu ;) (almenys tant com ho he intentat en la introducció, fet pel qual també n'anticipo les disculpes).

Primer de tot vull agrair al Jaume que em brindés l'oportunitat de realitzar la tesi al seu laboratori, i que em fes veure que l'ordre i la organització en són un pilar fonamental. A la Lluïsa, agrair-li que m'obris les portes al món del fitocrom. To JC & his *xampinyon's* lab, I'm so thankful for the way you welcomed me, for our scientific discussions and for your support with light/development connections.

A tots els *liles* que m'heu ajudat, m'heu il·lusionat i rigut amb mi, que m'heu fet sentir orgullosa i afortunada de tenir-vos al meu costat, sabeu que us estimo (i que us faria una abraçada a l'estil de la Txiqui, ben muniqueta!). Perquè si una cosa és important en un laboratori, aquesta és el sentiment de família. Saber que pots comptar amb els que t'envolten, ja sigui per maleir aquell experiment que no acaba de sortir com per comentar la jugada del cap de setmana. Visca els labmeetings improvisats!. A partir d'aquí heu fet que tot fos més fàcil... i us estic eternament agraïda per això. He promès

ser sintètica... però que sapiguen que em podria allargar unes quantes pàgines en aquest paràgraf.

Extendré els agraïments als CRAGenses pels mil somriures que hem compartit, les estones de cafès, de confocals, de seminaris, de congressos, de converses de sofà i d'hivernacles, entre d'altres. De vegades no n'éreu conscients, però fèieu que el dia a dia fos una miqueta més fàcil. De nou em disculpo per no anomenar-vos un a un.

Obrint el *zoom* de reflexions en el que em trobo, me n'adono que el recolzament fora de cercle científic ha estat immillorable, i me'n sento tremendament afortunada.

Als espartans d'Av.Madrid, perquè amb allò de “no hay dolor” es crea un forat espai-temporal on desapareixen tots els problemes, kiaaaaaaaaaaaa!!! He dit.

Al Rafe i tots aquells companys de camí amb els que hem mantingut contacte; veure com ens anem fent grans i poder compartir-ho, amb les penes i les alegries, malgrat la distància, és quelcom impagable.

Als meus esquirols esplaiers, perquè sempre heu estat presents, al meu costat, animant-me i donant-me suport. Perquè són moltes les aventures viscudes al vostre costat, innombrables històries de jocs de rol nocturns (Ginebraaaaaaa,estic boig per tuuuuuu), interminables tardes de guitarra (tubercle ultratòmic!), sopars a l'Arran (5€ per braves, entrepà i birra??? :P) i un *sinfín* de moments meravellosos. Mil gràcies, de veritat :D. I endavant amb les trobades de *camping dominpowers*, que són “lu millor”! i pendonet, you are the very best!!! Sempre seré un pendonet rialler patós :P

A *nuestro querido Lab9*, perquè sense vosaltres no seria qui sóc. Heu estat, sou i sereu una part molt important de la meua vida. Entre *Cucumis* etiolats i *Robinia*, hem passat per bodes, naixements d'angelets, aventures de caus, estones de tes, mudances de pisos... us estimo no molt, moltíssim! i ho sabem: lo que el fitocromo ha unido, ya no se puede separar ^_^

I mentre el *brainstorming* continua, m'autorecordo que aquesta part de la tesi és l'única on realment puc expressar el que sento, el meu raconet personal, i inevitablement trobo els veritables causants de tota aquesta aventura i decideixo prendre'm el luxe d'esplaiar-me una mica més en ells. Si aquesta tesi s'ha pogut dur a terme és gràcies als meus pares, als quals els hi dec tot el que tinc. Sou els que més us mereixeu que us digui que us estimo, i potser als qui menys us ho recordo, ho sento. Sense la vostra fe cega en mi, aquella que ara reconec i admiro, no hauria arribat fins aquí. Us estimo, i molt. Gràcies per estar al meu costat i creure en mi. Us felicito no només per ser uns

grans pares, sinó per ser uns avis genials. A la Laia li dec molt més del que se li deu a una germana, perquè, desenganyem-nos, ets mil vegades més que això. No anomenaré tot el que ens uneix perquè per això caldrien vàries tesis, només dir-te that *babe, I'm here again, I tell you I'm here again, where have you been?* (because I think that you speak with my sister, baby; tenim un concert pendent!).

Per anar acabant amb el postre de gratitud, talment com si fos un pastís de pa de pessic amb xocolata i nous fet per uns estudiants de biologia, t'ho agraeixo a tu Ramón. Perquè tu fas que vulgui ser millor persona i que em dones recolzament incondicional. Perquè m'encanta veure com se t'il·luminen els ulls parlant de ciència, perquè m'esperes quan treballo (fem una pizza mentre corre el gel?), perquè t'espero quan treballes (t'havia comentat que el diumenge tinc unes cèl·lules que necessiten menjar i... ehem :P), perquè m'enyores quan no hi sóc, perquè pateixes quan jo ploro i rius quan jo ric... perquè si hagués de fer de Sylar et robaria més d'una virtut i perquè el *kookaburra* no és només un equip de hoquei australià. Perquè només al teu costat em puc imaginar una vida de viejitos a les Annapurnes... i... saps què en penso de tot plegat? Doncs que sóc afortunada de tenir per davant tota una vida al teu costat.

I, evidentment, les gràcies a la *guinda* del pastís, al *targaryan* més petit de la comarca, al tresor dels Goonies particular, a la meva tortugueta, al Gabriel. A ell, que sense saber-ho, entre calostres o meconis inicials, ha esdevingut la llum de la nostra vida i l'alegria de viure. A tu, petit, per haver-te passat hores i hores al meu costat mentre jo escrivia, per ser un angelet, per regalar-me cada dia un nou somriure carregat d'innocència, per ensenyar-me a relativitzar i a fruitar una mica més de la vida; per ser, en definitiva, el motor que mou el meu món.

I arribats a aquest moment, crec que ja puc començar a passar pàgina. Sóc conscient que hagués pogut escriure aquestes paraules de moltes maneres, però penso que aquesta és tan vàlida com qualsevol altra... el que vingui, després d'aquesta meua humil contribució, ben rebut serà, perquè tot just aquest és l'inici d'un nou camí. Almenys així és com ho visc jo, aquí i ara.

Diuen que "*escriure una tesi és com tenir un fill*".

També diuen que, a més a més, "*cal plantar un arbre i escriure un llibre*".

Sincerament, a aquestes alçades, puc dir que sóc feliç.

...Always look on the bright side of life.



ÍNDEX

1. Introducció.....	1
1.1. La llum: un factor abiòtic important per les plantes.....	3
1.2. Fotomorfogènesi vegetal.....	3
1.3. Percepció de la llum: els fotoreceptors vegetals.....	4
1.3.1. Criptocroms.....	4
1.3.2. Fototropines i altres proteïnes amb dominis LOV.....	5
1.3.3. Fitocroms.....	6
1.3.3.1. Estructura molecular.....	8
1.3.3.2. Filogènia.....	10
1.3.3.3. Tipus de respostes.....	10
1.3.3.4. Funcions dels diferents fitocroms.....	11
1.4. Senyals de transducció dels fotoreceptors.....	12
1.4.1. Gens implicats en la transducció de senyals lumínics.....	13
1.4.2. El cas concret dels fitocroms.....	15
1.4.2.1. Components de la senyalització de phyA.....	15
1.4.2.2. Components de la senyalització de phyB.....	15
1.4.3. Respostes fisiològiques regulades pels fitocroms.....	16
1.4.4. SAS: respostes adaptatives per competir per la llum.....	18
1.5. Mecanismes moleculars de la SAS.....	20
1.5.1. Components moleculars reguladors de les respostes SAS: el paper dels PIFs i DELLAs.....	21
1.5.2. Components moleculars reguladors de les respostes SAS: el paper dels PARs que codifiquen per bHLH.....	23
1.5.3. Components moleculars reguladors de les respostes SAS: el paper dels ATHBs i HATs.....	24
1.5.4. Integració dels components reguladors de la SAS en xarxes transcripcionals.....	26
1.6. Connexió entre la senyalització SAS i altres vies reguladores:.....	27
1.6.1. Relotge circadià.....	27
1.6.2. Baixa i alta temperatura.....	28
1.6.3. Hormones.....	29
1.6.3.1. Auxines.....	29
1.6.3.2. Brassinosteroides.....	32
1.6.3.3. Giberel·lines.....	33
1.6.3.4. Etilè.....	33
1.6.4. Integració de xarxes transcripcionals regulades per hormones i ombra en el control de la SAS.....	34
1.7. Aspectes espaials i temporals de la senyalització SAS.....	34
1.8. Nous components de la SAS: HD-Zips.....	35
1.9. Aplicacions biotecnològiques de l'estudi de les respostes de la SAS.....	39
2. Objectius.....	41
3. Resultats.....	45
3.1. Capítol I: Estudi de la regió promotora de SAUR15.....	47
3.1.1. Paper de 3 E-boxes (I, II, III) en el promotor de SAUR15 (700 pb).....	51
3.1.2. Funcionalitat del promotor de SAUR15 (470pb).....	55
3.1.3. Paper de les E-box (IV, V) en el promotor de SAUR15.....	57
3.1.4. Paper dels Auxin Response Elements (ARE) en el promotor de SAUR15.....	58

3.2. Capítol II: Implicació en la SAS de mutants hormonal	61
3.2.1. Implicació de BRs en les respostes de la SAS.....	63
3.2.1.1. <i>BRI1</i>	64
3.2.1.2. <i>BES1</i>	66
3.2.1.3. <i>BZR1</i>	68
3.2.1.4. <i>MYB30</i>	71
3.2.1.5. <i>BAS1</i> i <i>SOB7</i>	73
3.2.2. Implicació d'auxines en respostes SAS: paper de <i>MYB77</i>	74
3.2.2.1. <i>MYB77</i>	75
3.3. Capítol III: <i>ATHB4</i>	77
3.3.1. Sobreexpressió <i>d'ATHB4</i>	79
3.3.1.1. Caracterització fisiològica.....	79
3.3.1.2. Localització subcel·lular.....	80
3.3.1.3. Interacció proteïna – DNA.....	85
3.3.1.3.1. Producció, purificació i detecció de la proteïna de fusió.....	85
3.3.1.4. Interacció proteïna – proteïna.....	87
3.3.1.4.1. Estudi de doble híbrid de llevat.....	87
3.3.1.4.1.1. Homodimerització <i>d'ATHB4</i>	87
3.3.1.4.1.2. Heterodimerització <i>d'ATHB4</i> amb altres proteïnes de la ruta dels BRs.....	91
3.3.2. Pèrdua de funció <i>d'ATHB4</i>	93
3.3.2.1. Caracterització fisiològica <i>d'athb4hat3</i>	95
3.3.2.1.1. Tractament d'ombra simulada <i>d'athb4hat3</i>	96
3.3.2.1.2. Tractaments hormonal <i>d'athb4hat3</i>	99
3.3.2.1.3. Tractament de foscó.....	100
3.3.2.1.4. Caracterització amb microscòpia electrònica de rastreig (SEM).....	101
3.3.2.1.5. Caracterització amb Confocal.....	105
3.3.2.2. Caracterització molecular <i>d'athb4hat3</i>	108
3.3.2.3. Implicació del desenvolupament en respostes SAS.....	110
3.3.2.4. Estudi de la zona del promotor <i>d'ATHB4</i>	112
3.3.2.5. <i>ATHB4</i> i els fitocroms.....	113
3.3.2.6. <i>ATHB4</i> i la ruta dels BRs.....	115
3.4. Capítol IV: Estudi de la subfamília HD-Zip II	119
3.4.1. Sobreexpressió de <i>HAT1</i>	121
3.4.1.1. Caracterització fisiològica.....	121
3.4.1.2. Tractament d'ombra simulada.....	121
3.4.2. Sobreexpressió de <i>HAT2</i>	122
3.4.2.1. Caracterització fisiològica.....	122
3.4.2.2. Tractament d'ombra simulada.....	122
3.4.2.3. Tractaments hormonal.....	124
3.4.3. Pèrdua de funció de <i>HAT1</i> i <i>HAT2</i>	125
3.4.3.1. Caracterització fisiològica.....	125
3.4.3.2. Tractament d'ombra simulada.....	127
3.4.4. Sobreexpressió <i>d'ATHB2</i>	128
3.4.4.1. Caracterització fisiològica.....	128
3.4.4.2. Tractament d'ombra simulada.....	129
3.5. Capítol V: Senyalització espai-temporal entre els òrgans de la planta	131
3.5.1. Paper dels cotilèdons en l'allargament de l'hipocòtil en tractaments hormonal i d'ombra simulada.....	136
3.5.1.1. Cotilèdons en la resposta de l'hipocòtil a la SAS i la seva relació amb la senyalització per auxines.....	136

3.5.1.2. Cotilèdons en la resposta de l'hipocòtil a tractaments hormonals de BRs o GAs.....	139
3.5.1.3. Importància de la lesió versus la manca de cotilèdons en la resposta de l'hipocòtil a tractaments hormonals o d'ombra simulada.....	141
3.5.2. Paper del meristem apical en l'allargament de l'hipocòtil en tractaments d'ombra simulada.....	144
4. Discussió.....	147
4.1. <i>SAUR15</i> , element integrador de les respostes a la SAS i hormonals.....	149
4.2. Implicació en la SAS de mutants hormonals.....	151
4.3. HD-ZipII.....	153
4.3.1. HD-ZipII i les respostes a ombra simulada.....	154
4.3.2. HD-ZipII i les respostes a hormones.....	157
4.3.3. HD-ZipII i el desenvolupament.....	158
4.3.4. Aspectes moleculars de la família HP-ZipII.....	160
Activitat transcripcional.....	160
<i>ATHB4</i> : dianes directes.....	162
<i>ATHB4</i> : On i quan.....	160
4.3.5. Dimerització d' <i>ATHB4</i>	162
4.3.6. HD-ZipII.....	163
4.4. Capacitat de resposta de la plàntula: elements clau.....	164
5. Conclusions.....	167
6. Materials i mètodes.....	171
6.1. Material biològic.....	173
6.1.1. Soques bacterianes.....	173
6.1.1.1. Obtenció de cèl·lules competents per xoc tèrmic.....	173
6.1.1.2. Obtenció de cèl·lules electrocompetents.....	174
6.1.1.3. Medis de cultiu bacterians.....	174
6.1.1.4. Condicions de cultiu de bacteris.....	175
6.1.2. Material vegetal.....	175
6.1.2.1. Línies de guany de funció cedides.....	175
6.1.2.2. Línies mutants de pèrdua de funció.....	176
6.1.2.3. Condicions de cultiu a l'hivernacle i al fitotrò.....	177
6.1.2.4. Medis de cultiu de plantes.....	177
6.1.2.5. Suplements dels medis de cultiu de plantes.....	177
6.1.2.6. Condicions de cultiu <i>in vitro</i>	177
6.1.3. Plasmidis.....	177
6.1.3.1. Vectors.....	177
6.1.3.1.1. Vectors de clonatge de productes de PCR.....	177
6.1.3.1.2. Vectors binaris de clonatge per transformar en planta.....	178
6.1.3.1.3. Vectors del doble híbrid de llevat.....	178
6.1.3.1.4. Vectors per la producció de proteïna.....	178
6.1.3.1.5. Vectors per biolística.....	178
6.1.3.2. Construccions.....	178
6.1.4. Encebadors.....	180
6.1.5. Mapes de les línies SALK.....	181
6.2. Metodologies.....	183
6.2.1. Tècniques de biologia molecular dels àcids nucleics.....	183
6.2.1.1. Obtenció de DNA plasmídic.....	183
6.2.1.2. Subclonatge de fragments de DNA en vectors.....	184
6.2.1.2.1. Reaccions de modificació del DNA.....	184

6.2.1.2.2. Transformació de cèl·lules competents d'E.coli per xoc tèrmic.....	185
6.2.1.2.3. Transformació de cèl·lules competents d' <i>A.tumefaciens</i> per electroporació.....	185
6.2.1.3. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR).....	186
6.2.1.3.1. Retrotranscripció.....	186
6.2.1.3.2. Amplificació per PCR.....	187
6.2.1.3.3. PCR quantitativa.....	188
6.2.1.3.4. Clonatge de fragments de DNA amplificats per PCR.....	189
6.2.1.4. Separació de DNA en gels d'agarosa.....	189
6.2.1.5. Sequenciació del DNA.....	189
6.2.1.6. Purificació de fragments de DNA.....	190
6.2.1.7. Obtenció de RNA total d' <i>Arabidopsis</i>	190
6.2.1.8. Quantificació d'àcids nucleics.....	191
6.2.2. Tècniques de biologia molecular de proteïnes.....	191
6.2.2.1. Producció i purificació de proteïnes.....	191
6.2.2.1.1. Producció a petita escala.....	191
6.2.2.1.2. Producció i purificació a gran escala.....	191
6.2.2.2. Quantificació de proteïnes.....	194
6.2.2.3. Separació electroforètica de proteïnes.....	194
6.2.2.3.1. Preparació del gel de proteïnes.....	194
6.2.2.4. Anàlisi de proteïnes per transferència i immunodetecció.....	196
6.2.2.4.1. Transferència de proteïnes (Western-blot).....	196
6.2.2.4.2. Immunodetecció quimioluminiscent.....	196
6.2.2.5. Anticossos utilitzats.....	197
6.2.2.6. Doble híbrid de llevat (Y2H).....	197
6.2.3. Mètodes de plantes.....	200
6.2.3.1. Esterilització de llavors.....	200
6.2.3.2. Sembra de llavors.....	201
6.2.3.3. Obtenció de plantes transgèniques.....	202
6.2.3.3.1. Transformació de plantes d' <i>Arabidopsis</i>	202
6.2.3.3.2. Obtenció de dobles (o múltiples) mutants per creuament.....	203
6.2.3.4. Anàlisi molecular de les plantes mutants.....	204
6.2.3.4.1. Obtenció ràpida de DNA genòmic de planta.....	204
6.2.3.4.2. Comprovació del genotip per PCR.....	205
6.2.3.5. Tractaments i assajos en planta.....	205
6.2.3.5.1. Tractaments d'ombra simulada.....	205
6.2.3.5.2. Tractaments de foscó.....	206
6.2.3.5.3. Mesura dels fenotips fisiològics.....	206
6.2.3.6. Tractaments amb reguladors del creixement, cicloheximida i dexametasona.....	207
6.2.3.7. Tinció histoquímica GUS.....	207
6.2.3.8. Localització subcel·lular.....	208
6.2.3.9. Estudis morfològics mitjançant microscòpia electrònica de rastreig (MES, de l'anglès microscope electronic scanning).....	210
6.2.3.10. Tinció mPS-PI.....	211
6.3. Anàlisi estadístic.....	211
6.4. Bioinformàtica.....	216
7. Annexos.....	217
7.1. Sorin et al., PJ 2009.....	219
7.2. Brandt et al., PJ 2012.....	231
8. Bibliografia.....	267

Índex de figures

Introducció:

Figura I1.	Espectre de llum i fotoreceptors.	5
Figura I2.	Fotoconvertibilitat i espectres d'absorció dels fitocroms.	9
Figura I3.	Arbre filogenètic dels cinc gens <i>PHY</i> d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	10
Figura I4.	Esquema simplificat de la transducció de senyals del fitocrom quan s'inicia la SAS.	13
Figura I5.	Vies de senyalització del phyA i del phyB.	16
Figura I6.	Alteracions causades per les respostes de fugida de l'ombra al llarg del cicle vital de la planta en <i>Arabidopsis</i> .	19
Figura I7.	Família de factors de transcripció HD-Zip.	25
Figura I8.	Ruta de senyalització d'Aux i BRs.	30
Figura I9.	Estudi del fenotip de la sobreexpressió d' <i>ATHB4</i>	37
Figura I10.	Respostes de la línia de sobreexpressió d' <i>ATHB4</i> a ombra simulada i hormones.	38

Resultats:

Figura R1.1.	Seqüència del promotor i del ORF de <i>SAUR15</i> (At4g38850).	50
Figura R1.2.	Construccions generades derivades del promotor de <i>SAUR15</i> fusionat al gen marcador <i>GFP-GUS</i> .	51
Figura R1.3.	Efecte de la mutació de les 3 E-box proximals a l'origen de la transcripció en al resposta del promotor <i>SAUR15</i> als tractament d'ombra simulada o hormones.	52
Figura R1.4.	Efecte de la presència/ absència de les 2 E-box IV i V en el promotor de <i>SAUR15</i> en tractament de W+FR.	56
Figura R1.5.	Efecte de la presència / absència de les 5 E-box en el promotor de <i>SAUR15</i> en tractaments hormonals de BRs i Aux.	57
Figura R1.6.	Efecte de la presència / absència de les 3 AREs en el promotor de <i>SAUR15</i> en tractaments hormonals de Aux.	59
Figura R2.1.	Esquema del tractament d'ombra simulada i fenotip de les línies sobreexpressores de <i>BRI1</i> en resposta a aquest estímul.	65
Figura R2.2.	Fenotip de les línies <i>bes1-Dbc7</i> i <i>bzr1-D</i> en resposta a ombra simulada.	67
Figura R2.3.	Fenotip de les línies <i>bes1-Dbc7</i> i <i>bzr1-D</i> en resposta a BRs, Aux i GAs.	69
Figura R2.4.	<i>MYB30</i> , <i>BAS1</i> i <i>SOB7</i> : representació del gens i resposta fisiològica a ombra simulada.	72
Figura R2.5.	<i>MYB77</i> : Representació del gen i resposta fisiològica a ombra simulada.	75
Figura R3.1.	Fenotip i caracterització fisiològica sota diferents tractaments hormonals i lumínics de les plantes sobreexpressores d' <i>ATHB4-GR</i> .	80
Figura R3.2.	Seqüència de cDNA d' <i>ATHB4</i> (957bp) amb els diferents dominis i regions identificats.	81
Figura R3.3.	Construccions realitzades per crear deleccions d' <i>ATHB4</i> en l'estudi d'estructura funció.	82
Figura R3.4.	Localització subcel·lular de les diferents deleccions d' <i>ATHB4</i> en l'estudi d'estructura funció.	84
Figura R3.5.	Producció, purificació i detecció de la proteïna de fusió GST- <i>ATHB4</i> .	86
Figura R3.6.	Dimerització dels dominis HD-LZ/HD-LZ-Ct d' <i>ATHB4</i> per	

	doble híbrid de llevat.	89
Figura R3.7.	Dimerització dels dominis HD-LZ d'ATHB4 per doble híbrid de llevat amb ATHB4.	90
Figura R3.8.	<i>SAUR15</i> diana directa d'ATHB4	92
Figura R3.9.	Dimerització dels dominis HD-LZ d'ATHB4 per doble híbrid de llevat amb BIM1 i BES1.	93
Figura R3.10.	<i>ATHB4</i> i <i>HAT3</i> : representació del gens i resposta fisiològica a ombra simulada.	94
Figura R3.11.	Fenotip del doble mutant de pèrdua de funció <i>athb4hat3</i> en diferents estadis de desenvolupament.	95
Figura R3.12.	Fenotip de la línia <i>athb4hat3</i> en resposta a ombra simulada.	97
Figura R3.13.	Fenotip de la línia <i>athb4hat3</i> en resposta a un <i>time-course</i> d'ombra simulada	98
Figura R3.14.	Fenotip de la línia <i>athb4hat3</i> en resposta a BRs, GAs i Aux.	100
Figura R3.15.	Fenotip de la línia <i>athb4hat3</i> en resposta a un tractament de fosc.	101
Figura R3.16.	Fenotip de la línia <i>athb4hat3</i> en imatges de microscòpia electrònica de rastreig en dia 0 i 3.	103
Figura R3.17.	Fenotip de la línia <i>athb4hat3</i> en imatges de microscòpia electrònica de rastreig en dia 5, 7 i 10.	104
Figura R3.18.	Fenotip de la línia <i>athb4hat3</i> en imatges de microscòpia confocal en dia 1.	106
Figura R3.19.	Fenotip de la línia <i>athb4hat3</i> en imatges de microscòpia confocal en dia 5 i 7.	107
Figura R3.20.	Efecte de la mutació <i>athb4hat3</i> i tractaments hormonals o lumínics sobre gens l'expressió dels quals està regulada per aquests estímuls.	109
Figura R3.21.	Fenotip de les línies <i>Col-0</i> , <i>Col-er2</i> , <i>phb-13</i> , <i>rev-6</i> i <i>phb-13 phv-11</i> en resposta a ombra simulada.	111
Figura R3.22.	Expressió espai-temporal d'ATHB4.	112
Figura R3.23.	Fenotip de les línies <i>athb4hat3phyB</i> i <i>athb4hat3phyA</i> en resposta a ombra simulada.	114
Figura R3.24.	Fenotip de les línies <i>athb4hat3bes1Dbc7</i> , <i>athb4b zr1-D</i> i <i>hat3b zr1-D</i> en resposta a ombra simulada.	116
Figura R4.1.	Fenotip de les línies P_{35S} :HAT1, P_{35S} :HAT2 i P_{35S} :HAT2-GR en resposta al tractament d'ombra simulada.	122
Figura R4.2.	Fenotip de la línia P_{35S} :HAT2-GR en resposta al tractament de BRs i Aux.	125
Figura R4.3.	Fenotip de les línies de pèrdua de funció de HAT1 i/o HAT2 en resposta al tractament d'ombra simulada.	126
Figura R4.4.	Fenotip de la línia P_{35S} :ATHB2 en resposta al tractament d'ombra simulada.	128
Figura R5.1.	Efecte de la presència dels cotilèdons en l'allargament de l'hipocòtil en resposta al tractament d'ombra simulada.	134
Figura R5.2.	Efecte de la presència dels cotilèdons en la curvatura de l'hipocòtil en resposta al tractament d'ombra simulada.	137
Figura R5.3.	Efecte de la presència dels cotilèdons en la distribució espai-temporal d'activitat GUS en W.	138
Figura R5.4.	Efecte de la presència dels cotilèdons en la distribució espai-temporal d'activitat GUS en W+FR.	139
Figura R5.5.	Efecte de la presència dels cotilèdons en l'allargament de l'hipocòtil en resposta a l'aplicació exògena d'EBL i GA ₃	140
Figura R5.6.	Efecte de la presència o lesió dels cotilèdons en l'allargament de l'hipocòtil en resposta a l'aplicació exògena de PIC i efecte en la distribució espacial de l'activitat GUS.	142

Figura R5.7.	Efecte de la presència o lesió dels cotilèdons en l'allargament de l'hipocòtil en resposta al tractament d'ombra simulada i a l'aplicació exògena d'EBL i GA ₃ .	143
Figura R5.8.	Efecte de la presència de meristem apical en l'allargament de l'hipocòtil en resposta al tractament d'ombra simulada.	145
<u>Discussió:</u>		
Figura D1.	Esquema de les respostes de la SAS i a hormones en membres pertanyents a la subfamília HD-ZipII.	155
Figura D2.	Esquema del model de resposta de la SAS en un cotilèdon per HD-ZipII i HD-ZipIII.	159
Figura D3.	Esquema del model d'acció dels mòduls reguladors de les respostes de la SAS.	163
Figura D4.	Model representatiu de la connexió entre els diferents òrgans de la plàntula en resposta a ombra simulada.	165
<u>Materials i mètodes:</u>		
Figura M.1.	Com realitzar mapes de les línies d'inserció de T-DNA.	182
Figura M.2.	Com utilitzar el programa LightCycler®480 .	188
Figura M.3.	Esquema de la transformació de plantes <i>d'Arabidopsis</i> i selecció de les diferents generacions de transformants.	203
Figura M.4.	Esquema dels diferents tractaments de llum als que s'han sotmès plàntules <i>d'Arabidopsis</i> .	206
Figura M.5.	Esquema del material a utilitzar en experiments de biolística.	209
Figura M.6.	Captures de pantalla del programa informàtic StatGraphics per a l'anàlisi estadístic de dades.	212

Índex de taules

Introducció

Taula I1.	Especificitat fotosensorial i funcions biològiques dels diferents membres de la família dels phys en <i>Arabidopsis</i> .	12
------------------	---	----

Resultats:

Taula R1.1	Resum de les respostes segons el grau de tinció en l'assaig histoquímic GUS de les diferents línies transgèniques independent obtingudes de les dues construccions P _{S15-0,7} :G i P _{S15-0,7Em} :G	53
-------------------	--	----

Discussió:

Taula D1.	Resum de les respostes a ombra simulada i a hormones d'alguns mutants hormonals estudiats en aquesta tesi	152
------------------	---	-----

Materials i mètodes:

Taula M.1	Antibiòtics utilitzats en el treball amb els bacteris <i>E.coli</i> , <i>A.tumefaciens</i> i amb plantes d' <i>A. thaliana</i> .	175
------------------	--	-----

Taula M.2.	Línies de guany de funció en <i>A. thaliana</i> cedides utilitzades en aquesta tesi.	176
Taula M.3.	Línies de pèrdua de funció en <i>A. thaliana</i> cedides utilitzades en aquesta tesi.	176
Taula M.4.	Plasmids utilitzats en aquesta tesi.	178
Taula M.5.	Encebadors utilitzats en aquesta tesi.	180
Taula M.6.	Codi de colors per a la realització de mapes gènics.	183
Taula M.7.	Inhibidors de proteases i fosfatases utilitzats en la producció i purificació de proteïnes.	192
Taula M.8.	Composició del gel separador SDS-PAGE en una electroforesi de proteïnes.	194
Taula M.9.	Composició del gel concentrador SDS-PAGE en una electroforesi de proteïnes.	195
Taula M.10.	Reguladors de creixement i altres agents utilitzats en aquest treball.	207
Taula M.11.	Anàlisi de varianza de dues vies del capítol 2	212
Taules M.12.	Anàlisi de varianza de dues vies del capítol 3	213
Taules M.13.	Anàlisi de varianza de dues vies del capítol 4	215

Llista d'abreviacions i símbols:

%	tant per cent	GFP	Proteïna verda fluorescent
♀	femení	GG	GUS-GFP
♂	masculí	GR	receptor de glucocorticoides
2,4-D	àcid 2,4-diclorfenoxiacètic	GUS	s-glucuronidasa
A	adenina	h	hores
AD	Domini d'activació	H, HD	Homeodomini
Amp	ampicil·lina	HD-Zip	Homeodomain Zip
AmpR	resistència a ampicil·lina	Hip	hipocotil
APB	motiu d'unió a phyB	HIRs	respostes d'alta irradiància
Aux	auxines	HKRD	domini histidin quinasa
bHLH	basic helix-loop-helix	HLH	helix-volta-helix
BD	Domini d'unió al DNA	Hyg	higromicina
BRs	brassinosteroides	HygR	Resistència a la higromicina
BRZ	brassinazol	IPTG	Isopropil s-D-tiogalactosid
C	citosina	kb	kilobase
CaMV	Virus del mosaic de la coliflor	kDa	kilodalton
Cb	Carbenicil·lina	Km	kanamicina
cDNA	DNA complementari	KmR	resistència a kanamicina
CHX	cicloheximida	kV	kilovolt
cm	centímetres	L, LZ	Cremallera de Leucines
Cot	cotiledons	LD	dia llarg
cry	criptocrom	LFRs	respostes de baixa fluència
Ct	carboxi terminal	M	molar
d	dies	Mb	megabases
D.O.	Densitat òptica	mg	miligram
DEX	dexametasona	min.	minuts
DNA	àcid desoxirribonucleic	mL	mililitre
dNTP	desoxirribonucleotid	mRNA	RNA missatge
EBL	epibrassinolide	mV	milivolts
EMS	Etil meta sulfonat	NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
EOD-FR	llum roja llunyana al final del dia	ng	nanograms
EOD-R	llum roja al final del dia	nm	nanometres
F	fosc	NPA	Àcid naftilalamic
FP	fulles primaries	Nt	amino terminal
FR	llum roja llunyana	O/N	tota la nit
FRc	llum roja llunyana continua	P	promotor
FT	factor de transcripció	PAR	phytochrome rapidly regulated gene
g	força centrífuga relativa (<i>RCF</i>)	PAS	motiu Per-Arnt-Sim
G	GFP	Pb	parells de bases
g	grams	PCR	reacció en cadena de la Polimerasa
G	Guanina (en les seqüències)	Pfr	forma activa dels fitocroms
GA, GA3	àcid gibberel·lic	phot	fototropines
GAs	gibberel·lines	Phy	fitocrom actiu

Abreviacions i símbols

PHY	proteïna fitocrom	seg.	segons
PIFs	factors interactors dels fitocroms	SEM	Microscopia Electronica de Rastreig
PMSF	fenilmetan-sulfonil floride	Ta	temperatura
PϕB	fitocromobilina	TA/RT	temperatura ambient
Pr	forma inactiva dels fitocroms	T-DNA	DNA transferit
PRD	domini amb motius PAS repetits	UV-A	llum ultravioleta A
R	llum roja	UV-B	llum ultravioleta B
R:FR	raó entre llum vermella i vermella llunyana	V	volts
Rc	llum roja continua	v/v	relació volum/volum
RFP	Proteïna vermella fluorescent	VLFRs	respostes de molt baixa fluència
RNA	acid ribonucleic	vs	<i>versus</i>
RNAi	acid ribonucleic d'interferència	W	llum blanca
Rpm	revolucions per minut	W+FR	ombra simulada
RT-PCR	Retrotranscripció per PCR	Wc	llum blanca continua
SAS	síndrome de la fugida de l'ombra	λ	longitud d'ona
SAUR	Small Auxin Up-RNA		
SD	dia curt		

En les seqüències aminoacídiques:

F Phe, fenilalanina	L Leu, leucina	I Ile, isoleucina	M Met, metionina
S Ser, serina	P Pro, prolina	T Thr, treonina	A Ala, alanina
Y Tyr, tirosina	H His, histidina	Q Gln, glutamina	N Asn, asparragina
K Lys, lisina	D Asp, aspartic	E Glu, glutamic	C Cys, cisteïna
W Trp, triptofan	R Arg, arginina	G Gly, glicina	V Val, valina

I

INTRODUCCIÓ

1.1. La llum: un factor abiòtic important per les plantes

Les plantes passen per diferents estadis tals com la germinació, l'establiment de la plàntula, la floració i la producció de llavors, seguit per la senescència al llarg del seu cicle vital, els quals estan determinats per la combinació de factors endògens (genotip) i exògens (condicions ambientals). Donat que són organismes sèssils, les plantes no poden canviar l'ambient on creixen, de manera que necessiten percebre contínuament les característiques de les condicions ambientals que les envolten i, conseqüentment, respondre modificant el seu creixement i desenvolupament per adaptar-se òptimament al medi canviant. Això resulta en una gran plasticitat en el desenvolupament, que implica la integració de molts senyals ambientals, permetent a les plantes sincronitzar el seu creixement i moment de la reproducció amb els canvis diaris i transitoris, estacionals o permanents, per tal de competir efectivament amb els veïns pels recursos essencials. És comparable, doncs, el paper que juga la plasticitat del desenvolupament en la supervivència de les plantes al comportament animal (Galstyan and Martinez-Garcia, 2010; Halliday and Fankhauser, 2003b).

A part de ser la font d'energia per a la reacció de fotosíntesi, la llum és un dels senyals ambientals més importants que regulen el desenvolupament de la planta, malgrat que no es l'única (temperatura, gravetat, vent, humitat, aigua i disponibilitat de nutrients són alguns dels altres factors que el determinen). Les plantes capten la quantitat (fluència), qualitat (longitud d'ona, λ), periodicitat (durada relativa dia:nit) i direcció de la llum i utilitzen aquesta informació per modular múltiples respostes fisiològiques, com la germinació de la llavor, la desetiolació i l'establiment de la plàntula, l'arquitectura de la planta adulta i l'inici de la reproducció, entre d'altres, per tal de maximitzar la taxa fotosintètica (per exemple el fototropisme o la fugida de l'ombra) (Lorrain et al., 2008). Al conjunt de respostes que afecten el desenvolupament de la planta en funció de la llum se l'anomena fotomorfogènesi (Franklin and Whitelam, 2004).

1.2. Fotomorfogènesi vegetal

En *Arabidopsis*, la dormició de les llavors es veu interrompuda per senyals abiòtics tals com la temperatura, la llum (color i intensitat) i els nutrients disponibles (Jiao et al., 2007). Després de la germinació, una planta pot mostrar dues estratègies diferents de creixement depenents de la disponibilitat de llum: a la foscor la plàntula es desenvolupa etiolada (o escotomorfogènica). Plàntules etiolades d'*Arabidopsis thaliana* (a partir d'ara *Arabidopsis*) mostren un hipocòtil allargat, etioplasts i cotilèdons sense expandir protegits per un ganxo apical. Per contra, les plàntules crescudes en llum es desenvolupen com a desetiolades (o fotomorfogèniques) i es caracteritzen per

una inhibició de l'allargament de l'hipocòtil, l'expansió dels cotilèdons i la producció dels pigments fotosintètics que s'acumulen en els cloroplasts (Josse et al., 2008).

Aquesta senyal lumínica percebuda indueix un canvi ràpid entre els dos programes de desenvolupament: de l'escotomorfogènesi a la fotomorfogènesi. Cal destacar que el mateix estímul lumínic pot causar efectes oposats en diferents òrgans (per exemple l'hipocòtil o la tija, i els cotilèdons o les fulles), demostrant que una planta ajusta el creixement dels òrgans i dels teixits de manera específica per tal d'adequar la resposta a al llum.

1.3. Percepció de la llum: els fotoreceptors vegetals

La radiació de la llum solar es compon de diferents longituds d'ona, que es corresponen als diferents colors de l'espectre lumínic (*figura 11 (a)*). Per captar els diferents espectres, les plantes posseeixen diferents fotoreceptors: en les plantes superiors se n'han descrit cinc famílies: els criptocroms (cry), les fototropines, que absorbeixen llum UV-A (~320-400nm) i blava (B, de l'anglès *blue*; ~400-500 nm), els *zeitlups*, que també absorbeixen llum blava, els fitocroms (phys) que absorbeixen la llum vermella (R, de l'anglès *red*) i vermella llunyana (FR, de l'anglès *far-red*) i els receptors de UV-B (*UVR8*, de l'anglès *UV resistance locus 8*) (Rizzini et al., 2011). L'acció conjunta d'aquests fotoreceptors controla la morfogènesi vegetal a través de xarxes transcripcionals reguladores complexes a partir de la percepció de la quantitat i color de la llum.

1.3.1. Criptocroms

Els **crys** van ser descoberts en *Arabidopsis* però després es van trobar en altres organismes. Estan codificats per almenys tres gens, *CRY1*, *CRY2* i *CRY3*. *CRY1* i *CRY2* intervenen majoritàriament en la inhibició de l'elongació de l'hipocòtil i el control fotoperiòdic de la iniciació floral, respectivament, després de la percepció del B. A més a més, regulen una dotzena d'altres respostes regulades per llum tals com els ritmes circadians, el creixement, l'obertura dels estomes, el desenvolupament de les arrels, resposta a patògens, dominància apical, dormància de les llavors i desenvolupament del fruit i dels òvuls entre d'altres. Els crys tenen dos dominis, l'N-terminal PHR (de l'anglès *Photolyase-Homologous Region*) que s'uneix al cromòfor FAD (de l'anglès *Flavin Adenine Dinucleotide*), i el CCE (de l'anglès *CRY C-terminal Extension*) que és crític per la funció i regulació dels crys (*figura 11 (b)*). S'hipotetitza que els fotons exciten els electrons de la molècula de flavina, resultant en una reacció redox i un canvi conformacional dels fotoreceptors. El cry fotoexcitat és fosforilat per adoptar una

conformació oberta, que interactua amb altres proteïnes de senyalització per alterar l'expressió gènica a nivell transcripcional i post-traduccional i conseqüentment en els programes metabòlics i de desenvolupament de les plantes (Yu et al., 2010). A l'igual que els phys, els diferents crys tenen diferent estabilitat en llum: cry1 és fotoestable (com phyB-phyE) mentre que cry2 és fotolàbil (com phyA), fet interessant per la coordinació de crys i phys en la regulació de les respostes a llum (Chaves et al., 2011; Galstyan et al., 2011).

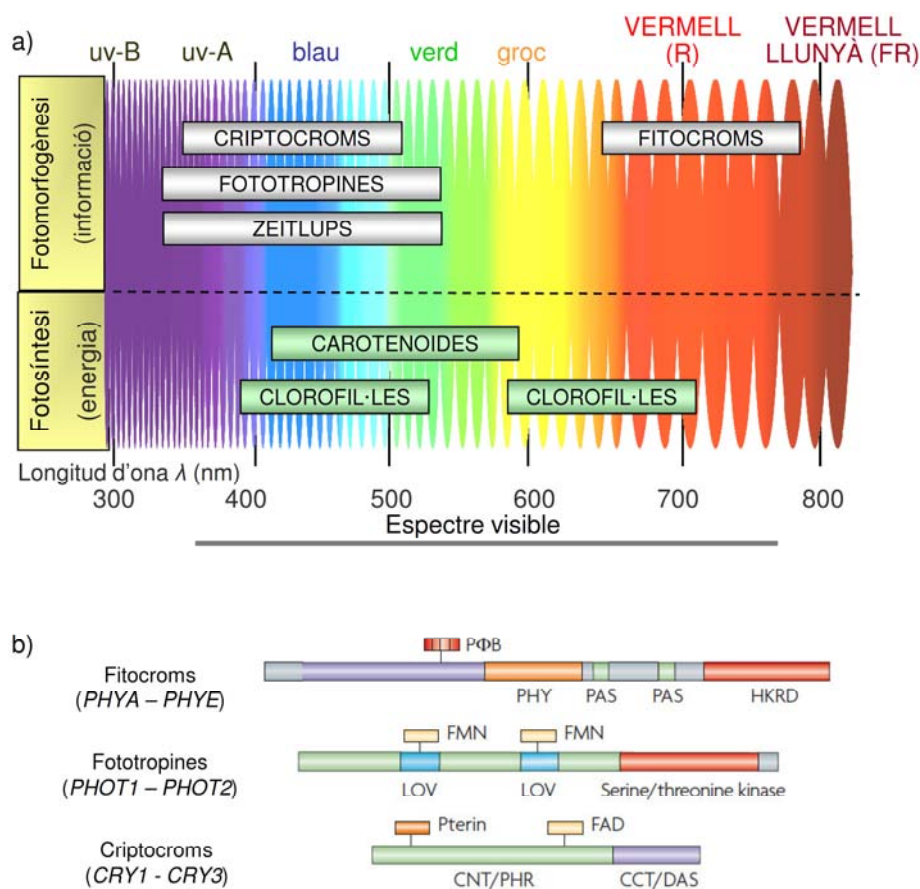


Figura 11 Espectre de llum i fotoreceptors. (a) Rang d'absorció dels fotoreceptors fotomorfogènics i fotosintètics dels diferents colors (adaptat de Galstyan i Martínez-Garcia, 2010). (b) Representació esquemàtica dels principals fotoreceptors en *Arabidopsis* (adaptat de Jiao et al., Nat Rev Gen 2007).

1.3.2. Fototropines i altres proteïnes amb dominis LOV

Les **fototropines**, fotoreceptors específics de la llum B, regulen diverses respostes, entre aquestes el fototropisme, la inhibició del creixement de l'hipocòtil, l'obertura estomàtica i els moviments dels cloroplasts (Boccalandro et al., 2008; Kang et al., 2008). En *Arabidopsis* estan codificats per dos gens, PHOT1 i PHOT2, que treballen alhora per

controlar les respostes anteriorment esmentades, essent phot1 i phot2 proteïnes associades a la membrana plasmàtica. Phot1 està especialitzat en baixes intensitats de B i phot2 és més important en altes intensitats (Briggs and Christie, 2002; Galstyan and Martinez-Garcia, 2010; Tokutomi et al., 2008). Les fototropines tenen dos dominis diferents: un domini C-terminal Ser/Thr quinasa i una regió N-terminal que codifica per dos subdominis sensors de llum LOV (de l'anglès *light*, *oxygen*, *voltage*, els quals responen a canvis de l'estat redox induïts per la llum B), Aquests dominis LOV s'uneixen de forma no covalent al cromòfor flavin mononucleòtid (FMN) (*figura 11 (b)*) i poden autofosforilar-se de manera depenent de llum B. Després de l'activació per llum, una fracció de phot1 se'n va al citoplasma.

A part de les fototropines, hi ha altres proteïnes en *Arabidopsis* que presenten dominis LOV. També tenen un domini LOV N-terminal seguit per una F-box i vàries repeticions Kelch (motiu que conté 50 aminoàcids que formen una estructura de làmina beta). Han estat descrites com a ZTL (ZEITLUPE), LKP2 (de l'anglès LOV, KELCH REPEAT PROTEIN 2), i FKF1 (de l'anglès FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1). Anàlisi genètics els impliquen en el manteniment de la funció del rellotge circadià i en la floració depenent de fotoperíode. Malgrat que no hi ha cap evidència funcional, estructuralment es poden classificar com a una nova classe de fotoreceptors.

1.3.3. Fitocroms

Els phys són una superfamília de receptors de llum R i FR. Es descobriren en angiospermes quan s'investigaven fotorespostes d'interès agrícola, tals com la germinació i la floració (Borthwick et al., 1952). Posteriorment s'han trobat en altres grups (gimnospermes, falgueres, molses, algues i bacteris, entre d'altres), i actualment, en base a estudis bioquímics, genètics i filogenètics, es classifiquen en: phys de plantes, bacteriofitocroms, phys de cianobacteris, phys de fongs i un conjunt de molècules afins a phys (Karniol et al., 2005).

Tots els phys són biliproteïnes, malgrat que es diferencien per característiques de la proteïna, pel tipus de bilina i per les funcions que realitzen. El tret distintiu dels phys és la capacitat de trobar-se en dues isoformes (Pr i Pfr) interconvertibles per irradiacions amb diferent raó R i FR (*figura 12*). Ambdues formes també poden absorbir la llum UV, visible i infrarroja pròxima, amb espectres d'absorció parcialment solapats; a conseqüència d'aquest solapament s'estableix un equilibri dinàmic entre les dues formes denominat **fotoequilibri**. És per això que en una planta coexisteixen Pr i Pfr reflexant les proporcions relatives de R i FR del seu ambient lumínic. La forma

fisiològicament activa és la Pfr, tot i que hi ha indicis que la forma Pr té certa activitat biològica (Reed, 1999; Shinomura et al., 2000), de manera que els phys converteixen la informació lumínica en canvis en la concentració o en els gradients de la forma activa Pfr. Després de la fotoactivació de la forma inactiva al citoplasma, els phys es transloquen al nucli, possiblement canviant directament l'expressió gènica, la qual cosa desemboca en una regulació de varis processos fisiològics i de desenvolupament a les plantes (Galstyan and Martinez-Garcia, 2010). Anàlisis d'expressió gènica global mostren que les respostes del phys estan associades amb alteracions massives en l'expressió gènica (Devlin et al., 2003; Ma et al., 2001), alhora que es creu que regulen els processos aigües avall interactuant amb altres proteïnes.

Estudis de tipus fisiològic, bioquímic i immunològic realitzats principalment en plàntules etiolades van demostrar l'existència de dos tipus de phys: el **tipus I**, fotolàbil, que predomina en plàntules etiolades i el **tipus II**, fotoestable, que predomina en plantes crescudes en llum. Posteriorment, estudis genètics i de biologia molecular demostraren que la part proteica dels phys estava codificada per una família de **gens divergents**. En *Arabidopsis* la família consta de 5 gens anomenats *PHYA*, *B*, *C*, *D* i *E*, que codifiquen respectivament la part proteica dels phyA al phyE. El phyA, molt abundant en plàntules etiolades, és de tipus I (fotolàbil) i, en canvi, els altres es consideren de tipus II malgrat que els phyB i phyC no són completament fotoestables (Sharrock and Mathews, 2006).

Els phys són molt més abundants en teixits etiolats que en verds. En les plantes es troben pràcticament en tots els òrgans, tant vegetatius com reproductors (fulles, bulbs, arrels, pecíols, cotiledons, fruits en desenvolupament, inflorescències, hipocòtils i coleòptils), si bé la seva abundància varia considerablement (Pratt, 1994).

A nivell cel·lular cal destacar que estudis realitzats en d'*Arabidopsis*, *Pisum sativum* i *Nicotiana tabacum* han demostrat que la fotoactivació dels phys altera la seva distribució intracel·lular. La llum provoca el desplaçament d'una fracció dels phyA-E del citosol al nucli. La radiació efectiva per induir aquest desplaçament, la seva cinètica i la forma d'acumulació nuclear varien entre els diferents phys. Aquest desplaçament es considera una etapa crucial per a l'acció biològica dels phys (Schafer and Nagy, 2006).

1.3.3.1. Estructura molecular

Els phys nadius són cromoproteïnes dimèriques solubles d'una massa molecular d'aproximadament 250 kDa. Cada subunitat està composta per dos components: una

cadena polipeptídica anomenada **apoptroteïna**, i un **cromòfor** (pigment). Tots els phys tenen el mateix cromòfor però es diferencien per l'apoptroteïna. El conjunt format per l'apoptroteïna i el seu cromòfor formen l'**holoproteïna** (Rockwell et al., 2006) (*figura 11 (b)*).

a) El **cromòfor** és un tetrapirrol linear anomenat **fitocromobilina**. Només hi ha un cromòfor per monòmer d'apoptroteïna, i està unit a la proteïna a través d'un enllaç tioèter a un residu de cisteïna (*figura 12*). Les configuracions dels cromòfors de Pr i Pfr difereixen a nivell del doble enllaç C15/C16. El cromòfor de Pr és l'isòmer 15 cis i el de Pfr és el 15 trans.

b) L'**apoptroteïna**, que té uns 1.200 aminoàcids, té una massa molecular que oscil·la entre 115 - 130 kDa. Està formada per dos dominis amb diferents subdominis separats per una regió frontissa sensible a proteases. El **domini N-terminal** és d'aproximadament 70 kDa, té forma globular i s'hi uneix el cromòfor. El **domini C-terminal** és d'aproximadament 55 kDa, més allargat. L'estructura primària del domini N-terminal, especialment els aminoàcids que envolten a la Cys d'unió al cromòfor, estan bastant conservats entre els diferents phys. En canvi, l'estructura primària de la regió frontissa i del domini C-terminal varien considerablement entre els diferents phys d'una mateixa espècie, i entre el mateix phy de diferents espècies (Alba et al., 2000).

El domini **N-terminal** presenta activitat fotosensora, bilinliasa (que catalitza el trencament dels enllaços químics en compostos orgànics) i és bàsic per a la fotoreversibilitat dels phys. Aquest domini consta de dues regions:

1. Una extensió terminal (**NTE**) de 6-10 kDa, implicada en l'activitat biològica del phyA, que és necessària per a la unió del cromòfor i per a la degradació del Pfr (Casal et al., 2002).
2. Una regió anomenada **bilinliasa** (BLD, ~60 Kda), que consta de tres subdominis:
 - a. **PAS**, important per a que es dugui a terme la unió del cromòfor.
 - b. **GAF** (Fischer et al., 2005) d'unió al cromòfor, i amb activitat bilinliasa. Aquesta regió conté un motiu PEST (seqüència rica en prolina (P), glutamat (E), serina (S) i treonina (T)), que és una zona hidrofílica possiblement involucrada en la fotodegradació i pròpia de proteïnes amb una vida mitja curta (Rogers et al., 1986).
 - c. **PHY** (~20 Kda) proper a la zona frontissa, important per la fotoconversió de Pr i Pfr.

El domini **C-terminal** és important en la senyalització, dimerització i en el desplaçament des del citosol al nucli. Consta de dos subdominis:

1. Un subdomini pròxim a la regió frontissa, que consta de **dos dominis PAS** (Periodic clock/Arndt/Sim), i una caixa Quail (Song, 1999). En general, els dominis PAS estan implicats en la interacció amb proteïnes que són components de les vies de senyalització, en la comunicació entre diferents dominis de proteïnes sensors i en la dimerització (Taylor and Zhulin, 1999; Yeh and Lagarias, 1998).
2. Un subdomini, **HKRD**, relacionat amb quinases de proteïna (His). Aquest és homòleg de quinases de proteïna (His) (HDK) de bacteris (sistema regulador de dos components).

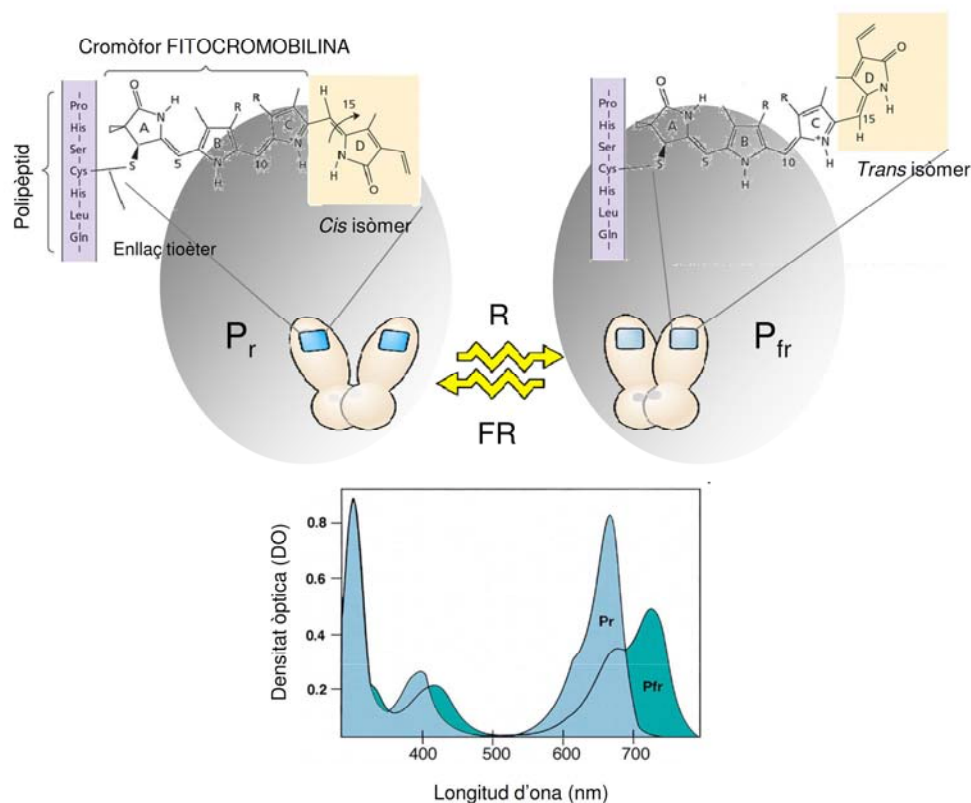


Figura I2. Fotoconvertibilitat i espectres d'absorció dels fitocroms. (a) Estructura de la fitocromobilina, un tetrapirrol lineal, en les dues isoformes Pr i Pfr. El cromòfor experimenta una isomerització cis trans a nivell del doble enllaç C15-16 en resposta a variacions en la raó R i FR. En ambdues està unit amb un enllaç tioèter a un residu de cisteïna de l'apoproteïna (Taiz i Zeiger, 1998). (b) Espectres d'absorció dels phys en les dues isoformes: la Pr presenta un màxim d'absorció a 660nm mentre que el de la Pfr és a 730 nm (adaptat de Li et al, 2011).

El subdomini HKRD dels phys eucariotes és paràleg de quinases de proteïna (His) (HDK) amb especificitat serina/treonina (Ser/Thr) que s'autofosforilen i són fosforilades per altres PKs en residus de Ser i no d'His, a més a més de fosforilar altres substrats

(Kim et al., 2004; Yeh and Lagarias, 1998). Es desconeix el significat funcional de la fosforilació, però podria actuar regulant l'activitat dels phys i/o la seva associació amb altres molècules reguladores (Jordan et al., 1997).

1.3.3.2. Filogènia

L'aïllament i l'anàlisi dels *PHYS* d'un ampli espectre de procariotes i eucariotes ha permès un progrés per entendre l'origen i evolució de la família dels gens dels phys. L'evolució dels *PHYS* de les plantes es caracteritza per una sèrie de duplicacions gèniques que han desembocat en diferents llinatges o subfamílies funcionalment diferents que evolucionaren independentment (Mathews and Sharrock, 1997). La filogènia del gen suggereix que un sol gen *PHY* existent en els cloròfits (algues verdes) persistí fins abans de l'origen dels espermatòfits, on patí una duplicació generant dues línies que van persistir en tots els espermatòfits (*PHY A/C* i *PHY B/D/E*). En les primeres etapes dels espermatòfits, la família de gens es va diversificar donant lloc a una diversitat de gens *PHY* semblant en angiospermes (es duplicaren de nou donant lloc a les 4 línies *PHY A/C*, *PHY C(F)*, *PHY B/D* i *PHY E*) (Mathews and Sharrock, 1997) i gimnospermes (*PHYN*, *PHYO* i *PHYP*) (Monte et al., 2003; Schmidt and Schneider-Poetsch, 2002), (figura 13).

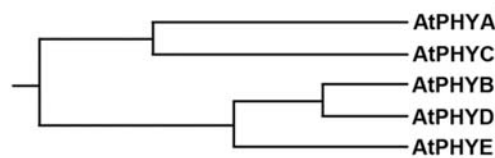


Figura 13 Arbre filogenètic dels cinc gens *PHY* d'*Arabidopsis thaliana*. PHYB i PHYD comparteixen un 80% d'identitat en la seqüència aminoacídica, i constitueixen una branca de la família. PHYE per sí sol, PHYA i PHYC formen les altres dues branques de l'arbre evolutiu (adaptat de Clack et al., 1994; Sharrock and Mathews, 2006).

1.3.3.3. Tipus de respostes

Les fotorespostes depenents de phys al llarg del cicle vital d'una planta es poden classificar en tres tipus (Mancinelli, 1994):

1) Respostes de flux fotònic molt baix (“**very low fluence responses**”, **VLFR**): S'indueixen amb fluxos fotònics molt baixos ($10^{-3} - 1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Es tracta de respostes extremadament sensibles a Pfr, que es desencadenen amb polsos curts de

R, FR, o sota la llum verda de seguretat dels laboratoris d'investigació. No presenten reversibilitat R/FR.

2) Respostes de baix flux fotònic (“**low fluence response**”, **LFR**): Són les clàssiques respostes desencadenades per llum R i revertides per llum FR, que van permetre el descobriment dels phys. Es saturen amb temps curts i baixes energies ($1 \cdot 10^3 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), i obeeixen la llei de la reciprocitat. S'indueixen amb una breu irradiació a R, que estableix un estat de fotoequilibri molt alt ($\Phi \sim 0,8$), el qual es pot revertir amb una breu irradiació de FR sempre i quan no passi molt temps entre irradiacions R – FR. Si passa massa temps, es produeix una escapada de la reversibilitat, la magnitud de la qual és variable en funció de les respostes. Un exemple d'aquest tipus de respostes és el fotocontrol del tancament nictinàstic (Satter and Galston, 1981).

3) Respostes d'alta irradiància (“**high irradiance response**”, **HIR**): Requereixen exposicions prolongades amb un flux fotònic relativament alt ($>10^3 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). La magnitud de la resposta depèn de la λ , la taxa de flux fotònic i la duració de la irradiació. No presenten reversibilitat R/F i no segueixen la llei de la reciprocitat. Segons es desencadenin per una radiació R o FR es denominen R-HIR o FR-HIR. En són exemples l'elongació de les tiges, l'expansió foliar i la síntesi d'antocians.

1.3.3.4. Funcions dels diferents fitocroms

Els phys actuen al llarg del cicle vital regulant nombrosos processos que, en algun cas, són resultat d'una complexa interacció entre diferents òrgans de la planta. Estudis realitzats majoritàriament amb *Arabidopsis* i *Oryza sativa* per intentar assignar funcions concretes a determinats phy han portat a destacar que:

- a) Un determinat phy pot modular diferents tipus de resposta dins una mateixa espècie i entre diferents espècies
- b) Els phys poden actuar de forma independent, additiva, sinèrgica, antagònica, seqüencial o redundant, ja sigui parcial o totalment
- c) Un mateix procés pot estar regulat per diferents phys segons les condicions d'il·luminació ambiental.

El phyA intervé principalment en la percepció de llum FR actuant a través d'una VLFR o de FR-HIR; per exemple el phyA (FR-HIR) està implicat en la desetioliació (Yanovsky et al., 1995). El phyB s'associa amb respostes del tipus LFR. Aquest phyB té un paper primordial a la regulació fotoreversible (R/FR) de la germinació de la llavors. El phyC està involucrat en la desetioliació de les llavors induïda per llum R i en el control de la floració. PhyD i phyE contribueixen a aquestes respostes sota llum R quan hi ha

absència de phyB; a més a més el phyE controla la germinació de les llavors, l'elongació entre nodes i el temps de floració (Briggs W. R. and Spudich, 2005). S'ha demostrat que tenen un paper primordial en desetiolació el phyA i phyB, mentre que el phyD-phyE i phyC tenen funcions redundants amb phyB (Franklin et al., 2003; Monte et al., 2003), coregulant altres respostes, tals com la síndrome de fugida de l'ombra (SAS, de l'anglès *shade avoidance syndrome*) (Taula I1).

Fitocroms	Activitat fotosensorial primària	Paper fisiològic primari
phyA	VLFRs FR-HIRs	Germinació sota un ampli espectre de condicions lumíniques (UV, visible, FR); Desetiolació de la plàntula sota FRc; Inducció de la floració en LD.
phyB	LFRs R-HIRs EOD-FR (raó R:FR)	Germinació sota Rc; Desetiolació de la plàntula sota Rc; Resposta a ombra simulada (elongació del peciol i de l'internode, floració).
phyC	R-HIRs	Desetiolació de la plàntula sota Rc.
phyD	EOD-FR (raó R:FR)	Resposta a ombra simulada (elongació del peciol i de l'internode, floració).
phyE	LFRs EOD-FR (raó R:FR)	Germinació; Resposta a ombra simulada (elongació del peciol i de l'internode, floració).

VLFRs: resposta a fluxos molt baixos
LFRs: resposta a fluxos baixos
HIR: resposta a alta irradiància
FR: vermell llunyà
R: vermell

FRc: vermell llunyà continu
Rc: vermell continu
LD: dia llarg
EOD-FR: vermell llunyà al final del dia
R:FR: raó vermell:vermell llunyà

Taula I1 Especificitat fotosensorial i funcions biològiques dels diferents membres de la família dels phys en *Arabidopsis thaliana*. (adaptat de Li et al, 2011).

1.4. Senyals de transducció dels fotoreceptors

En sentit ampli, al conjunt de processos que ocorren entre la percepció d'una senyal física o biològica, produint un primer canvi en l'expressió gènica, fins a l'aparició d'un canvi mesurable en el desenvolupament o el creixement se l'anomena *transducció de senyals* (Quail, 2002b). La llum pot modular l'activitat dels fotoreceptors induint canvis en la seva localització subcel·lular i/o abundància; alguns d'aquests (per exemple els phys i els crys) actuen en el nucli, impactant sobre l'expressió gènica de dianes directes que indueixen l'activació d'una xarxa de transducció de senyals complexa, per desencadenar les fotorespostes. L'activació d'aquests fotoreceptors pot afectar significativament la transcripció a través de les vies de transducció de senyals i, en alguns dels casos, afectar directament sobre factors de transcripció (FT) (figura I4).

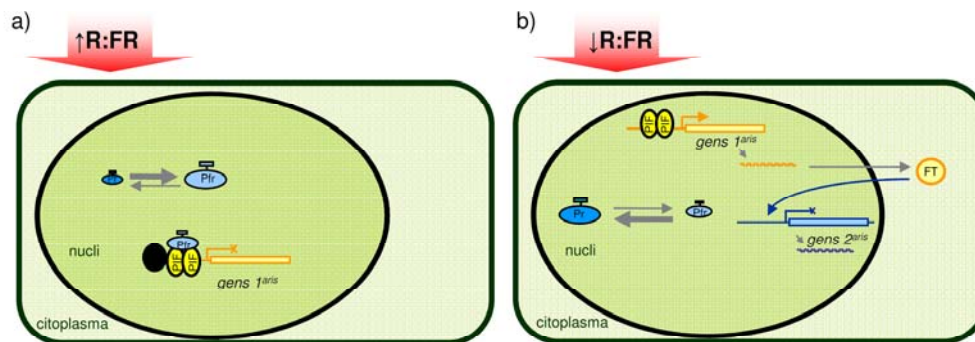


Figura 14. Esquema simplificat de la transducció de senyals del fitocrom quan s'inicia la SAS. Cèl·lula vegetal en condicions de llum d'alta (a) o baixa (b) raó R:FR. Després de la percepció d'ombra simulada (baixa raó R:FR) pels fitocroms, el fotoequilibri es desplaça cap a la forma inactiva Pr. Aquest fet té un efecte directe sobre l'expressió gènica, modulant la cascada transcripcional. FT es refereix a factors de transcripció.

1.4.1. Gens implicats en la transducció de senyals lumínics

Gràcies a *screenings* genètics basats en el procés de desetiolació s'han identificat dues classes de mutants: (i) els *cop* (de l'anglès *constitutive photomorphogenic*) / *det* (de l'anglès *de-etiolated*) / *fus* (de l'anglès *fusca*), on les plàntules es presenten desetiolades en completa foscor com si percebessin la llum i (ii) els que es desenvolupen normalment en la foscor, però que presenten respostes alterades a diferents estímuls lumínics. Degut a la pleiotropia que presenten en major o menor grau els mutants recessius *cop/det/fus*, s'ha postulat la funció com a reguladors negatius de la fotomorfogènesi d'aquests components aigües avall de la convergència entre les vies de senyalització del cry i el phys (Ma et al., 2003; Schwechheimer and Deng, 2000). La segona classe de mutants s'ha classificat en funció del color que són incapaçs de percebre: B, R i FR. Engloben components específics de la senyalització del phyA o del phyB, o de phy o cry. Aquests mutants suggereixen que els primers passos de cada via de transducció engloben intermediaris exclusius de cadascun dels fotoreceptors i que vies separades convergeixen aigües avall en una integració de la senyal per donar resposta al procés de desetiolació. Cal destacar l'existència de mutants que presenten una reducció en tots els tipus de senyalització per llum. El millor caracteritzat és *hy5* (de l'anglès *long hypocotyl 5*). *HY5* codifica un FT de tipus bZIP, l'acció del qual es reprimeix per la degradació mediada per COP1. Com a component involucrat en les respostes B, R i FR, es creu que *HY5* actua aigües avall de la convergència entre senyals dels múltiples fotoreceptors i altres senyals de desenvolupament, juntament amb COP/DET/FUS (Quail, 2002b).

Referent als components de senyalització dels crys, n'hi trobem de reguladors negatius com *HY5*, *HYH* (de l'anglès *HY5 homolog*), *SUB1* (de l'anglès *Short under*

Blue light 1) i HFR1 (de l'anglès *long hypocotyl in far-red 1*), també identificat com a component senyalitzador de phyA; i de positius com *PP7* (de l'anglès *protein phosphatase 7*) (Duek and Fankhauser, 2003; Galstyan and Martinez-Garcia, 2010; Li and Yang, 2007).

Malauradament de la senyalització mediada per fototropines se'n sap molt menys, havent-se identificat dos components que interactuen amb phot1 colocalitzant a la membrana plasmàtica: NPH3 (de l'anglès *non-phototropic hypocotyl 3*) i RPT2 (de l'anglès *root phototropism 2*), pertanyents a una nova família gènica específica de plantes. De totes les proteïnes interactores de phot1, només NPH3 és essencial per totes les respostes fototròpiques dependents de phot1 (Kang et al., 2008; Pedmale and Liscum, 2007). Les interaccions de phot1/NPH3 i phot1/RPT2 estan proposades com a reguladores de la inhibició de l'hipocòtil dependent de fototropina i de l'obertura estomàtica, respectivament (Pedmale and Liscum, 2007).

Les respostes a UV-B són mediades per una banda per vies de senyalització no específiques, implicant dany al DNA, espècies reactives d'oxigen i molècules de senyalització en defensa, i per una altra per vies de senyalització específiques que medien les respostes fotomorfogèniques a baixos nivells de UV-B, donant una inhibició de l'elongació de l'hipocòtil i una regulació transcripcional de l'expressió gènica. Aquesta senyalització estimula l'expressió de gens involucrats en la protecció a UV per tal d'incrementar la supervivència de la planta. La senyalització fotomorfogènica és captada per un receptor de UV-B anomenat *UVR8* (Rizzini et al., 2011). *UVR8* i *COP1* són requerits per la inducció en l'expressió del FT *HY5*, el qual té un paper central en la regulació de gens involucrats en les respostes fotomorfogèniques a UV-B (Favory et al., 2009; Jenkins, 2009). La interacció específica de *COP1* i *UVR8* al nucli és un pas primerenc en la senyalització responsable per la resposta coordinada de la planta a UV-B per assegurar l'aclimatació de UV-B i la protecció de l'ambient que l'envolta. La interacció de *COP1* i *UVR8* regula la fotomorfogènesi induïda per UV-B i l'aclimatació a l'estrés en *Arabidopsis* (Favory et al., 2009). Un altre component específic involucrat en la transducció de senyal UV-B és *ULI3* (de l'anglès *UV-B LIGHT INSENSITIVE 3*), possiblement activat per una transferència d'electrons, alhora que activa elements aigües avall de la senyalització d'UV-B mitjançant una unió a la membrana, per transferència electrònica o ambdós (Suesslin and Frohnmeyer, 2003).

1.4.2. El cas concret dels fitocroms

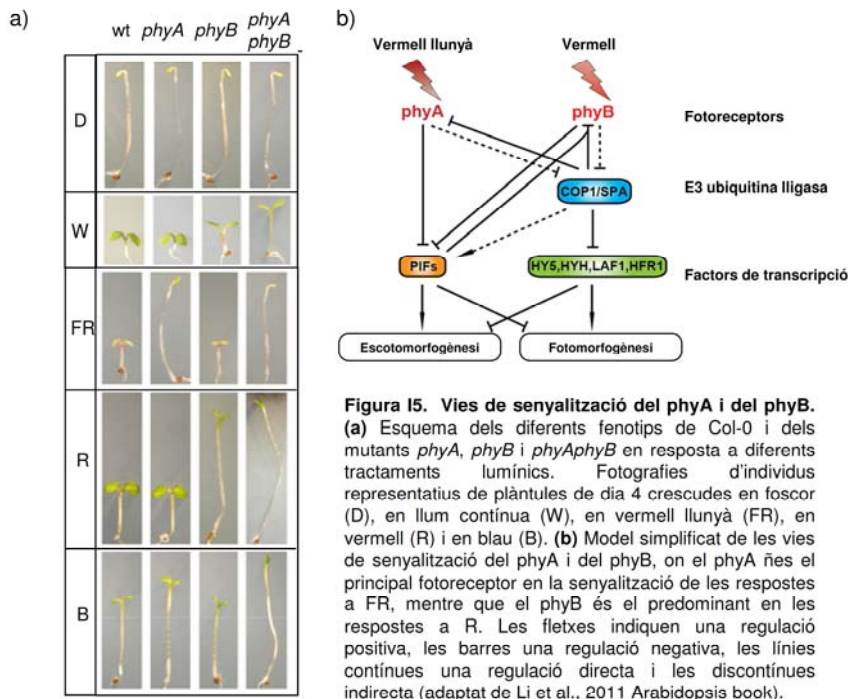
1.4.2.1. Components de la senyalització de phyA

Els mutants que no presenten una correcta desetiolació en FR continu són utilitzats per identificar components que actuen propers a l'acció del phyA: és el cas de *FHY1* (de l'anglès *FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL 1*), i el seu paràleg *FHL* (de l'anglès *FHY1-LIKE*), *FHY3* i *FAR1* (de l'anglès *FAR-RED IMPAIRED RESPONSE 1*). Anàlisis funcionals d'aquests mutants han identificat un paper per *FHY1* i *FHL* en la localització nuclear del phyA actiu (PfrA). Després de l'activació per llum, la forma PfrA interactua amb *FHY1* i *FHL* al citoplasma. La localització nuclear de *FHY1* llavors permet l'entrada del complex. *FHY3* i *FAR1* també controlen l'acumulació nuclear de phyA controlant directament l'expressió de *FHY1* i *FHL* (Hiltbrunner et al., 2006). A més a més, s'han identificat altres components senyalitzadors del phyA codificants per FTs com *LAF1* (de l'anglès *LONG AFTER FAR-RED LIGHT 1*), codificant per una proteïna MYB, o *HFR1*, que codifica per una proteïna bHLH (de l'anglès *basic-helix-loop-helix*) atípica molt similar a *PIF3* (de l'anglès *PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 3*) (Bae and Choi, 2008; Galstyan and Martinez-Garcia, 2010).

1.4.2.2. Components de la senyalització de phyB

Els mutants que no presenten una correcta desetiolació en R són considerats elements senyalitzadors del phyB, donat que és aquest fotoreceptor majoritari en controlar aquest procés en condicions de R (*figura 15*). Per tal de desvetllar elements senyalitzadors s'han dut a terme tècniques de genètica reversa i assajos de doble híbrid de llevat (Y2H). El més estudiat possiblement sigui *PIF3*, un FT tipus bHLH (Ni et al., 1998). Basat en la similaritat de seqüència, s'han identificat altres factors *PIF* i *PIL* (de l'anglès *PIF3-like*). *PIF3*, membre principal del grup, és una proteïna que s'uneix preferencialment a PfrA i PfrB. In vitro, PfrB pot interaccionar amb la unió al DNA de *PIF3*, suggerint una regulació directa de l'expressió gènica pels fitocroms en resposta a R i FR (Martinez-Garcia et al., 2000a), model en el qual està basada la hipòtesi principal del grup (*figura 14*).

Part del mecanisme d'acció del fitocrom rau probablement en la seva activitat quinasa, donat que s'han identificat substrats *in vitro* tals com *PKS1* (de l'anglès *PHYTOCHROME KINASE SUBSTATE 1*) (Fankhauser et al., 1999), Aux/IAAs (Colon-Carmona et al., 2000) i *crys* (Ahmad and Cashmore, 1996). En aquest context, la fosforilació del fitocroms podria tenir un paper important intervenint en la interacció proteïna-proteïna entre el fitocroms i altres proteïnes transductores de senyal (Kim et al., 2004).



1.4.3. Respostes fisiològiques regulades pels fitocroms

Els fitocroms per sí sols tenen papers únics i solapats al llarg del cicle vital de les plantes, regulant un ampli rang de processos de desenvolupament des de la germinació de la llavor fins al temps de floració. L'aïllament de mutants simples dels cinc fitocroms ha facilitat la construcció de múltiples mutants, deficientes en una varietat de combinacions d'aquests. L'anàlisi dels mutants simples i múltiples ha proporcionat informació sobre la funció dels fitocroms a través del desenvolupament vegetal.

Establiment de la plàntula:

Germinació: Almenys 3 fitocroms, phyA, phyB i phyE, estan involucrats en el control de la germinació d'*Arabidopsis*. phyA és el responsable de les respostes VLFR produïdes per una alta varietat d'irradiacions (UV, visible i FR), mentre que el phyB controla les LFRs R/FR reversibles (Li et al., 2011; Reed et al., 1996). La germinació pot ser induïda per VLFR i LFR (taula I1.1). A més a més, phyA promou la germinació en llum FR contínua en el mode HIR (Hennig et al., 2002). Tanmateix, phyE també té un paper en el control de la germinació de la llavor en llum FR contínua. Aquest fet pot ser degut a que el phyE està directament involucrat en la fotopercepció d'aquestes

respostes, o bé a que el phyA requereix el phyE per mediar la germinació de la llavor (Hennig et al., 2002).

Desetiolació: Els mutants deficientes en phyA mostren un fenotip fotomorfogènic salvatge (wt, de l'anglès *wild type*) crescuts en W i R. Tanmateix, crescuts en FR continu presenten un fenotip escotomorfogènic (*figura 15*), confirmant que phyA és responsable de percebre i mediar diverses respostes a la llum FR (Matsushita et al., 2003; Parks and Quail, 1993; Whitelam et al., 1993). El phyB és el fitocrom predominant en regular les respostes de desetiolació en W i R (*figura 15*), malgrat que el phyA té un paper principal en regular ràpidament els canvis en l'expressió gènica en resposta a tractaments de R (Tepperman et al., 2006). Mutant deficientes en phyC mostren una pèrdua parcial de sensibilitat a la llum R, amb hipocòtils més llargs i cotilèdons més petits que el wt, indicant que phyC funciona en la regulació de la desetiolació en R (Franklin et al., 2003; Monte et al., 2003). Tanmateix, el phyC actua independentment del phyB, possiblement formant heterodímers amb aquest *in vivo* (Clack et al., 2009). El paper del phyD sembla minoritari, mentre que el del phyE és negligible (Devlin et al., 1998). En llum B, els fitocroms co-actuen amb fotoreceptors de llum B/UV-A per regular la desetiolació de les plàntules (Franklin and Quail, 2010).

Arquitectura de la planta:

Fugida de l'ombra (SAS): Plantes crescudes en un ambient amb reducció de la raó R:FR mostren una elongació de les tiges i els pecíols, una acceleració del temps de floració i un increment de dominància apical. Donat que és l'objectiu principal d'estudi en aquesta tesi i en el grup, es descriu més àmpliament en l'apartat 1.4.4.

Mutants en phyA mostren un fenotip semblant al wt en W i R, mentre que mutants en phyB presenten pecíols allargats, una reducció de l'àrea foliar i un increment de dominància apical en W (Franklin and Quail, 2010) (*figura 15*).

Desenvolupament reproductiu:

Un paper clau pels fitocroms en ambients amb llum natural implica la monitorització de la llargada del dia i del fotoperíode, els quals, juntament amb la temperatura, abasteixen a les plantes amb informació estacional important.

Posada a punt del rellotge circadià: Múltiples fotoreceptors han estat implicats en la transducció de senyals a la planta, tals com els phyA, B, D i E i els cry1 i 2 (Devlin and Kay, 2000). El paper del phyC no s'ha testat encara. Un increment en la irradiància escurça el fotoperíode en organismes diürns tals com *Arabidopsis* (Millar et al., 1995).

Floració: Reguladors transcripcionals actuen sobre integradors florals els quals, a la vegada, alteren l'expressió de gens d'identitat del meristem per promoure la

floració (Turck et al., 2008). *Arabidopsis* és una planta de dia llarg (LDP, de l'anglès *long-day-plant*), mostrant una floració accelerada en fotoperíodes llargs. Anàlisis en mutants de fotoreceptors han mostrat que phyA i cry2 intervenen en la percepció de fotoperíodes llargs. Estudis en el temps de floració mostren que mutants en *phyA* mostren insensibilitat a tractaments d'allargament de la durada del dia i de trencament del període de nit, confirmant un paper per aquest fitocrom en la percepció del fotoperíode (Reed et al., 1994). Aquestes dades estan recolzades per la floració tardana en mutant de *phyA* crescuts en fotoperíodes llargs (Neff and Chory, 1998). El phyB actua redundantment amb phyD i phyE reprimint la floració sota condicions d'una elevada raó R:FR, a través de la repressió de l'expressió de l'integrador floral *FT* (de l'anglès *FLOWERING TIME*) (Halliday and Fankhauser, 2003a). Per tal de deixar de reprimir cal una exposició prolongada a baixes raons R:FR, assegurant que no es dona una transició a la floració en resposta a canvis en l'ombreig de poca durada. S'ha mostrat que la jerarquia funcional dels fitocroms per mediar la repressió floral està regulada per temperatura (Franklin and Quail, 2010). Mutants deficientes en phyC en un fons genètic Col-0 crescudes en dies curts mostren una acceleració en la floració, suggerint un paper del phyC en la regulació del temps de floració en *Arabidopsis* (Monte et al., 2003).

Tolerància a la congelació:

Tractaments amb una baixa raó R:FR a 16°C produeixen un increment de l'expressió de FTs *CBF* (de l'anglès *C-repeat-binding-factor*) i de les seves dianes, els gens *COR* (de l'anglès *cold-regulated*), proporcionant una major tolerància a la congelació. A 22°C, la unió dels CBFs a les seves dianes COR es troba desacoblada, de manera que s'ha plantejat la hipòtesi que a baixes temperatures i durant les postes de sol prolongades de les latituds més al nord (on hi ha una baixa raó R:FR), aquest mecanisme pot conferir protecció estacional contra les onades gelades sobtades durant mesos de tardor (Franklin and Quail, 2010).

1.4.4. SAS: respostes adaptatives per competir per la llum

La presència de vegetació veïna modifica l'ambient lumínic que capten les plantes, generant senyals que perceben els phys i els crys. Aquestes senyals causen una sèrie de canvis a la planta, tant de forma com de funcions, incloent-hi el creixement dels pecíols i de l'hipocòtil, una posició més erecta de les fulles i una floració primerenca (figura 16). Col·lectivament, aquestes respostes de fugida de l'ombra tendeixen a reduir l'ombreig de les plantes veïnes. A nivell de transducció de senyals, la SAS és deguda a un alliberament de la supressió enlloc de la inducció de les respostes fisiològiques.

El phyB és el major supressor de les respostes de fugida de l'ombra en elevades raons R:FR, donat que plantes deficientes en phyB mostren una fenotip de resposta constitutiva de fugida de l'ombra (pecíols allargats i floració primerenca). La SAS, produïda per una baixa raó R:FR, es pot fenocopiar amb un tractament de FR al final del dia (EOD-FR, de l'anglès *end-of-day far-red*), la qual cosa va permetre identificar el paper de phyD i phyE en la SAS. Mutants monogènics de phyD o de phyE no mostraven cap fenotip alterat després d'un tractament EOD-FR, mentre que sí ho feien en un fons genètic phyB (mostrant un major efecte que els mutants monogènics phyB sols), suggerint que el phyB i el phyD, alhora que el phyB i el phyE, estarien actuant de forma redundant suprimint la SAS. Donat que phyA és el principal fotoreceptor implicat en percebre FR, un enriquiment en FR transmès per incrementar la senyalització de phyA via HIR. Per tant, l'acció del phyA pot substituir la pèrdua de phyB, phyD i phyE donada la seva conversió a les formes Pr inactives. És més, plàntules mutants en phyA presenten una resposta SAS més marcada que el wt quan creixen en baixa raó R:FR (Salter et al., 2003). Sembla ser que el phyC no tindria cap paper en aquest tipus de respostes (Li et al., 2011).

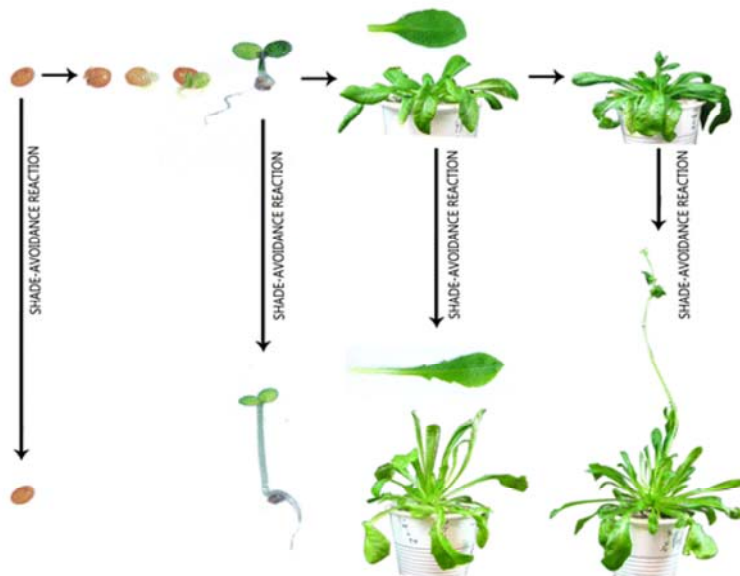


Figura I6 Alteracions causades per les respostes de fugida de l'ombra al llarg del cicle vital de la planta en *Arabidopsis thaliana*. El grup superior d'imatges mostra la progressió de plantes d'*Arabidopsis* en condicions de no ombreig. Quan la planta creix en condicions d'ombra canvia el creixement i el desenvolupament incloent la repressió de la germinació de la llavor, l'allargament de l'hipocòtil, promou l'allargament del pecíol i les fulles creixen més rectes, alhora que hi ha una floració primerenca (adaptat de Casal, 2012).

1.5. Mecanismes moleculars de la SAS

En plàntules crescudes a les fosques, el phyA i el phyB són proteïnes citosòliques inactives (PrA i PrB), que migren al nucli després de l'activació per llum (PfrA i PfrB) (Quail, 2002b). La formació de les formes Pfr, així com la seva translocació, són requerides per l'activitat de senyalització del phyB (Huq et al., 2003). Al nucli, PIF3 s'uneix simultàniament a PfrB i a un motiu G-box ubicat a la regió promotora de varis gens, regulant directament l'expressió gènica en resposta a canvis lumínics (Martinez-Garcia et al., 2000a). Recolzant aquesta hipòtesi, PIF3 s'uneix directament a promotors de gens regulats per llum, tals com *CHS* i altres gens involucrats en la biosíntesi d'antocianines. Tanmateix, almenys en el cas d'aquests promotors, la unió al DNA sembla ser independent de les condicions lumíniques (Shin et al., 2007), suggerint l'existència de mecanismes addicionals pels quals els fitocroms regulen els canvis exercits per PIF3 en l'expressió gènica regulats per llum (Al-Sady et al., 2008).

PIF3 pertany a un sub-grup relacionat amb proteïnes bHLH que actuen més o menys redundamment com a reguladors de la desetiolació de les plàntules. Aquest subgrup inclou varis membres de les bHLH capaços d'interactuar preferencialment amb PfrA i/o PfrB (per exemple *PIF1*, *PIF4*), i altres als quals els manca la capacitat d'interaccionar directament amb els phys (tals com *HFR1* i *PIL1*). Aquest últim grup ha estat proposat com a elements dimeritzadors amb PIFs, regulant potencialment l'activitat de la xarxa de bHLHs (Fairchild et al., 2000; Huq et al., 2004; Huq and Quail, 2002; Khanna et al., 2004; Quail, 2002b). Anàlisis transcriptòmic proposen que durant la desetiolació la llum pot implementar el programa fotomorfogènic regulant una complexa cascada transcripcional, segurament iniciat per la regulació directa dels phys sobre l'expressió gènica d'un grup de reguladors transcripcionals clau a través de diferents PIFs (Jiao et al., 2007; Quail, 2002a).

La percepció dels phys de la proximitat de plantes (baixa raó R:FR) inicia canvis ràpids i reversibles en l'expressió de vàries dotzenes de gens (Carabelli et al., 2007; Devlin et al., 2003; Salter et al., 2003), induint canvis massius en el transcriptoma de la planta (Jiao et al., 2007). El subgrup de gens de resposta primerencs del fitocrom, anomenats gens *PAR* (de l'anglès *PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED*) (Roig-Villanova et al., 2006), està enriquit en membres de diferents famílies de FTs (Devlin et al., 2003; Jiao et al., 2007; Tao et al., 2008). Dels membres *PAR* estudiats, molts codifiquen per FTs pertanyents a la subfamília II dels HD-Zip, tals com *ATHB2/HAT4* (de l'anglès *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 2/HOMEBOX FROM ARABIDOPSIS THALIANA 4*; a partir d'ara *ATHB2*), *ATHB4*, *HAT1*, *HAT2* i *HAT3* (Sorin et al., 2009).

Un altre grup de gens PAR amb un paper a les respostes SAS són membres de la família de reguladors transcripcionals bHLH, tals com *HFR1*, *PIL1*, *PAR1* i *PAR2*. De les dotzenes de gens PAR identificats en anàlisi transcriptòmic, només uns quants han estat investigats com a dianes directes de la senyalització de fitocrom en les respostes SAS. Malgrat que no està clar fins a quin punt els canvis en l'expressió dels gens PAR són claus per donar lloc a la SAS, no és estrany pensar que algunes de les fotorespostes morfològiques i fisiològiques associades a la SAS són conseqüència de la regulació d'aquests gens en un context d'una xarxa transcripcional complexa controlada per fitocroms. En conseqüència, s'ha postulat que els gens PAR l'expressió dels quals està ràpidament regulada per l'acció del fitocrom, incloent *ATHB2*, *ATHB4*, *PIL1* i *PAR1*, són components reguladors de les respostes SAS (Martinez-Garcia et al., 2010; Roig-Villanova et al., 2006). D'aquesta manera, aquests factors PAR actuarien com a punts d'entrada de la percepció de la senyal d'ombra pels fitocroms per modular una xarxa transcripcional pre-existent involucrada en l'adaptació de la planta a la competència per la llum.

1.5.1. Components moleculars reguladors de les respostes SAS: el paper dels PIFs i DELLAs

Alguns estudis han establert un paper dels FTs bHLH de la família dels PIFs en les respostes SAS (Lorrain et al., 2008). A més a més, proteïnes repressores del creixement pertanyents a la família DELLA, implicades en la senyalització de giberel·lines (GAs), també semblen participar en les respostes a baixa raó R:FR (Djakovic-Petrovic et al., 2007). L'efecte de la raó R:FR sobre aquest grup de gens és complex ja que l'estabilitat de diverses proteïnes PIFs es veu afectada per les condicions lumíniques. Estudis amb *PIF1*, *PIF3*, *PIF4* i *PIF5* mostren que s'acumulen en foscor. Quan la planta s'exposa a R, FR o W, la interacció d'aquests PIFs amb la forma activa dels phy n'indueix la seva degradació via proteosoma 26S/ubiquitina (Leivar et al., 2008; Nozue et al., 2007; Shen et al., 2008). Aquests estudis indiquen que els PIFs són proteïnes fotolàbils; al contrari que ocorre amb *PIF7*, que és fotoestable (Leivar et al., 2008). Estudis complementaris amb *PIF1*, *PIF3*, *PIF4* i *PIF5* mostren que s'acumulen de nou en foscor durant el cicle llum-foscor (Castillon et al., 2007; Nozue et al., 2007). Donat que una baixa raó R:FR incrementa l'estabilitat de *PIF4* i *PIF5* (Lorrain et al., 2008), semblaria que l'acumulació d'algunes de les proteïnes PIFs fotolàbils es veuria afectada per la raó R:FR que perceben.

Estudis genètics han identificat *PIF4* i *PIF5* com a components importants de la senyalització de phy per donar respostes SAS. Tal i com s'ha comentat, ambdós s'acumulen en foscor, es degraden en resposta a R, i es mantenen en alts nivells sota

ombra simulada (baixa raó R:FR) (Lorrain et al., 2008). Aquests autors descriuen que la degradació d'aquests FTs ve donada per una fosforilació i que requereix el domini APB del *phyB* per mediar la seva interacció amb el PfrB. Aquestes dades suggereixen que *PIF4* i *PIF5* es degraden després de la interacció amb el PfrB actiu via proteosoma 26S/ubiquitina. La resposta reduïda dels mutants *pif4* i *pif5* a ombra simulada suggereix un paper positiu per aquests dos factors PIFs en la regulació de la SAS. Ho complementa el fet que la sobreexpressió d'aquestes dues proteïnes produeix un fenotip parcial de SAS, suggerint que promouen l'elongació en el creixement. D'aquesta manera la SAS és desencadenada, almenys en part, com a conseqüència de la reducció de la degradació mediada per fitocroms de *PIF4* i *PIF5*. Consistentment amb aquesta idea, la resposta SAS constitutiva mostrada pels mutants *phyB*, es veu parcialment revertida en absència de *PIF4* i *PIF5* (Lorrain et al., 2008). Recentment també s'ha relacionat a *PIF7* (de l'anglès *phytochrome interacting factor 7*), una bHLH interactora de *PHYB*, en la resposta SAS, connectant directament la percepció de la senyal lumínica a un creixement ràpid degut a la síntesi de noves Aux (Li et al., 2012). En condicions d'ombra, *PIF7* s'acumula de forma desfosforilada permetent la seva unió a gens de biosíntesi d'auxines, incrementant-ne l'expressió (Li et al., 2012).

La interacció entre els phys i els PIFs és transitòria i està altament afectada per la raó R:FR, alterant el balanç entre els nivells de fitocroms i els seus interactors. Com a conseqüència, després de la detecció de proximitat vegetal pels fitocroms, la llum implementa el programa fotomorfogènic regulant la cascada transcripcional existent, probablement modulant la regulació directe dels phys sobre l'expressió gènica d'un grup de reguladors transcripcionals importants via PIFs. Donat que l'abundància de PIFs també està regulada per una baixa R:FR, sembla plausible que el grup de reguladors transcripcionals implicats sigui altament dinàmic i que pugui variar en el temps (per exemple amb l'edat de la planta) i espacialment (per exemple, segons l'òrgan), i amb exposicions més llargues a ombra simulada (Martinez-Garcia et al., 2010).

Les proteïnes DELLA són un grup de proteïnes repressores del creixement, originalment identificades com a components de la senyalització de GA. Reben el nom perquè contenen els residus aminoacídics DELLA (Achard and Genschik, 2009; Bolle, 2004). En *Arabidopsis* la família DELLA està codificada per cinc membres: *GAI* (de l'anglès *GA INSENSITIVE*), *RGA* (de l'anglès *REPRESSOR OF GA1*), *RGL1* (de l'anglès *RGA-LIKE 1*), *RGL2* i *RGL3*. Les proteïnes DELLA es localitzen al nucli, on suprimeixen l'expressió de gens de resposta a GAs. Tanmateix, en presència de GA les proteïnes DELLA es degraden (Achard and Genschik, 2009). L'estabilitat de les

proteïnes DELLA i la seva degradació mediada per GA es veuen afectades per diverses senyals, tals com altres hormones -auxines i etilè-, la llum i condicions d'estrés d'origen biòtic i abiòtic (Achard and Genschik, 2009; Swain and Singh, 2005). Aquest fet suggereix que les proteïnes DELLA poden actuar com a integradors de senyals de diverses rutes de senyalització que regulin el creixement.

Anàlisis genètics amb mutants de guany i pèrdua de funció de les DELLA han implicat a les GA i a les DELLAs en la regulació de les respostes SAS (Djakovic-Petrovic et al., 2007). Una major estabilitat de les DELLA, com passa en el mutant *gai-1*, dona una resposta SAS reduïda, donant a entendre la importància de la seva degradació en el creixement d'aquest tipus de respostes. Tanmateix, les DELLA no són les úniques responsables de les respostes SAS donat que els mutants de pèrdua de funció de totes les proteïnes DELLA encara responen a la baixa R:FR, suggerint l'existència d'altres reguladors de la SAS independents de les DELLA (Djakovic-Petrovic et al., 2007).

1.5.2. Components moleculars reguladors de les respostes SAS: el paper dels PARs que codifiquen per bHLH

PIL1 és el primer gen pertanyent a les bHLH descrit com a ràpidament regulat per la percepció de competència per la llum i que té un paper com a regulador negatiu en la SAS (Roig-Villanova et al., 2006; Salter et al., 2003), alhora que està implicat en la regulació de la desetiolació de les plàntules (Salter et al., 2003). L'expressió de *PIL2* (també conegut com a *PIF6*), un gen homòleg a *PIL1* i del qual no s'ha descrit la funció en la SAS, també està ràpidament induïda per la percepció de proximitat, però els seus nivells de transcrit incrementen més tard (Salter et al., 2003).

La bHLH *HFR1* té un paper negatiu en el control de les respostes a la SAS basat en el dramàtic increment de l'elongació de l'hipocòtil en un tractament d'ombra del mutant *hfr1-4* (al·lel feble) i *hfr1-5* (al·lel nul) (Sessa et al., 2005). Complementa aquesta premisa com a regulador negatiu de la SAS l'obtenció del mateix resultat sota tractament d'ombra simulada (Roig-Villanova et al., 2007). Prèviament, s'havia identificat genèticament *HFR1* en varis grups degut a la hiposensibilitat de les plàntules mutants sota FRc. Malgrat s'assembla a *PIF3* (Ni et al., 1998), no s'uneix ni a phyA ni a phyB. Tanmateix, *HFR1* sí s'uneix a *PIF3*, suggerint una heterodimerització, de manera que el complex *HFR1/PIF3* i l'homodímer *PIF3* s'uneixen preferencialment a la forma Pfr d'ambdós fitocroms. És a través d'aquesta heterodimerització i amb altres factors PIFs que *HFR1* pot modular la senyalització de phyA (Fairchild et al., 2000)(Fairchild et al., 2000). No és estrany, doncs, hipotetitzar que *HFR1* funcioni de la mateixa manera en la SAS, modulant la senyalització de phyA

i/o phyB a través de l'heterodimerització amb diferents factors PIFs, alguns dels quals han estat mostrats com a reguladors positius de la SAS (*PIF4* i *PIF5*) (Hornitschek et al., 2009; Lorrain et al., 2008). A l'igual que les proteïnes PIFs, l'estabilitat d'HFR1 està afectada per la llum. Es podria dir que HFR1 és fotoestable però escotolàbil, ja que és una proteïna de vida curta en fosc.

PAR1 i el seu paràleg *PAR2* codifiquen per proteïnes bHLH atípiques, que necessiten estar al nucli per exercir la seva funció biològica (Roig-Villanova et al., 2007). Anàlisis fenotípics de plantes amb nivells incrementats o reduïts de *PAR1* i/o *PAR2* suggereixen un paper negatiu d'aquests gens en la regulació de la SAS, indicant que una alteració dels nivells de *PAR1* i/o *PAR2* afecten significativament la capacitat de resposta de la planta a ombra simulada. Anàlisis transcriptòmiques han demostrat que *PAR1* i *PAR2* regulen el desenvolupament modulant la transcripció d'altres gens (Roig-Villanova et al., 2007).

El control de les respostes SAS, doncs, sembla no estar exercit per un paper central, sinó que és compartit per diversos factors tals com els que s'han descrit en aquest apartat (Martínez-García et al., 2010).

1.5.3. Components moleculars reguladors de les respostes SAS: el paper dels ATHBs i HATs

Els dos primers gens descrits com a ràpidament induïts per la proximitat vegetal foren *ATHB2* i *ATHB4* (Carabelli et al., 1993). Ambdós codifiquen proteïnes pertanyents a la subfamília II dels HD-Zip de FTs, els quals es caracteritzen per tenir un domini d'unió al DNA (HD) i un domini adjacent de cremallera de leucines (LZ), el qual és responsable de la dimerització (Ariel et al., 2007). Estudis funcionals utilitzant proteïnes truncades mostren que el motiu LZ es requereix per la unió al DNA duta a terme pel domini HD (Tron et al., 2004). Els gens HD-Zip s'agrupen en quatre classes diferents, des de la HD-Zip I fins a la IV, basant-se en la similaritat de seqüència i pel patró d'introns/exons dels gens (*figura 17*) (Ariel et al., 2007; Ciabelli et al., 2008). Dels deu membres de HD-Zip II, un total de cinc són gens PAR, és a dir, la seva expressió està ràpidament induïda per ombra simulada: *ATHB2*, *ATHB4*, *HAT1*, *HAT2* i *HAT3*, suggerint un possible paper com a regulador de la SAS. Aquests cinc membres formen dos subgrups de gens paràlegs: *ATHB2/HAT1/HAT2* i *ATHB4/HAT3* (Ciabelli et al., 2008).

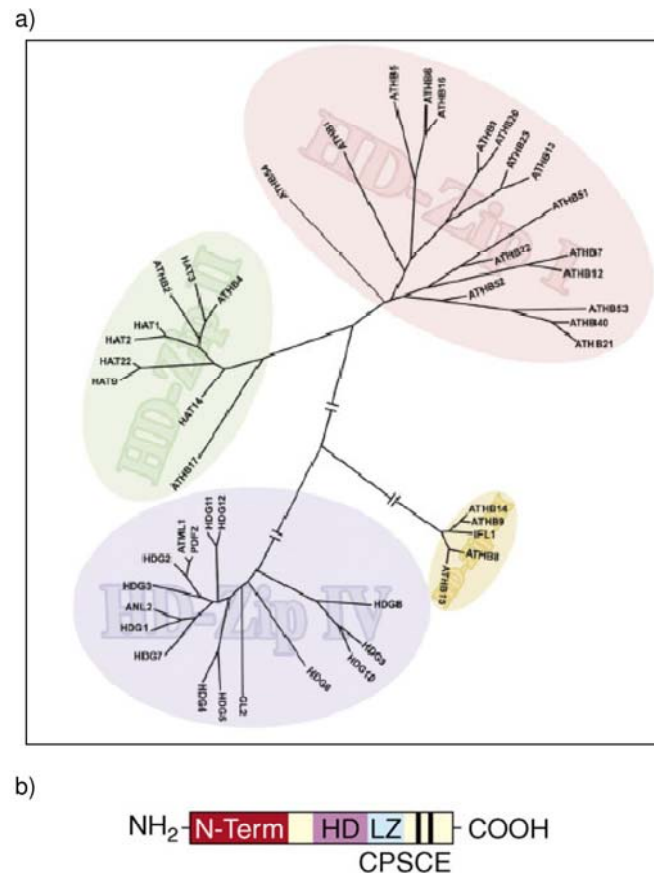


Figura 17 Família de factors de transcripció HD-Zip. (a) Arbre filogenètic de les proteïnes HD-Zip basat en l'alineació de les seqüències proteiques utilitzant el programa Tree-Puzzle 5.2. (b) Representació esquemàtica dels diferents dominis i regions de la subfamília HD-Zip II, on HD, homeodomini; LZ, cremallera de leucines (adaptat de Ariel et al., 2007).

Plantes sobreexpressores d'*ATHB2* tenen hipocòtils més llargs, cotilèdons i fulles més petits i un sistema radicular més prim. Consistentment, plàntules transgèniques sobreexpressants d'*ATHB2* en antisentit (anti-*ATHB2*) mostren un fenotip oposat (Schena et al., 1993; Steindler et al., 1999). Basant-se en aquests fenotips es va suggerir que *ATHB2* podria tenir un paper com a regulador positiu de les respostes a la SAS, almenys en estadi de plàntula (Sessa et al., 2005). En contrast amb les línies anti-*ATHB2*, plàntules mutants de pèrdua de funció d'*ATHB2* no mostren un fenotip diferencial sota una elevada raó R:FR ni en condicions d'hivernacle. Aquestes observacions suggereixen que l'expressió de gens codificants per varis membres de la subfamília HD-ZipII pot estar reduïda en les línies anti-*ATHB2*, causant una disminució de l'activitat no només d'*ATHB2* sinó també d'altres proteïnes homòlogues. Alts nivells de transcrit d'*ATHB2* foren trobats en mutants *phyB*, confirmant un paper pel fitocrom com a repressor de l'expressió d'*ATHB2* (Carabelli et al., 1996). Tanmateix, es poden

observar increments en els transcrits d'*ATHB2* en mutant *phyB* després d'un tractament amb una baixa raó R:FR o de EOD-FR, suggerint la implicació d'altres fitocroms en la regulació d'aquesta resposta (Franklin and Quail, 2010). La sobreexpressió d'*ATHB2*, *ATHB4*, *HAT1* i *HAT2* reprimeix l'expressió de varis gens pertanyents a la subfamília HD-ZipII (Ciarbelli et al., 2008; Ohgishi et al., 2001; Sawa et al., 2002; Sorin et al., 2009), la qual cosa suggereix que almenys quatre membres d'aquest grup formen una auto regulació negativa en la que la seva homeostasi (nivells) està mútuament controlada, ja que l'elevada expressió d'un d'aquests membres reprimeix l'expressió dels altres. Donat que l'expressió d'aquests gens està ràpidament induïda per ombra simulada, la percepció pels phys de la reducció en la raó R:FR pot afectar ràpidament l'expressió de tota la subfamília, la qual a la vegada modularia l'expressió d'alguns dels seus gens, contribuint al complex paper que tenen aquests FTs en el control de la SAS. Com a conseqüència, el fenotip similar observat en plantes amb alta activitat d'algun d'aquests factors (*ATHB2*, *ATHB4*, *HAT1* i *HAT2*) pot resultar, en part, de la regulació aigües avall de l'expressió de tota la família HD-ZipII.

1.5.4. Integració dels components reguladors de la SAS en xarxes transcripcionals

Malgrat que el nombre de components identificats per tenir un paper en la regulació de la SAS és limitat, en tots els casos són proteïnes nuclears pertanyents a diferents famílies de reguladors transcripcionals. Aquests components reguladors desencadenen canvis en les xarxes transcripcionals aigües avall per controlar les respostes SAS, remarcant la complexitat de la regulació de diverses respostes SAS. Una tasca important per entendre la SAS és investigar el paper d'aquests components en la xarxa transcripcional modulada per fitocrom induïda per ombra, com es relacionen entre ells (per exemple per poder establir una jerarquia) i com actuen conjuntament per regular les diferents respostes SAS.

1.6. Connexió entre la senyalització SAS i altres vies reguladores:

La necessitat d'interpretar els canvis lumínics en l'ambient en plantes superiors ha dut a l'evolució de xarxes de senyalització altament sofisticades. A través de l'alt control d'aquestes, l'acció dels fotoreceptors modela el creixement i el desenvolupament vegetal en un ambient canviant. Varioses hormones vegetals regulen la divisió i l'expansió cel·lular modulades per la fotomorfogènesi. Auxines (Aux), brassinosteroides (BRs) i GAs generalment són considerades hormones estimuladores del creixement, mentre que l'etilè i les citoquinines són considerades hormones

inhibidores d'aquest. Aquestes fitohormones i el rellotge circadià poden actuar en el mateix sentit o antagonísticament per contribuir a la regulació per la llum de les respostes fotomorfogèniques. Moltes d'aquestes respostes també estan regulades per altres senyals ambientals tals com la llum i la temperatura. Aquest tipus de xarxes de senyalització, que estableixen connexions entre senyals interns i externs, són el medi per integrar informació de l'ambient amb el desenvolupament vegetal.

1.6.1. Rellotge circadià

El rellotge circadià controla els canvis diaris en l'expressió gènica, el creixement, l'activitat fotosintètica i la floració estacional. Els ritmes circadians sovint prenen forma d'ones sinusoidals que es poden descriure matemàticament en termes de període (duració d'un cicle rítmic complert), fase (estat d'un ritme relatiu a un altre ritme de referència, per exemple cicle dia-nit) i amplitud (diferència entre el valor mitjà i el màxim/mínim d'una oscil·lació sinusoidal). Aquest mecanisme rítmic sincronitza els processos de senyalització interns amb els estímuls externs, permetent als organismes separar processos metabòlics incompatibles i coordinar les respostes de determinades fases perquè tinguin lloc al millor moment del dia o de l'any (estació), la qual cosa aporta un avantatge adaptatiu en comparació a activitats dutes a terme a l'atzar (Harmer, 2009; Mas, 2008). Els components del rellotge i els fotoreceptors estan íntimament lligats, ja que les senyals lumíniques dels *phy*s i els *crys* posen a punt el rellotge amb els cicles dia/nit. Aquest procés, conegut com a *fotoaclimatació*, s'aconsegueix ajustant els ritmes de l'oscil·lador al cicle solar de 24h (Fankhauser and Staiger, 2002). Molts dels aspectes relacionats amb el creixement i el desenvolupament estan sota la influència del rellotge. A més a més hi ha moltes vies de senyalització modulades pel rellotge, de manera que la sensibilitat de la planta a estímuls al llarg del cicle circadià varia. La inducció de l'expressió de *PIL1* i *PIL2* està controlada pel rellotge circadià, amb increments mínims a l'alba dels dos gens (Salter et al., 2003). Aquests resultats indiquen que l'activitat d'alguns components de les xarxes transcripcionals regulats per ombra estan connectats al rellotge circadià, suggerint que les respostes fisiològiques a una baixa raó R:FR també poden estar regulades. Experiments d'ombra simulada transitoris (2h) poden desencadenar l'elongació de l'hipocòtil al cap de les 24h següents quan les plàntules es creixen en una raó R:FR constant, mostrant que l'elongació de l'hipocòtil per ombra també estava regulada pel rellotge circadià, amb un màxim de creixement cap al capvespre. A més a més, l'elongació de l'hipocòtil s'inhibeix (enlloc d'induir-se) després d'un tractament d'ombra simulada transitori aplicat al capvespre subjectiu (Salter et al., 2003). En concordança, sota llum constant de raó R:FR elevada el patró d'elongació de l'hipocòtil

també és rítmic, mostrant una repressió del creixement diari al capvespre subjectiu i un interval de creixement ràpid a l'alba subjectiva(Dowson-Day and Millar, 1999). Els pics d'elongació de l'hipocòtil coincideixen amb els pics d'inducció per ombra de *PIL1* i *PIL2*, suggerint un paper d'aquests gens en la regulació d'aquesta resposta. També ha estat proposat un paper per *PIF4* i *PIF5* com a elements clau per explicar el creixement rítmic. Durant el dia la llum inactiva aquests factors PIFs promovent-ne la degradació, mentre que al principi de la nit del rellotge circadià no es transcriuen, deixant una finestra molt petita de poques hores abans de l'alba perquè pugui créixer(Nozue et al., 2007). Donat que la degradació de *PIF4* i *PIF5* és induïda per llum, sota condicions de dia llarg (16h de llum en un cicle de 24h) o de llum constant (alta irradiància R:FR) el paper d'aquests factors és negligible(Niwa et al., 2009). L'increment d'estabilitat de *PIF4* i *PIF5* en resposta a la percepció d'una raó R:FR baixa pot implicar la participació d'aquests dos factors PIFs, conjuntament amb *PIL1* i *PIL2*, en les respostes transitòries de l'hipocòtil a l'ombra simulada controlades pel rellotge circadià (Lorrain et al., 2008; Martínez-García et al., 2010).

1.6.2. Baixa i alta temperatura

Hi ha evidències que en la regulació d'algunes respostes SAS, tal com la floració i la germinació, hi ha interacció de la percepció de llum pels fitocroms i la temperatura, malgrat que en la regulació de l'allargament de l'hipocòtil la informació és escassa. Estudis fets en la gramínia anual *Abutilon theophrati* mostren que l'elongació de l'hipocòtil en resposta a baixes raons R:FR s'incrementa sota elevades temperatures, indicant que aquesta resposta depèn de la temperatura ambient (Weinig, 2000). Malgrat que no hi ha estudis similars en *Arabidopsis*, l'exposició de plàntules creixent en *W* constant (alta raó R:FR) a elevades temperatures (28-29°C) mostra una inducció de l'elongació de l'hipocòtil dependent d'Aux, comparat a plàntules creixent a 20-22°C (Koini et al., 2009; Stavang et al., 2009). Aquestes observacions suggereixen que l'alta temperatura i la baixa raó R:FR comparteixen mecanismes reguladors en el control de l'elongació de l'hipocòtil. Aquesta possibilitat portà a hipotetitzar un paper de *PIF4* i *PIF5* en les respostes a altes temperatures. La resposta de l'hipocòtil està completament abolida en plàntules *pif4* i atenuada en plàntules *pif5* que han estat transferides a 28-29°C, suggerint un paper d'aquests PIFs en la regulació d'aquest procés, essent essencial el paper de *PIF4* (Koini et al., 2009; Stavang et al., 2009). Es desconeix si l'allargament de l'hipocòtil per ombra simulada en *Arabidopsis* es veu afectat per l'alta temperatura, ni si *PIF4* i *PIF5* tenen un paper important en aquesta regulació en aquestes condicions. Tanmateix, l'alta temperatura induïx l'expressió de *PIF4* sense incrementar l'estabilitat de la proteïna (Koini et al., 2009; Stavang et al.,

2009) , suggerint que els mecanismes pels quals s'incrementa, o bé per temperatura o bé per reducció de la raó R:FR, són diferents.

1.6.3. Hormones

L'elongació en plàntules d'*Arabidopsis* es pot substituir en alguns casos per l'aplicació exògena d'Aux, BRs, GAs o etilè. No és sorprenent, doncs, que molts estudis clàssics provin d'implicar alteracions en el metabolisme o en les respostes hormonals per regular aquesta elongació amb la resposta a llum, especialment a ombra simulada. També és possible que l'alteració de les resposta a hormones pugui afectar també la sensibilitat a la llum. Aquest doble efecte entre la llum i les hormones s'ha suggerit quan s'analitza l'elongació dels hipocòtils en resposta a una combinació de dosis creixents de brassinòlida al llarg de la desetiolació de les plàntules en resposta a dosis creixents de R i FR (Martinez-Garcia et al., 2010; Nemhauser, 2008).

Així doncs, Aux, BRs, GAs i etilè, implicats en l'elongació, juguen un paper en les respostes SAS, i les interaccions amb les diferents vies de senyalització d'aquestes hormones han estat establerts (Martínez-García et al., 2010; Vandenbussche et al., 2005).

1.6.3.1. Auxines

Les Aux regulen múltiples aspecte del creixement i desenvolupament vegetal tals com l'expansió dels cotilèdons i les fulles, l'elongació de l'hipocòtil i la tija i la dominància apical, processos associats a la SAS. La percepció de la llum té una gran influència en els nivells, el transport i la resposta a Aux (Halliday and Fankhauser, 2003c). En el cas de la proximitat vegetal, els fitocroms controlen la síntesi d'Aux, el transport (distribució al llarg de la plàntula) i la resposta a auxines de cèl·lules individuals (*figura 1.8 (a)*) (Weijers and Friml, 2009). S'ha mostrat que una reducció en els nivell del phyB actiu induït per una baixa raó R:FR produeix un increment ràpid (1h) en els nivells endògens de àcid indol-3-acètic lliure (IAA). Aquest efecte implica l'acció de *TAA1* (de l'anglès *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1*)/*SAV3* (de l'anglès *SHADE AVOIDANCE 3*), a partir d'ara *SAV3*, donat que els mutants *sav3*, que tenen nivells d'IAA reduïts, són incapaços d'allargar l'hipocòtil després d'un tractament amb una baixa raó R:FR. *SAV3* codifica per un enzim de la biosíntesi d'auxines requerit per l'increment ràpid dels nivells d'IAA en resposta a ombra simulada i per a una inducció total de les respostes SAS (Tao et al., 2008). Tractaments de plàntules wt amb un inhibidor del transport d'auxines com l'àcid naitlftalàmic (NPA) supprimeixen la resposta de l'hipocòtil a la SAS (Steindler et al., 1999). A més a més, tractaments amb baixa raó R:FR intervenen en la producció d'arrels laterals produïda per les Aux derivades de la

tija (Bhalerao et al., 2002; Salisbury et al., 2007). Aquests experiments proposen que l'exposició de plàntules a ombra simulada produeix una reducció del transport d'Aux basi-pètal a través del cilindre central de l'hipocòtil a favor de les capes laterals de cèl·lules al mateix òrgan. Donat que aquestes capes cel·lulars són menys eficients movilitzant les Aux de la seva font, resulta en un increment transitori del pool d'Aux en aquestes capes, incrementant l'elongació de l'hipocòtil. A més a més, això resultaria en una reducció en el total d'Aux que arriba a les arrels (Morelli and Ruberti, 2002). Aquests experiments involucren els fitocroms en el transport d'Aux en la regulació de les respostes SAS. Tractaments amb una baixa raó R:FR indueixen un canvi en la distribució de l'expressió GUS a la línia reportera DR5:GUS (la qual conté un reporter artificial d'Aux), l'expressió del qual es creu que reflexa els nivells d'Aux lliure (Sabatini et al., 1999; Tao et al., 2008). Malgrat que l'ús de línia DR5:GUS com a marcador dels nivells d'Aux lliure ha estat recentment qüestionat (Petersson et al., 2009), la seva activitat com a marcadora de respostes primerenques a Aux en el context de plàntula sencera no s'ha posat en dubte, permetent estudiar com l'ombra simulada altera la resposta a Aux en diferents òrgans o en cèl·lules individuals. A més a més, plàntules DR5:GUS mostren una expressió GUS incrementada en el terç inferior de l'hipocòtil i als cotilèdons, i una reducció de l'expressió a les arrels (Roig-Villanova et al., 2007; Salisbury et al., 2007; Tao et al., 2008) indicant que, després de la detecció de proximitat vegetal, els phys també controlen la resposta local a Aux.

En relació als membres de la família HD-Zip II, plantes amb alts nivells d'ATHB2 presenten fenotips relacionats amb Aux, els quals es veuen restituïts o abolits quan hi apliquem auxines o NPA, respectivament (Schena et al., 1993; Steindler et al., 1999). La sobreexpressió de *HAT2* també produeix fenotips relacionats amb Aux, amb els cotilèdons epinàstics –tret característic de plantes que sobreproduïxen Aux (Boerjan et al., 1995) i una reducció de la formació d'arrels laterals (Sawa et al., 2002). La sobreexpressió d'*ATHB4* també incrementa l'epinàstia dels cotilèdons, especialment en condicions d'ombra simulada. Aquest fet es suprimeix quan s'hi afegia NPA. A més a més, plantes amb elevada activitat d'*ATHB4* presenten una reducció de resposta a 2,4-D (una auxina sintètica), suggerint un paper d'aquest factor en la capacitat de resposta dels hipocòtils a Aux (Sorin et al., 2009). Aquests resultats suggereixen que l'expressió induïda per ombra d'aquests HD-Zip pot promoure les respostes SAS modulant els nivells d'Aux, el seu transport o la sensibilitat a aquestes. D'aquesta manera, aquests factors poden integrar la senyal d'ombra percebuda pels phys amb alguns aspectes de la capacitat de resposta a Aux en la modulació de les respostes SAS (Martinez-Garcia et al., 2010).

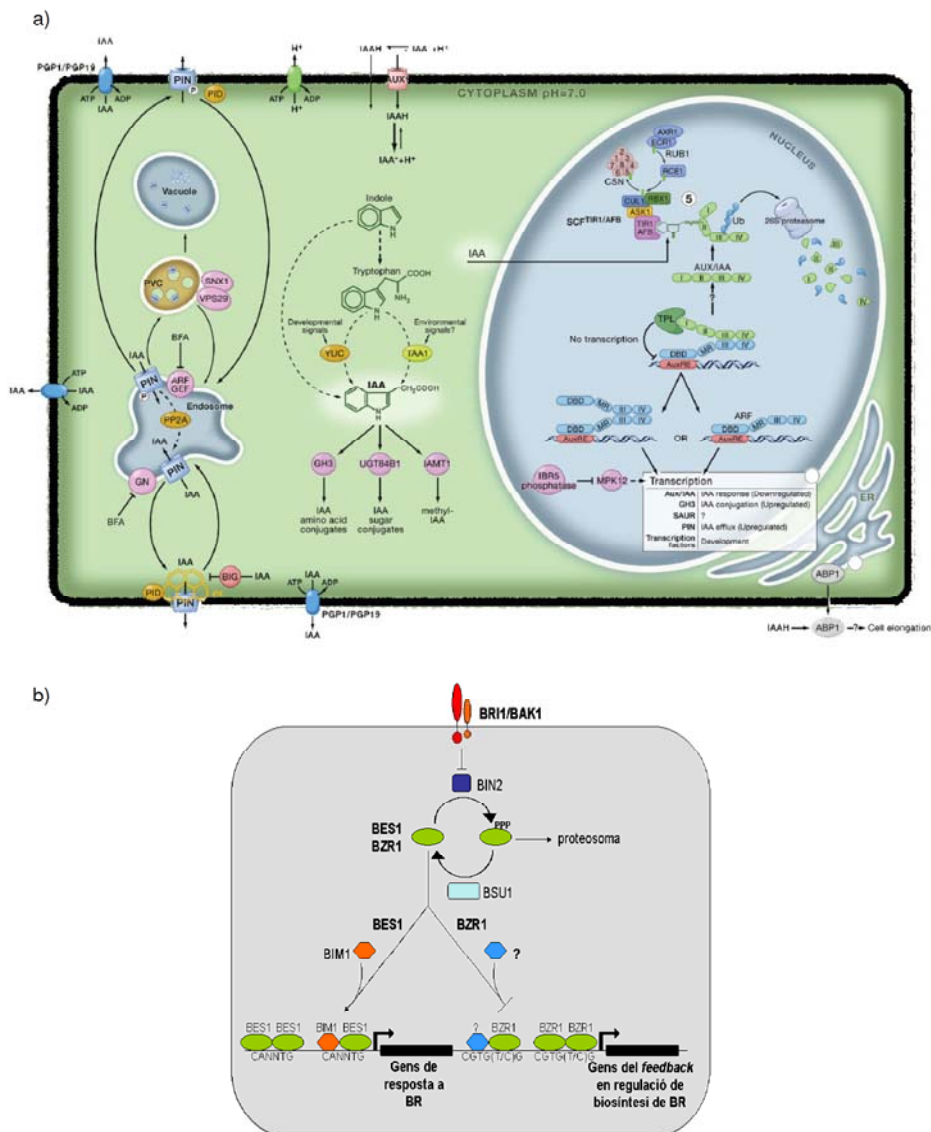


Figura 18. Ruta de senyalització d'Aux i BRs. (a) Diagrama de la senyalització i el transport d'Aux en una cèl·lula vegetal. (Weijers i Jiri, Cell 2009) (b) Diagrama on es mostra la senyalització aigües avall de partir de la via de transducció de senyals dels BRs. En cèl·lules estimulades amb BR, BRI1/BAK1 inhibeixen BIN2 i/o activen BSU1 induint la conversió de BES1/BZR1 a la forma hipofosforilada. BES1, associat al factor de transcripció bHLH BIM1, promou la transcripció d'un subgrup de gens regulats per BR a través de la unió a motius E-box, CANNTG. Paral·lelament, BZR1 reprimeix directament la transcripció de gens d'autoregulació tals com *CPD* per ajustar l'homeostasi de BR a través de la unió a elements CGT(T/C)G (adaptat de Vert et al.2005).

1.6.3.2. Brassinosteroides

Els BRs, hormones esteroides vegetals, regulen molts processos de creixement i desenvolupament, tals com l'elongació cel·lular, el desenvolupament vascular, la senescència, les respostes a l'estrés i la fotomorfogènesi (Li and Chory, 1999; Yang et al., 2011). Els BRs es perceben a la membrana plasmàtica per la unió directa al domini

extracel·lular del receptor BRI1. Aquesta percepció inicia una cascada de senyalització, actuant a través de la quinasa GSK3, BIN2 i la fosfatasa BSU1, que alhora modula l'estat de fosforilació i l'estabilitat de FTs nuclears tals com BES1 i BZR1 (*figura 1.8 (b)*) (Vert et al., 2005). Mutants de pèrdua de funció en les vies de síntesi o de senyalització de BRs causen fenotips pleiotròpics nans (Clouse and Sasse, 1998; Li and Chory, 1999). A la foscor, els mutants de BR mostren fenotips desetiollats -hipocòtils curts, cotilèdons oberts i amb una expressió de gens fotomorfogènics inadequada. Els mutants de BRs crescuts en llum tenen rosetes compactes de fulles verd fosc i epinàstiques, amb una elongació reduïda dels hipocòtils, pecíols foliars i tiges de les inflorescències i una disminució de la dominància apical, senescència i fertilitat masculina (Yin et al., 2005).

Es suggerí la implicació dels BRs en el desenvolupament fotomorfogènic pel fenotip desetiollat de mutants defectius en gens que codifiquen per enzims de la biosíntesi de BRs (per exemple *DET2*, *CPD* i *DWF4*) (Li and Chory 1999). Mutants de la biosíntesi de BRs com *det2-1* i *dwf1* (Luccioni et al., 2002) presenten respostes de la SAS defectives, suggerint que els BRs són necessaris pel desenvolupament normal d'aquestes respostes. Una altra connexió entre l'acció dels BRs i l'ombra es proposà quan es descobrí que *BAS1*, el qual codifica per un enzim inactivador de les respostes a BRs, suprimia el fenotip d'hipocòtil llarg dels mutants *phyB*, el qual presenta una resposta a la SAS constitutiva (Neff et al., 1999). Aquesta evidència suggereix la importància de la via de senyalització de BRs intacta per obtenir respostes SAS correctes. Tanmateix, no es coneix si l'allargament de l'hipocòtil induït per la percepció d'ombra es fa afectant el metabolisme o als nivells de BRs.

1.6.3.3. Giberel·lines

Les GAs controlen múltiples aspectes del desenvolupament vegetal, incloent la germinació, l'elongació de l'hipocòtil, l'expansió del cotilèdon i la floració, caràcters associats a la SAS. L'estudi en diferents espècies (*Brassica*, *Vigna*, patata, sorgo i tabac) indiquen que la inducció de l'elongació de l'hipocòtil en resposta a ombra simulada, a tractaments EOD-FR o a una reducció genètica de la senyalització per fitocrom (*phyB*) alteren el metabolismes i/o els nivells de GAs bioactives (Garcia-Martinez et al., 1987; Martinez-Garcia et al., 2000b; Pierik et al., 2004a). Aquests resultats suggereixen la hipòtesi que la percepció de la proximitat vegetal detectada per *phys* altera el metabolisme global de GA i els seus nivells, amb l'objectiu de modular l'elongació. Per contra, els nivells de GA no canvien després d'un tractament d'ombra simulada o de EOD-F en mutants deficients en fitocrom en altres espècies

(*Arabidopsis*, cogombre i pèsol), de manera que s'hipotetitza que la resposta de l'hipocòtil ve determinada per l'alteració de la sensibilitat a GA en els teixits corresponents (Lopez-Juez et al., 1995; Reed et al., 1996). En la regulació de la SAS, doncs, la llum controla el creixement de la tija/hipocòtil alterant alhora la sensibilitat i/o el metabolisme de GAs en diferents teixits i/o òrgans.

1.6.3.4. Etilè

Plantes transgèniques de tabac insensibles a l'etilè mostren una reducció de les respostes SAS, suggerint un paper important d'aquesta hormona gasosa en la detecció de plàntules adjacents (Pierik et al., 2004a). A més a més, l'aplicació de concentracions moderades d'etilè a plàntules wt induïx respostes semblants a les de la SAS (Pierik et al., 2004c). Tanmateix, quan s'analitzen plantes que creixen en condicions de no competència per la llum, les plantes transgèniques de tabac insensibles a l'etilè mostren una resposta normal a tractaments de baixa raó R:FR, suggerint que l'ombra simulada pot induir respostes SAS independentment de l'acció de l'etilè (Pierik et al., 2004b). En les mateixes plantes, l'ombra simulada estimula la producció d'etilè i d'algunes respostes SAS induïdes per aquesta hormona, tals com l'elongació del pecíol i la tija (Pierik et al., 2004a). Els mateixos autors mostren que els efectes com a inductors del creixement de l'etilè depenen de GA (Pierik et al., 2004b). S'ha demostrat que l'etilè regula l'estabilitat de les proteïnes DELLA (Achard and Genschik, 2009; Achard et al., 2009), proposant a aquesta hormona com a integrador molecular de vàries vies de senyalització promotores del creixement. Anàlisis genètics suggereixen la participació de la reducció de les DELLA per permetre l'elongació de l'hipocòtil i els pecíols en resposta a ombra simulada (Djakovic-Petrovic et al., 2007). L'acció de l'etilè regulant les respostes SAS s'ha demostrat que és independents de les GAs i de les proteïnes DELLA, almenys en *Arabidopsis* (Martínez-García et al., 2010; Pierik et al., 2009).

1.6.4. Integració de xarxes transcripcionals regulades per hormones i ombra en el control de la SAS

L'ambient i les senyals endògenes inicien i/o modulen diferents xarxes transcripcionals que regulen varis grups de gens. Aquest fet és molt evident en el cas de les hormones i l'ombra simulada (Devlin et al., 2003; Nemhauser et al., 2006; Tao et al., 2008). A nivell molecular, les cascades transcripcionals regulades per foscor comparteixen varis components amb els controlats per les hormones per determinar la divisió cel·lular i l'expansió. L'expressió de varis gens de resposta a auxines (*IAA*, *GH3-like* i *SAUR*, per exemple), així com la família de transportadors d'auxines PIN (*PIN3* i *PIN7*) canvia

ràpidament després de proximitat vegetal (ombra simulada) (1h) (Devlin et al., 2003; Nemhauser et al., 2006; Tao et al., 2008) o d'ombra vegetal (4h) (Carabelli et al., 2007; Sessa et al., 2005).

SAUR15 (de l'anglès *SMALL AUXIN UP-RNA 15*), *SAUR68*, *HAT2* i *IAA1*, l'expressió dels quals està induïda per Aux, també estan regulats per *ATHB4* i *HAT3*, gens pertanyents a la subfamília de FTs HD-Zip II i descrits com a integradors de les respostes a ombra i hormonals (Sorin et al., 2009). Es desconeix si l'acció d'aquests FT és primari, indirecte o directe. L'expressió de *HAT2*, membre de la mateixa subfamília de FT, no només està induïda per Aux sinó també per una baixa raó R:FR (Sawa, Ohgishi et al. 2002). Donat que l'expressió dels gens pertanyents als HD-Zip II formen una xarxa transcripcional l'homeostasi de la qual s'autoregulen (Ciarbelli et al., 2008; Ohgishi et al., 2001; Sawa et al., 2002; Sorin et al., 2009), són un mecanisme potencial pel qual poden participar en la integració de senyals per ombra i auxines.

1.7. Aspectes espaials i temporals de la senyalització SAS

La majoria dels resultats obtinguts en quant a components moleculars involucrats en les respostes SAS provenen de l'anàlisi de tota la plàntula sencera però els models que descriuen l'acció dels fitocroms i el seu efecte en l'expressió gènica normalment estan plantejats a nivell cel·lular, malgrat anàlisis d'expressió temporal i espacial duen a concloure que els fitocroms són presents en tots els teixits analitzats (Bou-Torrent et al., 2008; Josse et al., 2008; Montgomery, 2008; Montgomery and Lagarias, 2002; Sharrock and Mathews, 2006). La senyal d'ombra implica com a mínim dos passos: una senyalització intracel·lular i una intercel·lular (Bou-Torrent, Roig-Villanova et al. 2008) Aquesta doble senyalització del fitocrom implica que els llocs de percepció de la llum i de l'acció poden estar físicament separats a la planta, de manera que remarca la importància de la comunicació a llarga distància per entendre com la planta creix i es desenvolupa regulada per la llum durant la SAS (Martínez-García et al., 2010).

A nivell hormonal també s'ha descrit una gran importància entre el lloc de síntesi i el lloc d'acció. Per exemple, el desenvolupament vegetal regulat per Aux està controlat per tres punts principals: el lloc de biosíntesi per crear una font d'hormona, el transport per generar un gradient o l'acumulació local, i la percepció o resposta que afecta al desenvolupament (Chandler et al., 2009).

1.8. Nous components de la SAS: HD-Zips

Tal i com s'ha descrit anteriorment, els FTs pertanyents a la família HD-Zip es classifiquen en quatre grups en funció de l'estructura gènica i la presència de dominis concrets (Ariel et al., 2007) (*figura 17 (a)*).

La subfamília HD-Zip I inclou 17 membres codificants per proteïnes semblants (~35KDa). L'afinitat, però no l'especificitat, de la interacció proteïna-DNA està afectada per les seqüència ubicades a l'extrem N terminal d'aquestes proteïnes (Palena et al., 2001). Els membres d'aquesta subfamília estan implicats en respostes a estres abiòtics tals com estrés hídric o lumínic (Wang and Deng, 2003).

La subfamília II està composta per 10 membres (*ATHB2/HAT4*, *ATHB4*, *HAT1-HAT3*, *HAT9*, *HAT14*, *HAT17*, *HAT18* i *HAT22*) en *Arabidopsis*, tots caracteritzats per la presència d'un domini conegut com a CPSCE, localitzat aigües avall del motiu LZ i involucrat en la percepció de l'estat redox cel·lular (Ciarbelli et al., 2008; Tron et al., 2002) (*figura 17 (b)*). Els membres d'aquesta subfamília són capaços de reconèixer regions de DNA amb la seqüència pseudopalindròmica CAAT(C/G)ATTG. Aquestes proteïnes estan involucrades principalment en el fototropisme i en els respostes a Aux (Sessa et al., 2005). En *Arabidopsis* les respostes a la SAS regulades per *ATHB2* a través de mecanismes complexos impliquen l'acció de tres físics diferents. L'elongació de l'hipocòtil induïda en plantes sobreexpressants d'*ATHB2* es mostra similar a l'observada en plantes crescudes en FR. Per contra, s'observa un fenotip oposat en plantes amb una expressió d'aquest gen reduïda. Alguns autors proposen un model pel qual relacionen aquests fenotips amb la distribució d'Aux (Morelli and Ruberti, 2002). L'elongació dels teixits també ve induïda quan sobreexpressem *HAT2*, un gen induïble per Aux (Sawa et al., 2002). La resposta a la foscor i a la llum també implica a *HAHB10*, un gen de girasol amb alta similaritat a *ATHB2*. L'expressió ectòpica de *HAHB10* en *Arabidopsis* produeix una varietat de desviacions fenotípiques, com cotilèdons més foscos, fulles planes, una reducció del cicle vital i una acceleració de la floració (Rueda et al., 2005).

La subfamília III conté 5 membres (*ATHB8*, *PHAVOLUTA/ATHB9*, *PHABULOSA/ATHB14*, *CORONA/ATHB15* i *REVOLUTA/IFL1*). Els membres d'aquest grup tenen tres dominis particulars: el MEKHLA, involucrat en la senyalització redox i en llum (Mukherjee and Burglin, 2006); un domini START amb capacitat d'unió a lípids (Schrick et al., 2004) i un domini d'activació transcripcional SAD. Aquests membres juguen un paper important al llarg de la morfogènesi; *REV*, *PHB* i *PHV* controlen el

patró de la dominància apical al llarg del desenvolupament embrionari (Otsuga et al., 2001; Prigge et al., 2005) ; alhora que els dos primers regulen el meristem apical i la iniciació d'òrgans laterals (Otsuga, DeGuzman et al. 2001).

La subfamília IV conté 16 membres, els quals contenen els dominis START i SAD (Ariel et al., 2007). L'expressió de varis membres d'aquest grup està restringida a les capes cel·lulars externes dels òrgans de les plantes on regulen processos tals com la identificació de l'epidermis, la formació dels tricomes i l'acumulació d'antocianines (Abe et al., 2003; Otsuga et al., 2001). Alhora, els seus membres actuen redundantment entre ells al llarg de desenvolupament (Guan et al., 2008).

Al grup s'ha aprofundit l'estudi en la subfamília II, analitzant el paper d'*ATHB4* en el control del desenvolupament i de la SAS. Resultats previs mostren que la sobreexpressió constitutiva d'*ATHB4* ($P_{35S}::ATHB4$), resulta en un fenotip extremadament nan i estèril (*figura 19*). Donada aquesta dificultat, es treballà amb línies de sobreexpressió d'*ATHB4* d'activitat induïble ($P_{35S}::ATHB4-GR$), mitjançant la inducció de la translocació nuclear ja que aquesta proteïna ha d'estar al nucli per ser activa (Sorin et al., 2009).



Figura 19. Estudi del fenotip de la sobreexpressió d'*ATHB4*. Fenotip de plantes wt (superior) o transgèniques $P_{35S}::ATHB4$ (inferior) crescudes en W.

Les plàntules transgèniques amb *ATHB4* actiu, contràriament al comportament observat en plàntules wt, no allargaven l'hipocòtil en resposta al tractament W+FR, suggerint que *ATHB4* actua com a regulador d'aquest tret de la SAS (*figura 110*). Per altra banda, el tractament amb dosis creixents d'epibrassinòlida (EBL, un BR actiu) induïx l'allargament de l'hipocòtil de plàntules wt (Sorin et al., 2009) . Les plàntules transgèniques amb *ATHB4* actiu respongueren més a la mateixa dosi d'hormona,

concloent que un increment de l'activitat d'ATHB4 confereix hipersensibilitat als BRs (*figura I10*). En quant a Aux (2,4-D, una auxina sintètica) i GAs (GA_3) l'elongació de l'hipocòtil es veu atenuada, de manera que ATHB4 regula aquestes respostes hormonals.

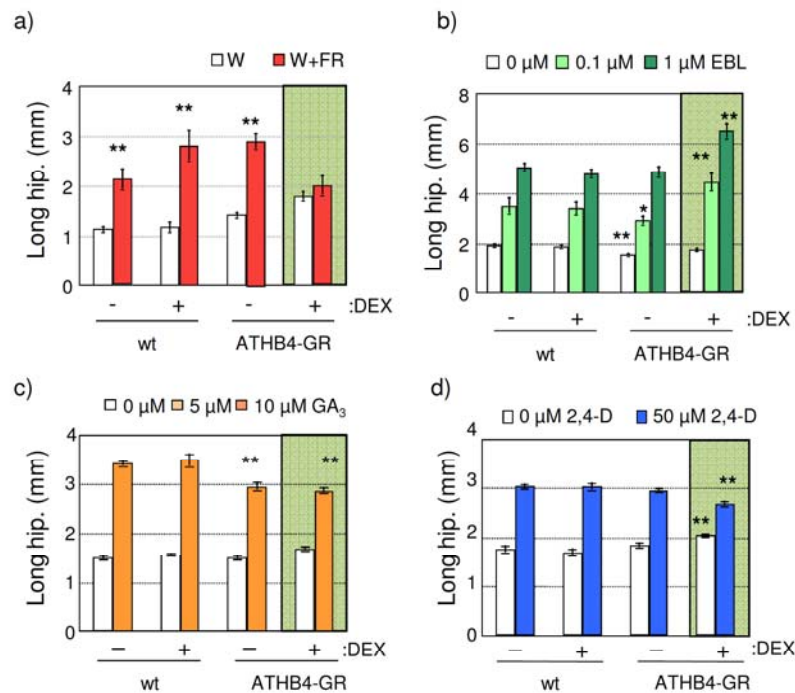


Figura I10. Respostes de la línia de sobreexpressió d'ATHB4 a ombra simulada i hormones. (a) Es sementen llavors en un medi MS1 seguint una distribució equidistant entre aquestes, s'estratifiquen a 4°C de dos a cinc dies i es creixen en W durant dos dies. Transcorregut aquest temps, la meitat de les plaques es transfereixen a llum W+FR (barres vermelles) i l'altra meitat es mantenen en W (barres blanques) durant cinc dies més. En el cas de tractaments hormonals, es creixen les plantes en W en absència o presència de diferents concentracions d'hormona durant els set dies (b, c, d). En dia set es realitzen les fotografies per mesurar la llargada dels hipocòtils (hip.) per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa amb les plàntules creixen en W (a), o al wt amb el mateix control (b-d) (*P<0.05; **P<0.01).

Respostes moleculars. Nivells elevats d'ATHB4 també afecten l'expressió gènica. Així, l'expressió de *SAUR15*, *SAUR68*, *IAA1* i *HAT2*, ràpidament induïts per ombra simulada (Devlin et al., 2003; Roig-Villanova et al., 2007), es veu reprimida per ATHB4, el que reforça el paper d'ATHB4 en la regulació de les respostes de la SAS (Sorin et al., 2009). A més, l'expressió de *SAUR15*, també induïda per l'aplicació exògena d'EBL i Aux (Sorin et al., 2009), es veu reduïda o completament abolida per ATHB4.

L'expressió de *HAT2*, gen regulat per Aux però no per BR (Goda et al., 2004; Nemhauser et al., 2006), també està clarament afectada.

Per contra, la inducció de l'expressió de *IAA1* per Aux (que no està regulada per EBL (Goda, Sawa et al. 2004)) o la del gen *At5g45670* per EBL (gen específic de respostes a EBL (Nemhauser, Hong et al. 2006)) no es veu alterada (Sorin et al., 2009) .

Aquests resultats previs suggereixen que *ATHB4* pot regular les respostes d'un subgrup de gens regulats per Aux i/o BRs, incloent-hi *SAUR15*, *SAUR68* i *HAT2*, però no *IAA1* ni *At5g45670* (Sorin et al., 2009) , indicant que l'efecte repressor d'*ATHB4* sobre l'expressió d'aquests gens és important per la regulació de les respostes de la SAS.

La identificació d'entre els gens regulats per *PAR1* i *ATHB4* de gens del grup *SAUR* i el fet que estiguin regulant la seva inducció pels tractaments amb ombra simulada i amb les hormones auxines i BRs ens porten a hipotetitzar que la senyalització per llum i per hormones conflueixen a nivell dels gens *SAUR*, més concretament a nivell de la regulació de la seva expressió, i que *PAR1* i *ATHB4* són dos dels integradors de senyals (en el cas d'*ATHB4* es desconeix si el seu efecte sobre el promotor és directe). Per aquestes raons considerem el promotor de *SAUR15* com a un element integrador de senyals hormonals i lumíniques.

1.9. Aplicacions biotecnològiques de l'estudi de les respostes de la SAS

Molts dels trets seleccionats per la productivitat vegetal en agricultura moderna estan altament influenciats pels fotoreceptors. Les respostes de la SAS resulten en un redireccionament dels recursos invertint-los en el creixement en extensió dels entrenusos i els pecíols per optimitzar la captació de la llum, en detriment del potencial de creixement de les fulles i els òrgans d'emmagatzematge de la planta, que sovint són els òrgans d'interès agronòmic. Aquest creixement longitudinal de la planta per evitar l'ombra implica processos com la divisió, expansió i diferenciació cel·lular, que depenen de complexes interaccions moleculars i cel·lulars.

La modificació de la fotopercepció, doncs, ha esdevingut un camp important per la millora dels cultius. Tanmateix, s'ha de tenir en compte dues qüestions importants:

1. Tots els caràcters fotomorfogènics susceptibles de ser millorats biotecnològicament també estan sota efecte d'altres factors externs (p.e. fred) o

interns (p.e. hormones), de manera que és complex dissenyar una estratègia de millora sense tenir en compte aquests efectes no desitjats.

2. L'alteració dels nivells d'expressió dels fotoreceptors produeix més canvis dels esperats, alguns no desitjables. Per exemple, tot i que la sobreexpressió de phyB en patates transgèniques augmenta la producció de tubercles, la mida d'aquests és més petita (Thiele et al., 1999), i per tant no són òptims per cultivar.

L'objectiu rau, doncs, en identificar els gens aigües avall de l'acció dels fitocroms que afecten només a un grup de caràcters determinat, per tal de poder modificar d'una manera més focalitzada els trets de les plantes en resposta a la llum (Neff et al., 2000), a més a més de que cal entendre millor el mecanisme de comunicació entre els diferents òrgans de la planta en resposta als senyals lumínics (Bou-Torrent et al., 2008).

2

OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

L'objectiu general del projecte de tesi és **disseccionar la cadena de transducció del senyal de la SAS en *Arabidopsis thaliana***, amb èmfasi en el paper d'ATHB4 i la seva connexió amb les rutes transcripcionals hormonals, així com la importància dels diferents òrgans de la plàntula en aquesta resposta. Per tal fi es van desenvolupar els següents objectius concrets, organitzats en els capítols corresponents:

1. **Estudi de la regió promotora de SAUR15.** Anàlisi funcional del promotor de **SAUR15**, mitjançant mutagènesi dirigida d'elements reguladors relacionats amb regulació hormonal.
2. **Implicació en la SAS de mutants hormonals.** Estudi de les respostes en la SAS en mutants específics de BRs (*bes1-D*, *bzr1-D*, *myb30*, *bas1*, *sob7*) i Aux (*myb77*) alguns dels quals han estat descrits com a reguladors directes de l'expressió de *SAUR15*.
3. **ATHB4.** Estudi de la localització cel·lular i a nivell d'òrgan; així com de les interaccions proteïna-proteïna mitjançant el guany de funció d'*ATHB4*. Estudi histològic del doble mutant *athb4hat3*, caracterització fisiològica i molecular d'aquest. Estudi de les respostes SAS en mutants pertanyents a la subfamília HD-Zip III (*phb*, *phv*, *rev*).
4. **Estudi de la subfamília HD-Zip II.** Estudi del paper d'altres membres propers a *ATHB4* de la mateixa subfamília (*ATHB2*, *HAT1*, *HAT2* i *HAT3*; l'expressió dels quals també s'indueix per ombra simulada) en la transducció de la SAS.
5. **Senyalització espai-temporal entre els òrgans de la planta.** Estudi de la senyalització entre els òrgans de la planta per donar lloc a les respostes SAS i hormonals.

3

RESULTATS

3

CAPÍTOL I

Capítol I: Estudi de la regió promotora de *SAUR15*

L'expressió de *SAUR15* està activada per factors endògens, com les hormones auxines i BRs, i per exògens, com l'ombra simulada (Nakamura et al., 2003; Roig-Villanova et al., 2007; Yin et al., 2005; Yin et al., 2002). A més, en plantes transgèniques d'*Arabidopsis* amb nivells elevats d'expressió del factor de transcripció *ATHB4*, la inducció de *SAUR15* està atenuada, tot i que en aquest cas la repressió exercida per *ATHB4* és més aparent en la inducció per ombra simulada i BRs (Sorin et al., 2009). Donat que el conjunt d'aquests resultats indiquen que el promotor de *SAUR15* és un element integrador de diferents estímuls, i degut a la implicació descrita d'*ATHB4*, vam procedir a estudiar el paper dels diferents elements reguladors descrits tals com les E-box i els elements de resposta a auxines (de l'anglès *Auxin Response Elements, AREs*) presents en aquesta zona reguladora (*figura R1.1*) (Gil and Green, 1996; Gil et al., 1994; Nakamura et al., 2003; Walcher and Nemhauser, 2012).

Per l'anàlisi del seu promotor, disposàvem de la línia transgènica $P_{S15-2,3}:G$, que conté 2,3 kb del promotor de *SAUR15* fusionat al gen marcador *GUS* (*figura R1.2*) (Gil and Green, 1997), la qual permet l'anàlisi de l'expressió espacial podent detectar els teixits i òrgans on està més actiu, suggerint possibles llocs d'acumulació de mRNA *SAUR15*, i alhora possibles teixits diana per l'acció de les auxines. L'activitat basal d'aquest promotor és present en plantes etiolades i crescudes en llum d'*Arabidopsis*, sobretot en la regió d'elongació de l'hipocòtil en plantes etiolades i en cotilèdons i fulles primàries en les crescudes amb llum (Gil and Green, 1997). En les nostres condicions de creixement sota W podem veure que *SAUR15* s'expressa al llarg de l'hipocòtil, a les fulles primàries i als cotilèdons, mancant la seva expressió a la zona basal d'aquests i a les arrels (*figura R1.3*).

El major avantatge d'utilitzar gens *SAUR* com a gens reporters de l'acció d'auxines és que ràpidament s'indueixen, de manera que segurament es troben al principi de la senyal de transducció. D'aquesta manera és possible utilitzar-los per analitzar aspectes espacials de la senyalització d'auxines. Alhora, també està descrit que responen però de manera més feble a BRs (Hardtke, 2007). De manera semblant, l'expressió de *SAUR15* també es veu ràpidament i de manera transitòria induïda per ombra simulada, tractant-se així d'un gen *PAR*, i descrit com a diana directe de l'acció de *PAR1*, el qual exerceix un efecte repressor en la inducció per ombra simulada (Roig-Villanova et al., 2007).

Utilitzant tinció histoquímica de plàntules **P_{S15-2,3}G**, vam comprovar que en les nostres condicions l'activitat GUS s'indueïa suaument per l'aplicació de 2,4-D (una auxina sintètica), epibrassinòlida (EBL) i el tractament amb ombra simulada, si bé els nivells

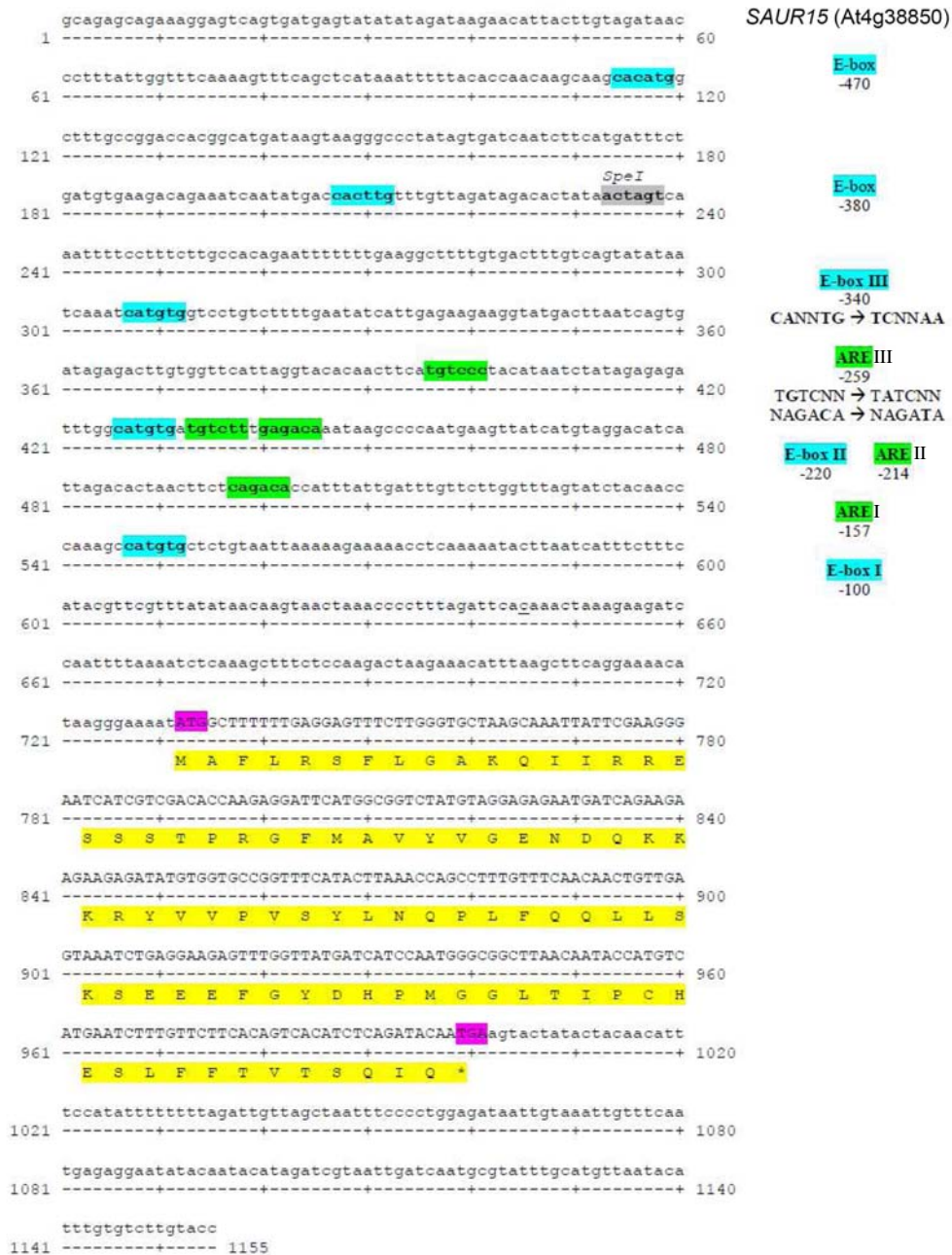


Figura R1.1 Seqüència del promotor i del ORF de **SAUR15 (At4g38850)**. S'hi indica les mutacions de les E-box (I, II i III, en blau) i de les AREs (I, II i III, en verd) realitzades, així com la diana de l'enzim de restricció *SpeI* utilitzada per crear la deleció de l'extrem distal del promotor. En groc s'hi indica la proteïna resultant i en rosa els codons d'inici i de terminació de la traducció d'aquesta.

d'activitat GUS basals eren prou alts en les condicions control (*figura R1.3*). Per tant, podem dir que aquesta construcció respon igual que el gen endogen en quant a la inducció per diferents estímuls.

1.1. Paper de 3 E-boxes (I, II, III) en el promotor de SAUR15 (700 pb)

És en els 700 bp més propers a l'origen de transcripció del promotor de SAUR15 on s'han descrit els 3 elements E-box necessaris per la regulació de la seva expressió en resposta a BIM1 i BES1, factors de transcripció del tipus bHLH o estructuralment relacionats, ambdós implicats en la inducció de SAUR15 per BRs (Yin et al., 2005). Foren anomenades Ebox I (-100), II (-220) i III (-340), essent la primera la més propera a l'inici de traducció (*figura R1.1*). Quan es muten les 3 E-boxes al promotor de SAUR15, l'activació pel dímer BES1-BIM1 es veu abolida, de mostrant que BES1 i BIM1 activen l'expressió gènica de target de BRs a través de les E-box presents en el promotor de gens induïts per tal hormona (Yin et al., 2005).

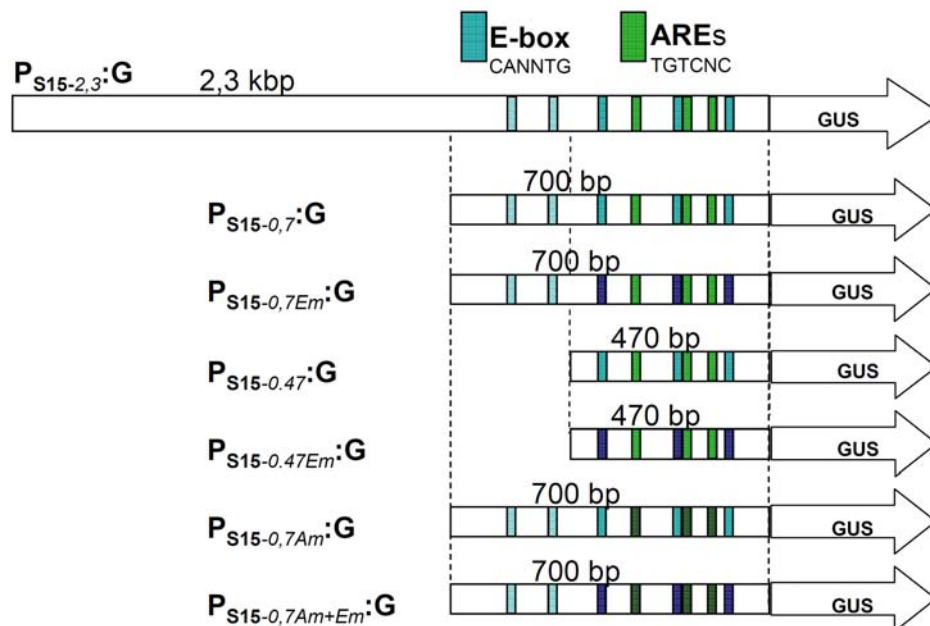


Figura R1.2. Construccions generades derivades del promotor de SAUR15 fusionat al gen marcador GFP-GUS. La construcció $P_{S15-2,3}:G$, que conté 2,3 kbp del promotor de SAUR15 fusionat al gen marcador GUS, estava disponible prèviament (Gil, P. & Green, P. J., 1997). La resta de construccions s'han generat basades en el vector CAMBIA1303/04, que permet fusionar diferents promotors al gen marcador GFP-GUS, malgrat nosaltres només hem utilitzat el GUS (G). Els elements E-box i AREs silvestres estan representats per caixes blaves i verdes, respectivament; i quan estan mutats són de coloració més fosca. $P_{S15-0,7}:G$, conté els 700 bp del promotor de SAUR15 des de l'origen de transcripció, amb les 3 E-box silvestres; $P_{S15-0,7Em}:G$, construcció idèntica a l'anterior amb les 3 E-box mutades; $P_{S15-0,7Am}:G$, construcció idèntica a $P_{S15-0,7}:G$ amb les 3 AREs mutades; $P_{S15-0,7Am+Em}:G$, construcció idèntica a $P_{S15-0,7}:G$ amb les 3 E-box i les 3 AREs mutades; $P_{S15-0,47}:G$, conté 470 bp del promotor de SAUR15 des de l'origen de transcripció i $P_{S15-0,47Em}:G$, construcció idèntica a l'anterior amb les 3 E-box mutades.

Per analitzar el paper d'aquestes caixes a la regulació per ombra simulada al laboratori es van generar noves construccions per mutagènesi dirigida que fusionaven els 700 bp del promotor de *SAUR15*, amb les 3 E-box descrites salvatges ($P_{S15-0,7}:G$, pCM10) o mutades ($P_{S15-0,7Em}:G$, pBM1) al gen *GUS*. Les mutacions de les 3 E-box eren les mateixes que estaven descrites (Yin et al., 2005), i van ser dutes a terme per altres

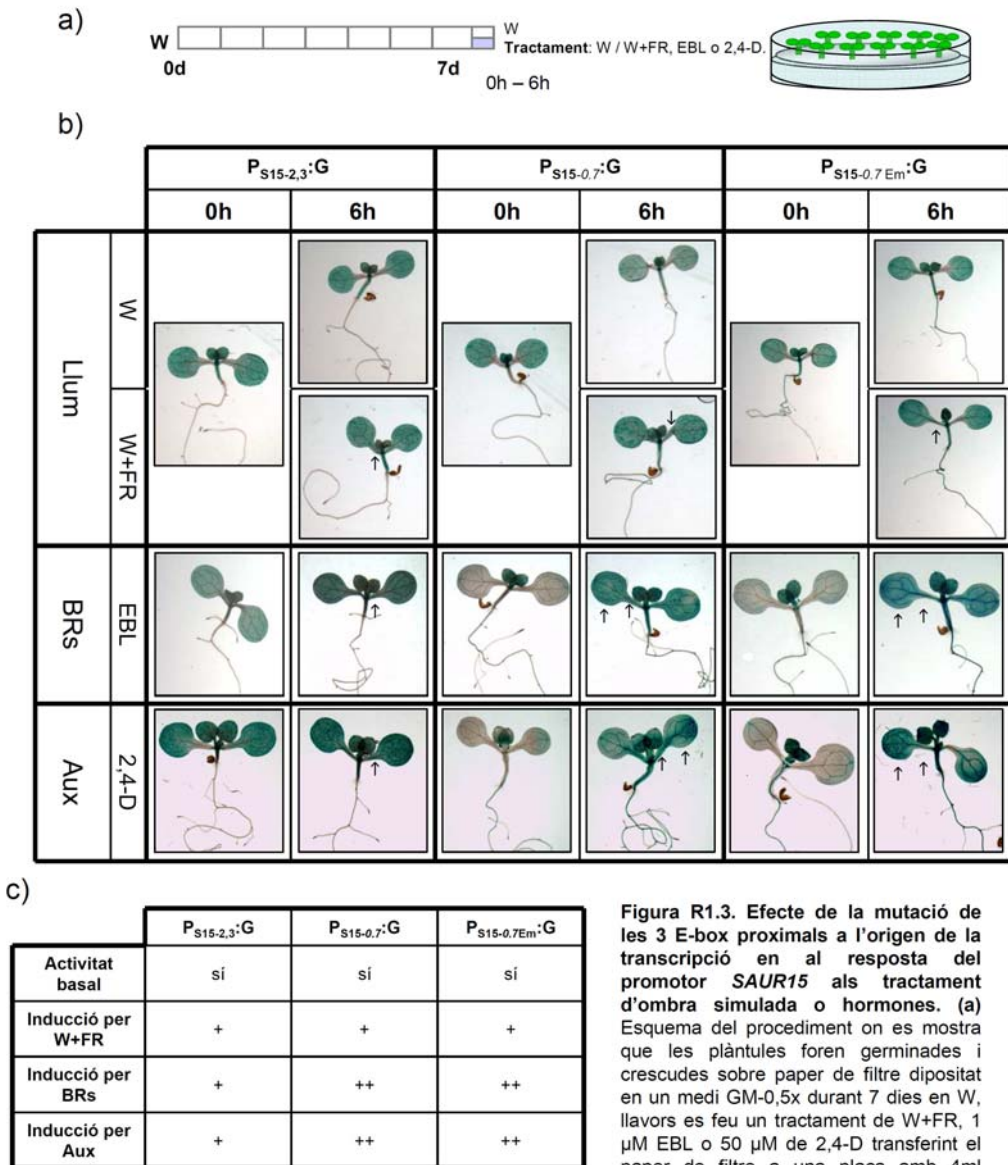


Figura R1.3. Efecte de la mutació de les 3 E-box proximals a l'origen de la transcripció en al resposta del promotor *SAUR15* als tractament d'ombra simulada o hormones. (a) Esquema del procediment on es mostra que les plàntules foren germinades i crescudes sobre paper de filtre dipositat en un medi GM-0,5x durant 7 dies en W, llavors es feu un tractament de W+FR, 1 μ M EBL o 50 μ M de 2,4-D transferint el paper de filtre a una placa amb 4ml d'aigua (W + FR) o d'hormona, i es

recolliren mostres a les 0, 2, 4 i 6 hores de tractament. Es procedí a transferir-les a una solució freda de 90% (v/v) acetona i a mantenir-les a -20C fins al moment de la tinció GUS, on s'incubaren a 37°C durant un mínim de 2:30h. (b) Fotografies d'individus representatius sotmesos a 0 i 6 hores de tractament d'ombra simulada (W+FR), de brassinosteroides (EBL) i d'auxines (2,4-D) de les tres línies en estudi: $P_{S15-2,3}:G$, $P_{S15-0,7}:G$ i $P_{S15-0,7Em}:G$, les fletxes indiquen les zones on la inducció és més notòria. (c) Taula resum dels graus de resposta, on es marca amb "+" quan hi ha inducció, "++" quan aquesta és molt marcada i "-" simbolitza una manca d'activitat GUS.

membres del laboratori, els quals les van mutageneitzar per PCR, es van clonar i seqüenciar per comprovar que eren correctes, es van transformar en plantes d'*Arabidopsis* i es van obtenir varies línies transgèniques per a cada construcció.

Línies P_{S15-0,7}:G	Activitat basal GUS	Inducció per 2,4-D	Inducció per EBL	Inducció per ombra simulada
3	+	+	+	n.a.
4	-	-	n.a.	n.a.
5	+	+	+	++
7	+	+	+	n.a.
8	-	-	n.a.	n.a.
9	+	+	+	n.a.
12	-	-	n.a.	n.a.
13	+	+	+	++
15	+	+	+	n.a.
19	+	+	++	++
23	+	+	++	++
24	+	+	++	n.a.

Línies P_{S15-0,7Em}:G	Activitat basal GUS	Inducció per 2,4-D	Inducció per EBL	Inducció per ombra simulada
1	+	+	++	n.a.
4	+	+	++	n.a.
6	+	+	++	++
9	+	+	++	n.a.
14	+	+	+	n.a.
19	+	+	++	+
22	-	-	n.a.	n.a.
23	+	+	++	n.a.
27	-	-	n.a.	n.a.
29	+	+	+	n.a.
30	+	+	++	+
32	+	+	++	++

Taula R1.1. Resum de les respostes segons el grau de tinció en l'assaig histoquímic GUS de les diferents línies transgèniques independent obtingudes de les dues construccions P_{S15-0,7}:G i P_{S15-0,7Em}:G, respectivament. Es contempla l'activitat basal, així com la inducció de auxines (2,4-D), BRs (EBL) i ombra simulada, veient l'evolució al llarg de 6 hores de tractament, i es marca amb "+" quan hi ha inducció, i "++" quan aquesta és molt marcada, "-" simbolitza una manca d'activitat GUS. Les línies marcades en gris foren les seleccionades. N.a. no analitzades.

Per tal de seleccionar aquelles línies que presentaven plàntules amb activitat GUS per a posteriors anàlisis es va testar la inducció de cadascuna de les línies a tres estímuls diferents: ombra simulada, auxines i BRs mitjançant assajos histoquímics GUS. Plàntules T3 de 12 línies preseleccionades de cada construcció van ser cultivades 7d en Wc i l'expressió del gen GUS fou estudiada per assaig histoquímic després de 0, 2, 4 i 6 hores del tractament amb 50 μM 2,4-D. D'aquestes se'n seleccionaren 9 per estudiar la resposta a 1 μM EBL. D'aquestes, 4 foren seleccionades per estudiar la resposta a ombra simulada (*taula R1.1*). De cadascuna de les línies en estudi, se'n seleccionà una: en el cas de **P_{S15-0,7}:G** es seleccionà la línia pCM10.23.07 i en el cas de **P_{S15-0,7Em}:G** fou la línia pBM1.06.01. Com a controls es van fer servir plàntules **P_{S15-2,3}:G**, que presentaven inducció en els tres tractaments.

Els resultats de les línies representatives, només a temps 6h, es mostren a la *figura R1.3*. En la línia control, **P_{S15-2,3}:G**, els nivells basals de tinció eren força elevats, quedant només la zona del pecíols dels cotiledons sense expressió GUS. Quan aplicàvem els tres tractaments per separat, podíem veure que la tinció passa a ser ubiqua, de manera que podem dir que hi havia una certa inducció (emascarada parcialment pels alts nivells basals) (*figura R1.3.(b)*).

Quan analitzàvem els resultats de les línies representatives escollides per a cada construcció, podíem veure que en el cas de **P_{S15-0,7}:G** hi havia uns nivells basals elevats sobretot en fulles primàries i el sistema vascular que baixa per l'hipocòtil; quan hi aplicàvem de 2 a 6 hores de 2,4-D, la inducció es veia ràpidament incrementada mostrant una tinció GUS de pràcticament tota la planta (*figura R1.3. (b)*) fins i tot a temps 2h (dades no mostrades). El mateix comportament s'observà quan fèiem un tractament amb EBL, vèiem una ràpida inducció a les 2h a nivell de la plàntula sencera. En quant als tractaments d'ombra simulada, els resultats no foren tan obvis; ja que plàntules mantingudes en W el mateix temps que el tractament W+FR també presentaven certa inducció de proteïna GUS. Tanmateix, a trets generals la tinció era major en les plàntules sotmeses a ombra simulada.

En el cas de la construcció **P_{S15-0,7Em}:G**, els nivells basals també es concentraven en les fulles primàries, alhora que a l'extrem dels cotiledons i a l'eix central de l'hipocòtil. Quan fèiem el tractament amb 2,4-D vèiem una inducció elevada a nivell de plàntula sencera a 2 i 4h (dades no mostrades), mentre que a 6h disminuïa una mica (*figura R1.3*). Quan aplicàvem EBL, la inducció també era ràpida i es mantenia de les 2 a les

6h a nivell de tota la plàntula (*figura R1.3*). En el tractament d'ombra simulada ocorria el mateix que en la línia P_{S15-0,7}:G.

Donat que les dues construccions P_{S15-0,7}:G i P_{S15-0,7Em}:G presentaven activitat basal GUS, la qual es veia incrementada pels tres tractaments esmentats (*figura R1.3 (c)*), podem concloure que els 700 pb més propers a l'inici de la traducció són suficients per conferir resposta a auxines, BRs i ombra simulada a un gen reporter. Alhora aquests resultats ens duen a pensar que les 3 E-box mutagenitzades no són els únics elements del promotor de *SAUR15* involucrats en la inducció per BRs, auxines o ombra simulada.

1.2. Funcionalitat del promotor de SAUR15 (470pb)

Tenint en compte que el promotor de *SAUR15* en absència de les 3 E-box descrites com a importants per a la regulació per BRs (Yin et al., 2005) responia als estímuls de manera no significativament diferent al promotor wt, vam analitzar la resta del promotor i vam trobar dues E-box més *aigües amunt* (*figura R1.1*). Per esbrinar la rellevància d'aquestes zones com a possibles elements reguladors es van generar dues noves construccions on es va eliminar la zona inicial del promotor obtenint els 470 bp més propers a l'origen de transcripció del promotor de *SAUR15* fusionats al gen *GUS*, P_{S15-0,47}:G (pMS16) amb les 3 darreres E-box wt i P_{S15-0,47Em}:G (pMS15) amb les 3 darreres E-box mutades (*figura R1.1, R1.2*).

Per dur-ho a terme es va digerir el promotor de *SAUR15* de les construccions P_{S15-0,7}:G i P_{S15-0,7Em}:G amb *SpeI*, diana ubicada just després de les dues E-box localitzades en el promotor *aigües amunt* (*figura R1.1*), i *BamHI*, ubicat en l'oligonucleòtid utilitzat just abans de la metionina inicial de la proteïna. Ambdós fragments es van clonar en un vector pCAMBIA 1304 digerit amb *BglII* i *XbaI* desfosforilat, i s'anomenaren P_{S15-0,47}:G i P_{S15-0,47Em}:G. Es comprovà per PCR que les colònies obtingudes en la transformació d'*E.coli* eren les correctes i es transformà en *Agrobacterium* per la de procedir a l'agroinfiltració en *Arabidopsis*. Es van identificar més de 7 línies transformades amb una inserció de T-DNA, de les quals se n'escollí una 100% resistent representativa (pMS15.13.4 i pMS16.04.2). Un cop obtingudes línies homozigotes, es procedí a fer una tinció histoquímica GUS per veure'n l'expressió. En les línies P_{S15-0,47}:G es detectaren nivells basals d'activitat GUS en les fulles primàries, parcial als cotiledons i a l'eix central de l'hipocòtil (*figura R1.4*).

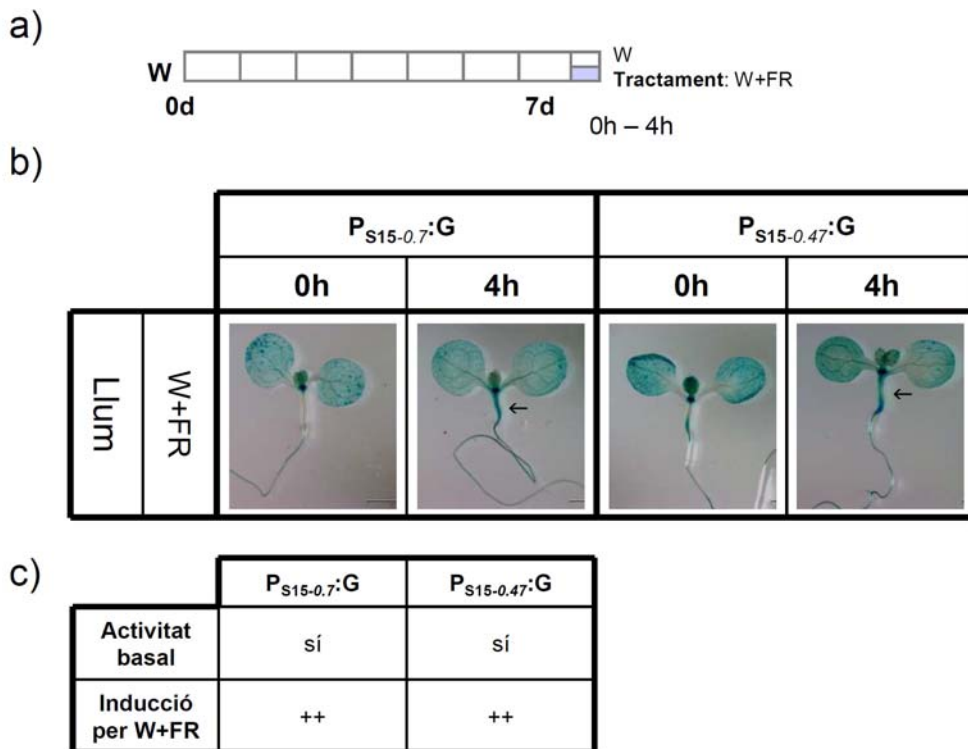


Figura R1.4. Efecte de la presència/ absència de les 2 E-box IV i V en el promotor de SAUR15 en tractament de W+FR. (a) Esquema del procediment on es mostra que les plàntules foren germinades i crescudes sobre paper de filtre dipositat en un medi GM-0,5x durant 7 dies en W, llavors es feu un tractament de W+FR i una posterior tinció GUS tal i com s'indica a la figura R1.3., recollint-se les mostres a les 0 i 4h del tractament. (b) Fotografies d'individus representatius sotmesos a 0 i 4 hores de tractament d'ombra simulada (W+FR) de les dues línies en estudi: $P_{S15-0.7}:G$ i $P_{S15-0.47}:G$, les fletxes indiquen les zones on la inducció és més notòria. (c) Taula resum dels graus de resposta, on es marca amb "+" quan hi ha inducció, "++" quan aquesta és molt marcada i "-" simbolitza una manca d'activitat GUS.

Per esbrinar si el promotor més curt -470 pb- era funcional es van créixer plàntules de les línies $P_{S15-0.7}:G$ i $P_{S15-0.47}:G$ durant 7 dies en W i es feu un tractament de 0 o 4 h de W+FR, amb un posterior assaig histoquímic (figura R1.4). La línia $P_{S15-0.7}:G$ presentava uns nivells basals de tinció, tal i com havia comentat anteriorment (figura R1.3); després de 4h d'ombra simulada es produïa una inducció de la tinció que es tornava ubiqüa, que s'observà més clarament als hipocòtils i als pecíols dels cotilèdons. Els nivells basals de la línia $P_{S15-0.47}:G$ eren iguals que el promotor de 700pb, suggerint que només els darrers 470 pb són suficients per conferir una distribució semblant al promotor més llarg. Comparant els nivells d'inducció de 4h d'ombra simulada no podíem detectar diferències entre les dues línies, de manera que podem concloure que els 470pb més propers a l'inici de la traducció de SAUR15 són suficients per la inducció conferida per l'estímul d'ombra simulada.

1.3. Paper de les E-box (IV, V) en el promotor de SAUR15

Amb l'objectiu d'analitzar el paper de les 2 E-box situades aigües amunt en el promotor de 700pb, es va comparar la línia $P_{S15-0,7Em}:G$ (pBM1.06.1) amb la $P_{S15-0,47Em}:G$ (pMS15.13.4), on l'única diferència era la presència/absència de les dues E-box situades en els 230 pb més distals de l'inici de traducció proteïca, de manera que comparavem dues construccions que o bé tenien aquestes dues E-box o no en tenien

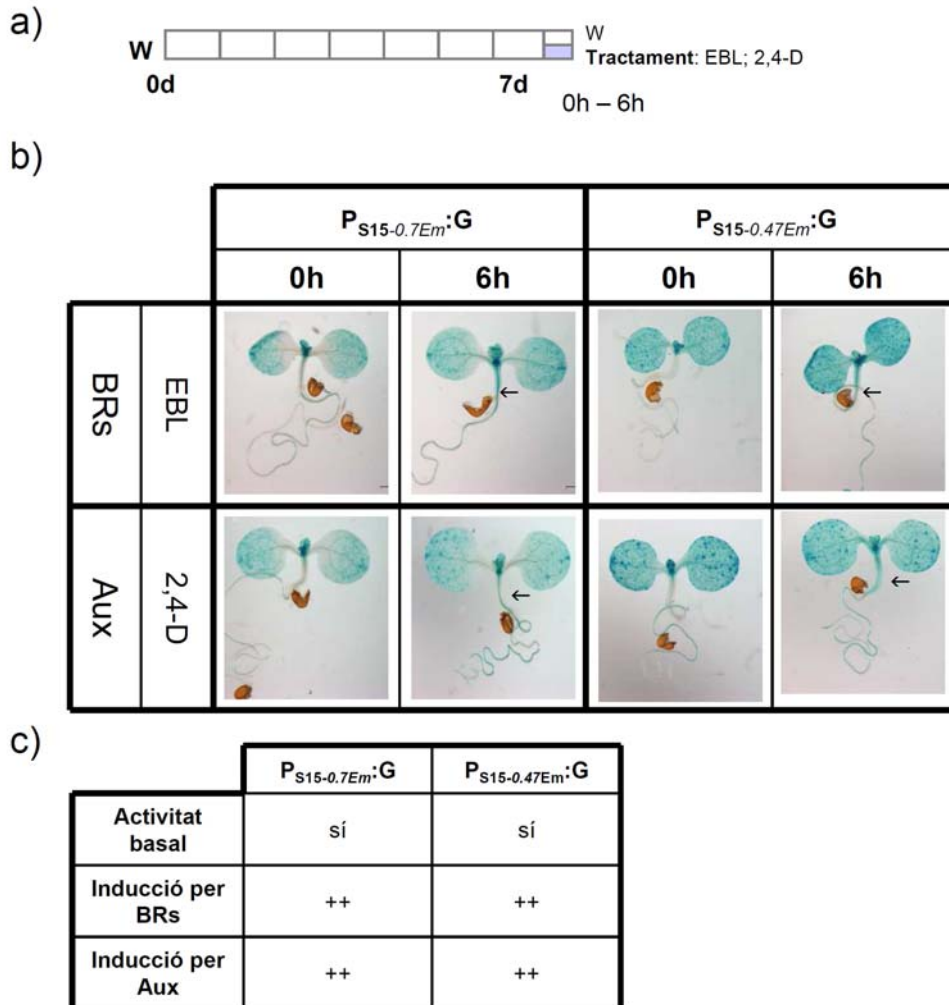


Figura R1.5. Efecte de la presència/ absència de les 5 E-box en el promotor de SAUR15 en tractaments hormonal de BRs i Aux. (a) Esquema del procediment on es mostra que les plàntules foren germinades i crescudes sobre paper de filtre dipositat en un medi GM-0,5x durant 7 dies en W, llavors es feu un tractament de 1 μ M EBL o 50 μ M de 2,4-D transferint el paper de filtre a una placa amb 4ml de la solució amb hormona, i una posterior tinció GUS tal i com s'indica a la figura R1.3., recollint-se les mostres a les 0 i 6h del tractament. (b) Fotografies d'individus representatius sotmesos a 0 i 6 hores de tractament d'EBL i 2,4-D de les dues línies en estudi: $P_{S15-0,7Em}:G$ i $P_{S15-0,47Em}:G$, les fletxes indiquen les zones on la inducció és més notòria. (c) Taula resum dels graus de resposta, on es marca amb "+" quan hi ha inducció, "++" quan aquesta és molt marcada i "-" simbolitza una manca d'activitat GUS.

cap ($P_{S15-0,7Em}:G$ i $P_{S15-0,47Em}:G$, respectivament). El fet d'utilitzar com a control la línia $P_{S15-0,7Em}:G$ és degut a que els resultats previs ens han mostrat que es comportava igual que la línia $P_{S15-0,7}:G$ en resposta als diferents estímuls. Es va optar per utilitzar només el tractament hormonal donat que la inducció d'aquests era més marcada que el tractament $W+FR$ almenys en la línia $P_{S15-0,7Em}:G$ (*figura R1.3*).

Per dur-ho a terme es van créixer plàntules de les línies $P_{S15-0,7Em}:G$ i $P_{S15-0,47Em}:G$ durant 7 dies en W i es feu un tractament de 0 o 6 h de de BRs i d'auxines, amb un posterior assaig histoquímic per detectar inducció de l'activitat GUS (*figura R1.5*), essent l'activitat basal d'ambdues línies semblant. En quant als tractaments, en la línia control $P_{S15-0,7Em}:G$ la inducció per 2,4-D i EBL fou la mateixa que s'ha descrit anteriorment (*figura R1.3*).

La línia amb el promotor truncat $P_{S15-0,47Em}:G$, el qual no presenta cap de les 5 E-boxes descrites anteriorment, presentava una tinció basal igual a la línia $P_{S15-0,7Em}:G$. En aquest cas, hi vam trobar present una inducció en els 2 tractaments exercits, és a dir, després de 6h de 50 μM de 2,4-D i d'1 μM d'EBL, mostrant una distribució ubiqua (*figura R1.5*). D. Aquests resultats indicaven que cap del cinc elements E-box presents al promotor de *SAUR15* són requerits per la inducció de la seva expressió en resposta a aquests tractaments de llum o hormonals aplicats. Per tant, els nostres resultats mostren que els 470pb més propers a l'inici de la traducció de *SAUR15* contenen altres elements implicats en la seva regulació per aquests estímuls.

1.4. Paper dels Auxin Response Elements (ARE) en el promotor de SAUR15

S'han descrit dins del promotor de *SAUR15* elements reguladors com a llocs de senyalització de la via de les auxines i BRs, anomenats AREs (de l'anglès, *AUXIN RESPONSIVE ELEMENTS*) (Nakamura et al., 2003; Vert et al., 2008; Walcher and Nemhauser, 2012). Se n'han descrit 3 de rellevants, ubicades a les posicions -157, -214 i -259 del origen de transcripció (*figura R1.2*), de manera que vam procedir a generar dues noves línies transgèniques amb el promotor de *SAUR15* de 700pb les 3 AREs mutagenitzades amb les 3 E-box wt, $P_{S15-0,7Am}:G$ (pMS20) o mutades, $P_{S15-0,7Am+Em}:G$ (pMS24).

Per dur-ho a terme es va amplificar el promotor de *SAUR15* del plasmid inicial amb les E-box wt ($P_{S15-0,7}:G$) o mutageneitzades ($P_{S15-0,7Em}:G$) amb nous oligonucleòtids generats per introduir la mutació de la seqüència ARE TGTCNN a la TATCNN de

manera seqüencial, mutagenitzant primer l'ARE -157 amb la combinació d'oligonucleòtids MSO1 i MSO2, i es va clonar en un vector TOPO®II obtenint-se els plàsmids pMS17 i pMS21 (amb les E-box wt i mutades, respectivament), es comprovà per PCR que les colònies obtingudes en la transformació d'*E.coli* eren les correctes i es seqüencià. Sobre el plasmid correcte amb el canvi a TATCXX, es va procedir a mutageneitzar l'ARE -214 amb la combinació d'oligonucleòtids MSO3 i MSO4, i es va clonar en un vector TOPO®II obtenint-se els plàsmids pMS18 i pMS22 (amb les E-box wt i mutades, respectivament), es comprovà per PCR que les colònies obtingudes en la transformació d'*E.coli* eren les correctes i es seqüencià. Amb aquets darrer plàsmid es va procedir a mutageneitzar l'ARE -259 amb la combinació d'oligonucleòtids MSO5 i MSO9, i es va clonar en un vector TOPO®II obtenint-se els plàsmids pMS19 i pMS23 (amb les E-box wt i mutades, respectivament), es comprovà per PCR que les colònies

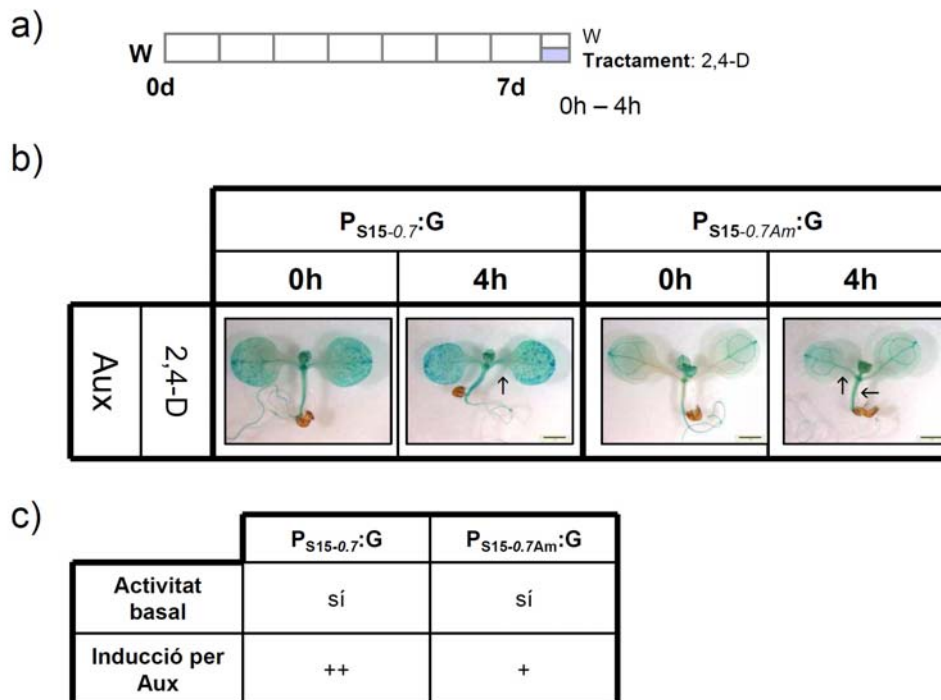


Figura R1.6. Efecte de la presència/ absència de les 3 AREs en el promotor de SAUR15 en tractaments hormonal de Aux. (a) Esquema del procediment on es mostra que les plàntules foren germinades i crescudes sobre paper de filtre dipositat en un medi GM-0,5x durant 7 dies en W, llavors es feu un tractament de 1 μ M o 50 μ M de 2,4-D transferint el paper de filtre a una placa amb 4ml de la solució amb hormona, i una posterior tinció GUS tal i com s'indica a la figura R1.3., recollint-se les mostres a les 0 i 4h del tractament. (b) Fotografies d'individus representatius sotmesos a 0 i 4 hores de tractament de 2,4-D de les dues línies en estudi: $P_{S15-0.7}:G$ i $P_{S15-0.7Am}:G$, les fletxes indiquen les zones on la inducció és més notòria. (c) Taula resum dels graus de resposta, on es marca amb "+" quan hi ha inducció, "++" quan aquesta és molt marcada i "-" simbolitza una manca d'activitat GUS.

obtingudes en la transformació d'*E.coli* eren les correctes i es seqüencià. Un cop es van obtenir els plàsmids amb les 3 AREs mutades, es van clonar en el vector pCAMBIA 1304 obtenint-se els plàsmids anomenats P_{S15-0,7Am}:G (pMS20) i P_{S15-0,7Am+Em}:G (pMS24), amb les E-box wt i mutades, respectivament. Seguidament es transformaren en *Agrobacterium* per la de procedir a l'agroinfiltració en *Arabidopsis*, per tal d'obtenir línies homozigotes. Es van identificar més de 10 línies transformades amb una inserció de T-DNA, de les quals se n'escollí una 100% resistent representativa (pMS20.01.4 i pMS24.11.2)

Amb l'objectiu d'esbrinar el paper de les 3 possibles AREs situades aigües amunt en el promotor de 700pb, i donat que es tracta d'elements reguladors en la senyalització per auxines, es va fer un tractament amb 2,4-D, una auxina sintètica. Es van créixer plàntules de les línies P_{S15-0,7}:G i P_{S15-0,7Am}:G durant 7 dies en W i es feu un tractament de 0 o 4 h de 50 µM 2,4-D, amb un posterior assaig histoquímic (*figura R1.6*); el tractament fou de 4h degut a que és temps suficient per detectar l'increment de la inducció del promotor de *SAUR15* (apartat R1.1; (Hardtke et al., 2007; Nemhauser et al., 2004).

L'activitat basal en ambdues línies fou semblant: màxima tinció en fulles primàries, cotilèdons i l'eix central de l'hipocòtil, essent més tènue en les plàntules P_{S15-0,7Am}:G (*figura R1.6*). Quan aplicàvem 4h de tractament amb 2,4-D s'apreciava una inducció en la línia P_{S15-0,7}:G, tal i com havíem observat anteriorment (*figura R1.4 (a)*). La línia P_{S15-0,7Am}:G també presentava una inducció a nivell d'hipocòtil després del tractament amb Aux, malgrat cal destacar que no fou molt forta. Aquests resultats suggereixen que les 3 AREs no són els únics elements reguladors de la senyalització per Aux de *SAUR15*.

3

CAPÍTOL II

Capítol II: Implicació en la SAS de mutants hormonal

2.1. Implicació de BRs en les respostes de la SAS

Tal i com s'ha descrit a la introducció, els BRs regulen molts processos de creixement i desenvolupament (Li and Chory, 1999; Yang et al., 2011), i mutants com *det2-1* i *dwf1* presenten respostes de la SAS atenuades (Martínez-García et al., 2010), suggerint que aquestes hormones són necessàries pel desenvolupament normal d'aquestes respostes. Resultats obtinguts al llarg del primer període de tesi donen suport al fet que *ATHB4* i *HAT3* són reguladors positius de la resposta a BRs als hipocòtils de les plàntules (capítol III), essent possibles integradors de la percepció de l'ombra i de l'acció de BR (Sorin et al., 2009).

Per estudiar la implicació dels BRs en la resposta SAS s'ha analitzat la resposta a tractaments d'ombra simulada en mutants específics de BRs tals com línies sobreexpressores de *BRI1* i línies mutants de *BES1*, *BZR1*, *MYB30*, *BAS1* i *SOB7*, essent el criteri per analitzar les línies indicades diferent segons el cas.

BRI1 és un receptor de BRs ubicat en la membrana plasmàtica, que quan uneix aquesta hormona desencadena les respostes moleculars i fisiològiques (Friedrichsen et al., 2000; Yin et al., 2005) (*figura Intro1.8*). La seva expressió, juntament amb la de *BAS1*, s'indueix ràpidament per ombra simulada (Devlin et al., 2003; Tao et al., 2008), podent exercir com a punt d'unió en la senyalització per ambdues vies. Mitjançant anàlisis genètiques han estat descrits *BAS1* i *SOB7* (gen homòleg de *BAS1*), gens que codifiquen enzims implicats en el metabolisme dels BRs, com a elements que relacionen el metabolisme de BRs i la senyalització per llum en el procés de la desetiolació de la plàntula mediada per diferents fotoreceptors (Turk et al., 2005). Per una altra banda, anàlisis bioquímiques i moleculars de *BES1* i *MYB30* han demostrat que presenten un paper com a reguladors directes de l'expressió de *SAUR15* (Goda et al., 2004; Li and Deng, 2005; Li et al., 2009), estudiat al capítol I d'aquesta tesi. Actuant en una branca de senyalització diferent a *BES1* en la ruta de senyalització dels BRs, s'ha descrit *BZR1*, el qual codifica per una proteïna estructural i funcionalment relacionada (He et al., 2005; Wang et al., 2002; Yin et al., 2005) (*figura Intro1.8*). A més, mitjançant anàlisis bioquímics i genòmics, s'ha descrit que la proteïna *BZR1* s'uneix al promotor de *SAUR15* i que la seva expressió està alterada en el mutant *bzr1-D* (Sun et al., 2010).

En aquest capítol de la tesi s'ha analitzat la resposta a tractaments d'ombra simulada dels diferents mutants de BRs indicats anteriorment amb la finalitat de discernir si tenen un paper en la senyalització de la SAS, podent proposar-los com a possibles elements integradors d'ambdós tipus de respostes. En alguns d'aquests mutants també s'ha estudiat la resposta dels hipocòtils a l'aplicació exògena d'hormones vegetals per tal de veure si la capacitat de resposta a aquest estímul havia estat afectada. Aquest punt és important per poder discernir si la resposta als tractaments d'ombra simulada podria venir donada per una alteració en la sensibilitat hormonal dels mutants estudiats.

2.1.1. BRI1

Disposàvem de línies de sobreexpressió constitutiva de *BRI1*, generades pel grup de Joanne Chory (Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, California, EE.UU.) i cedides pel laboratori d'Ana Caño (CRAG). El fenotip d'aquestes línies es caracteritza per presentar els hipocòtils i els pecíols foliars més llargs que el wt (Friedrichsen et al., 2000; Hu et al., 2001).

Es van sembrar llavors en un medi GM-0.5x seguint una distribució equidistant entre aquestes (densitat aproximada de 1,7 llavors per cm²), es van estratificar a 4°C de dos a cinc dies i es van posar a germinar en W contínua a 22°C. Transcorreguts dos dies, la meitat de les plaques es va transferir a llum W+FR i l'altra meitat es va mantenir en W durant cinc dies més. En dia set es van realitzar les fotografies per mesurar la llargada dels hipocòtils i dels cotilèdons (*figura R2.1 (a)*). En W, els mutants de sobreexpressió de BRI1 presenten els hipocòtils lleugerament més llargs que el control (*figura R2.1 (b)*), mentre que la longitud dels cotilèdons és la mateixa, resultats coincidents amb el que estava descrit (Friedrichsen et al., 2000; Hu et al., 2001). Sota el tractament d'ombra simulada les plàntules sobreexpressores presenten una elongació major dels hipocòtils que en condicions W, destacant una major d'elongació que la del wt en les mateixes condicions. L'anàlisi de variància de dues vies ens indica que els hipocòtils de les plàntules que sobreexpressen BRI1 responen a ombra simulada significativament més que els de les plàntules control ($p=0,0094$), suggerint que BRI1 intervé en les respostes SAS en quant a l'elongació de l'hipocòtil. La longitud dels cotilèdons sota W+FR en les plàntules sobreexpressores és més gran que en condicions W, però no presenta diferències significatives amb el comportament del wt.

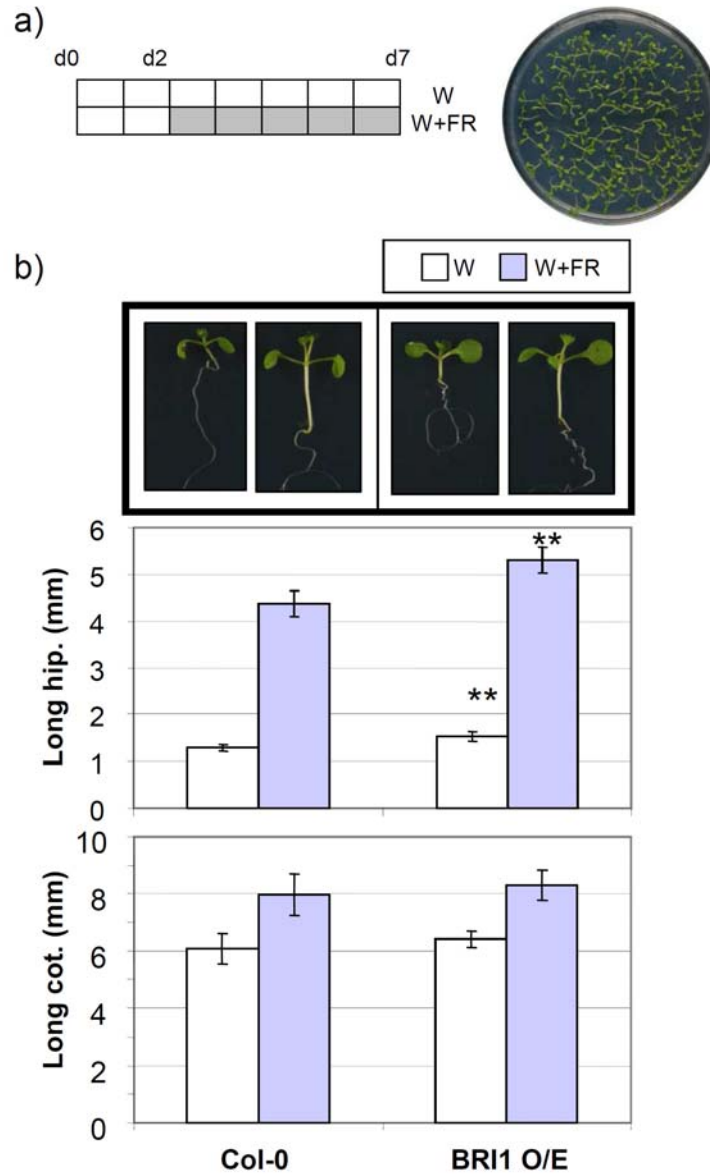


Figura R2.1. Esquema del tractament d'ombra simulada i fenotip de les línies sobreexpressores de *BRI1* en resposta a aquest estimul. (a) Es sementen plàntules en un medi GM-0.5x o MS1 seguint una distribució equidistant entre aquestes, s'estratifiquen a 4°C de dos a cinc dies i es creixen en W durant dos dies. Transcorregut aquest temps, la meitat de les plaques es transfereixen a llum W+FR i l'altra meitat es mantenen en W durant cinc dies més. En dia set es realitzen les fotografies per mesurar la llargada dels hipocòtils i dels cotilèdons. (b) Resposta de plàntules de les línies de sobreexpressió de *BRI1* al tractament d'ombra simulada. Les plàntules foren crescudes durant dos dies en W i llavors foren mantingudes en W (barres blanques) o transferides a W+FR (barres grises) durant cinc dies més. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils (hip.) i els cotilèdons (cot.) per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa amb el control corresponent creixent en les mateixes condicions (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

2.1.2. BES1

BES1 interactua amb BIM1, una factor de transcripció pertanyent a les bHLH, per unir sinèrgicament a les seqüències E-box que estan presents en molts promotors de gens induïts per BR, com *SAUR15* (Nemhauser et al., 2004; Yin et al., 2005).

El mutant ***bes1-D*** (de l'anglès *bri1-EMS-suppressor 1*) fou identificat com un mutant dominant supressor del mutant feble *bri1-119*. La fisiognomia de *bri1-119* es caracteritza per plàntules nanes verd fosques, amb pecíols curts i fulles epinàstiques i arrodonides. Fenotípicament, *bes1-D* mostra una resposta constitutiva a BR, incloent una completa supressió del fenotip nan de *bri1* en la foscor, resistència a l'inhibidor de la biosíntesi de BRs brassinazol (BRZ), elongació de la tija excessiva, senescència primerenca i una inducció de l'expressió gènica de gens induïts per BRs (Yin et al., 2002). En estadi de plàntula i creixent en W, *bes1-D* presenta un fenotip caracteritzat per tenir els pecíols més llargs i corbats i els cotilèdons recargolats (*figura R2.2 (a)*) (Yin et al., 2002). Aquest mutant conté una mutació monogènica dominant, ja que plàntules en heterozigosi mostren un fenotip similar a *bes1-D* però més feble, caracteritzada per presentar un sol canvi a la posició nucleotídica 698 relativa a l'inici de transcripció (T enlloc de C), mutació que causa un canvi d'una prolina a una leucina a la posició 233 (Yin et al., 2002). Aquest canvi provoca una estabilització de la proteïna i s'acumula en alts nivells en el mutant *bes1-D*. Aquest acúmul arriba a nivells més grans que el BES1 wt després de la inducció per BL, de manera que explica el perquè *bes1-D* suprimeix els fenotips nans de *bri1* i *bin2*, alhora que mostra un fenotip de resposta constitutiva a BRs (Yin et al., 2002).

Com el mutant *bes1-D* es va identificar originalment en l'ecotip *Enkheim-2 (En-2)*, per a les nostres anàlisis vam utilitzar la línia *bes1-Dbc7*, producte de la introgressió 7 vegades del mutant original amb l'ecotip Col-0, cedida pel laboratori d'Ana Caño (CRAG) (Gonzalez-Garcia et al., 2011).

Tractaments d'ombra simulada

Es van sembrar llavors en un medi GM-0.5x segons s'indica a l'apartat 2.1.1. (*figura R2.1 (a)*). En W, els hipocòtils de *bes1-Dbc7* no mostraven diferències significatives amb les plàntules control, mentre que en W+FR l'allargament dels hipocòtils del mutant era menor (*figura R2.2 (a)*). L'anàlisi de variància de dues vies ens mostrà una interacció significativa ($p \leq 0,0001$), és a dir, BES1 té un paper en les respostes SAS com a regulador negatiu.

Tractaments hormonals

Vam voler estudiar si aquesta línia presentava una capacitat de resposta diferent al control a l'aplicació exògena de diferents hormones tals com EBL, picloram o GA₃. Per dur-ho a terme es van sembrar llavors en un medi GM-0.5x enriquit o no amb les diferents concentracions d'hormones, seguint una distribució equidistant entre les plàntules, es van estratificar a 4°C de dos a cinc dies i es van créixer en W durant set dies. En dia set es van realitzar les fotografies per mesurar la llargada dels hipocòtils.

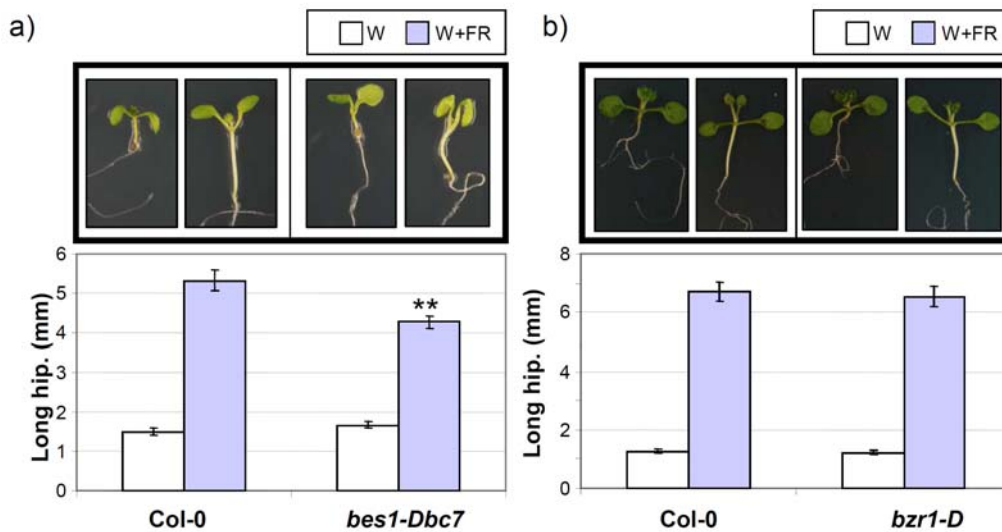


Figura R2.2. Fenotip de les línies *bes1-Dbc7* i *bzi1-D* en resposta a ombra simulada. Línies transgèniques *bes1-Dbc7* (a) i *bzi1-D* (b) foren crescudes i tractades tal i com s'indica a la figura R2.1. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa amb els controls corresponents creixent en les mateixes condicions (*P<0,05; **P<0,01).

BRs (EBL): El comportament de les plàntules control (Col-0) ens mostra que a major dosi d'hormona els hipocòtils presentaven una major elongació (figura R2.3 (a, b)). En absència d'hormona (0 µM d'EBL), els hipocòtils del mutant no presentaven diferències significatives amb el control, tal i com havíem vist anteriorment en el tractament de W (figura R2.2(a)). Tampoc hi havia diferència en l'allargament de l'hipocòtil quan la concentració d'EBL era de 1 µM, suggerint que aquesta dosis induïa el màxim allargament dels hipocòtils. Tanmateix, amb una dosi intermèdia (0,1 µM d'EBL) els hipocòtils *bes1-Dbc7* s'allargaven molt més que els del control, el que indicava un comportament diferencial entre el mutant i el wt. Aquest resultat suggereixen que les plàntules mutants són hipersensibles a aquesta hormona, i són consistents amb el paper descrit per a BES1 com a regulador positiu de la senyalització de BRs (Yin et al., 2002).

Auxines (picloram): A major dosi de picloram les plàntules control (Col-0) presentaven una major elongació de l'hipocòtil, malgrat que l'increment era menor que quan hi apliquem BRs (*figura R2.3 (c, d)*). En absència d'hormona (0 μ M de PIC), el comportament era el mateix descrit anteriorment. Sota dosis creixents de PIC (0,5 i 5 μ M), els hipocòtils de *bes1-Dbc7* eren clarament més llargs que els del control. Els nostres resultats suggereixen que BES1 té un paper com a regulador positiu de les respostes a auxines.

GAs (GA₃): Tal i com s'ha vist per l'aplicació exògena d'EBL i PIC, a major dosi de GA₃ les plàntules wt presentaven una major elongació de l'hipocòtil, malgrat que l'increment era baix (*figura R2.3 (e)*). Quan aplicàvem dues concentracions creixents de GA₃ (5 i 10 μ M), *bes1-Dbc7* presentava una major elongació de l'hipocòtil que el control, no detectant-se diferències entre ambdues dosis. Els nostres resultats suggereixen que *BES1* tindria un paper com a regulador positiu en quant a l'elongació de l'hipocòtil desencadenat per GAs.

2.1.3. BZR1

El gen *BZR1* és un regulador positiu de la via de senyalització de BRs que intervé tant en les respostes aigües avall de BRs com en la regulació de la biosíntesi de BRs. *BES1* i *BZR1* comparteixen un 88% d'identitat i presenten funcions possiblement redundants, malgrat els mutants d'ambdós gens tenen fenotips diferents quan són crescuts en W, suggerint que la seva funció biològica en el desenvolupament vegetal pot ser diferent enlloc de ser completament sobreposada (Wang et al., 2002).

El mutant *bzr1-D* (de l'anglès *brassinazole-resistant 1-1D*), identificat com a resistent a BRZ en un screening de llavors mutagenitzades amb EMS (de l'anglès *ethyl methane sulfonate*), té un fenotip semblant a *bes1-D* a la foscor, però un fenotip semi-nan en llum (Wang et al., 2002), fet que suggereix que aquests dos gens estan regulats diferencialment per la llum, ja sigui regulant els nivells o l'activitat d'aquests dos factors (Yin et al., 2002). En estadi de plàntula i creixent en W, *bzr1-D* presenta un fenotip caracteritzat per tenir una estatura reduïda, amb fulles més amples i d'una coloració verd fosca, amb pecíols més curts que el wt; i amb hipocòtils més curts que els controls quan són crescudes en diferents condicions lumíniques (W, FR, R i B) (Wang et al., 2002), suggerint una reducció de l'acció de BRs. Aquest mutant conté la mateixa mutació monogènica dominant que *BES1*, causant un canvi d'una prolina a una leucina a la posició 234 (Wang et al., 2002; Yin et al., 2002).

Disposàvem de línies *bzr1-D*, mutants de guany de funció del gen *BZR1*, en un fons genètic Col-0, amb les que varem realitzar experiments d'ombra simulada i hormonal, cedides pel laboratori d'Ana Caño (CRAG) (Gonzalez-Garcia et al., 2011).

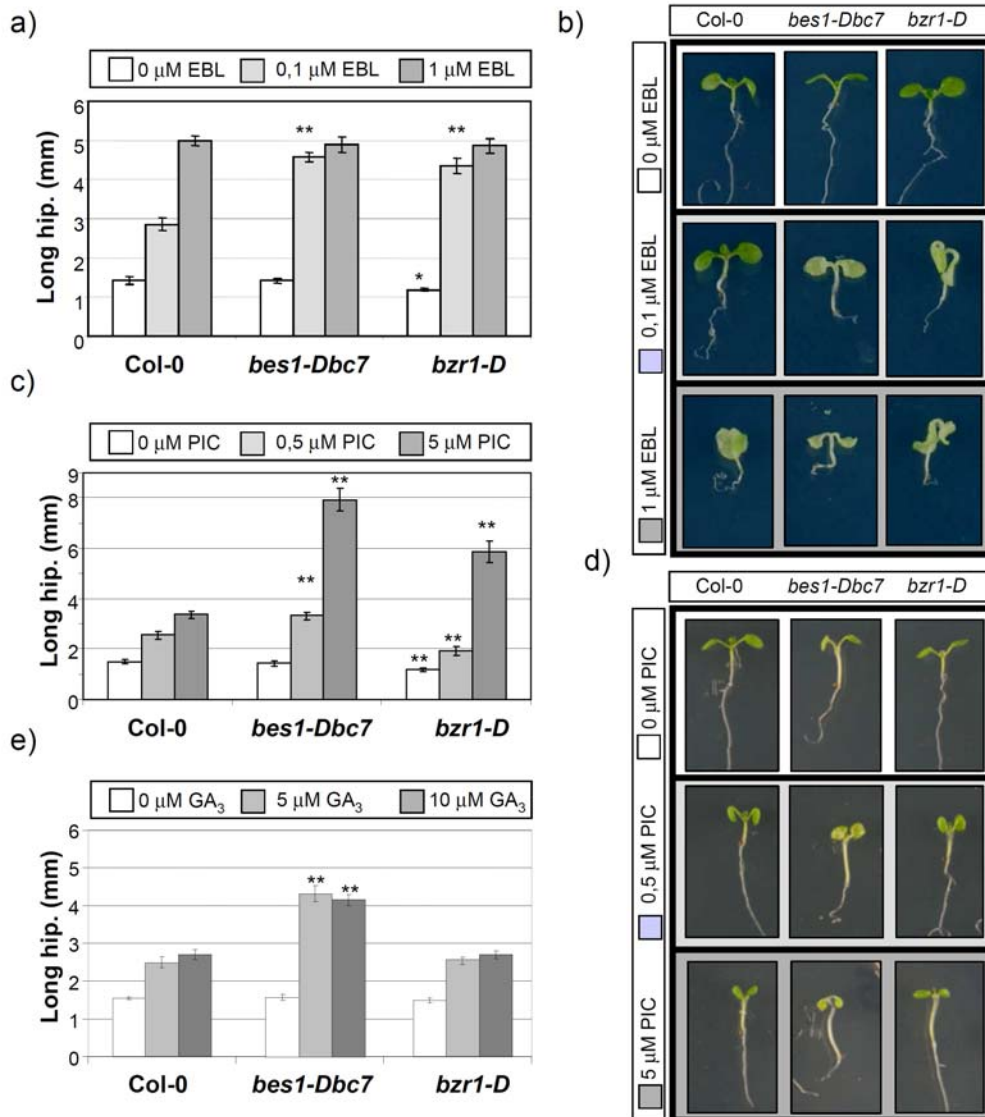


Figura R2.3. Fenotip de les línies *bes1-Dbc7* i *bzr1-D* en resposta a BRs, Aux i GAs. Línies transgèniques *bes1-Dbc7* i *bzr1-D* foren crescudes durant set dies en W en un medi en concentracions de 0 μM, 0,1 μM i 1 μM d'EBL (a), en 0 μM, 0,5 μM i 5 μM de PIC (c), o en 0 μM, 5 μM i 10 μM de GA₃ (e). Fotografies d'individus representatius sotmesos a les diferents concentracions d'EBL (b) o de PIC (d). Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa amb els controls corresponents creixent en les mateixes condicions (*P<0,05; **P<0,01).

Tractaments d'ombra simulada

Es van sembrar llavors en un medi GM-0.5x segons s'indica a l'apartat 2.1.1. (*figura R2.1 (a)*). En el tractament W i en el W+FR els hipocòtils de *bzr1-D* es comportaven igual que els controls (*figura R2.2 (b)*); tanmateix, cal remarcar que hi havia una tendència a que els hipocòtils de *bzr-1D* es mostressin lleugerament més curts en W que el wt (*figura R2.3 (a, c, e)*), fenotip consistent amb el descrit per altres autors (Wang et al., 2002). Els nostres resultats suggereixen que al contrari que BES1, BZR1 no estaria implicat en la regulació de les respostes de la SAS.

Tractaments hormonals

A continuació, vam voler estudiar l'allargament de l'hipocòtil d'aquesta línia a l'aplicació exògena de diferents hormones tals com EBL, picloram o GA₃, i comparar-lo amb el de plàntules wt. Per dur-ho a terme es va seguir el mateix procediment descrit per *BES1*, segons s'indica a l'apartat 2.1.2.

BRs (EBL): Els hipocòtils mutants *bzr1-D*, al igual que els wt, s'allargaven en resposta a l'aplicació exògena d'EBL (*figura R2.3 (a, b)*). En absència d'hormona (0 μM d'EBL), l'hipocòtil de *bzr-1D* era més curt que el wt, fenotip consistent amb el descrit per altres autors (Wang et al., 2002). Amb una dosi intermèdia (0,1 μM d'EBL) *bzr1-D* allargava molt més l'hipocòtil que el control, suggerint una hipersensibilitat a aquesta hormona en aquesta concentració, fet que permetia detectar un comportament diferencial entre el mutant i el wt, semblant al mostrat per *bes1-Dbc7*. Tanmateix, quan la concentració d'EBL era de 1 μM no hi havia diferència en l'allargament de l'hipocòtil del mutant en comparació al wt. Els nostres resultats foren consistents en el paper descrit per a BZR1 com a regulador positiu de la senyalització de BRs (Wang et al., 2002; Yin et al., 2005).

Auxines (picloram): Els hipocòtils mutants *bzr1-D*, al igual que els wt, s'allargaven en resposta a l'aplicació exògena de picloram (*figura R2.3 (c, d)*). Quan aplicàvem una dosi intermèdia d'auxines (0,5 μM de PIC) *bzr1-D* tenia una menor elongació de l'hipocòtil que el control. Per contra, observàvem un comportament oposat quan la dosi hormonal aplicada era major (5 μM de PIC) ja que *bzr1-D* tenia una major elongació que el wt. Aquesta hipersensibilitat observada en aquesta concentració de PIC era menor que la de *bes1-Dbc7*, suggerint un paper diferent per part dels dos gens en aquest tipus de resposta. Aquest comportament diferencial en funció de la dosi hormonal implica a BZR1 en la senyalització d'auxines.

GAs (GA₃): Els hipocòtils mutants *bzr1-D*, al igual que els wt, s'allargaven en resposta a l'aplicació exògena de GA₃ (*figura R2.3 (e)*). Les dues concentracions de GAs aplicades no permetien veure diferències significatives en l'allargament de l'hipocòtil entre el mutant i el wt. Els nostres resultats suggereixen que BZR1 no té un paper en la via de senyalització de GAs.

2.1.4. MYB30

MYB30 va ser identificat prèviament com a una diana directa de *BES1* a través de microarray i immunoprecipitació de cromatina (ChIP)(Li et al., 2009). Així mateix aquest gen codifica un factor de transcripció de la família MYB que funciona amplificant la senyal de BR ajudant a *BES1* a activar gens diana aigües avall. Els mutants de pèrdua de funció mostren una reducció de les respostes a BR i accentuen el fenotip nan de l'al·lel feble *bri1-5*. Molts gens regulats per BR tenen expressió reduïda i/o induïda per hormona en els mutants de *MYB30*, indicant que aquest gen funciona com a inductor de l'expressió d'un grup de gens diana de BR, com per exemple *SAUR15*(Li et al., 2009). *MYB30* i *BES1* s'uneixen a un lloc conservat d'unió dels MYB (AACAAAC) i a elements E-box, respectivament, presents als promotors de gens que estan regulats alhora per BR i *MYB30*; a més a més, ambdós interaccionen *in vitro* i *in vivo* (Li et al., 2009).

Donat que *BES1* i *MYB30* actuen cooperativament per induir l'expressió gènica de gens diana de BR entre els quals es troba *SAUR15*, i tenint en compte que *BES1* ha estat identificat com a un element regulador negatiu de la SAS (apartat 2.1.2), vam voler estudiar si *MYB30* també presentava un paper en aquest tipus de respostes.

Es van demanar al Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) dues línies mutants de pèrdua de funció de *MYB30*, anomenades *myb30-1* (SALK_122884) i *myb30-2* (SALK_027644), descrites i caracteritzades prèviament per altres autors (Li et al., 2009) (*figura R2.4 (a)*). Es van obtenir poblacions homocigotes d'ambdues línies, es van comprovar per genotipat dissenyant oligonucleòtids específics per detectar la inserció de T-DNA (MSO13 i MSO14 per *myb30-1* i MSO15 i MSO16 per *myb30-2*, *figura R2.4 (a)*) i es va analitzar el seu fenotip en experiments d'ombra simulada (dels quals només es mostrarà la línia *myb30-2* com a representativa).

Tractaments d'ombra simulada

Es van sembrar llavors en un medi GM-0.5x segons s'indica a l'apartat 2.1.1. (figura R2.1 (a)). En el tractament W i en el W+FR els hipocòtils de *myb30-2* es comporten igual que els controls (figura R2.4 (b)). Els nostres resultats suggereixen que MYB30 no estaria implicat per si sol en les respostes de la SAS.

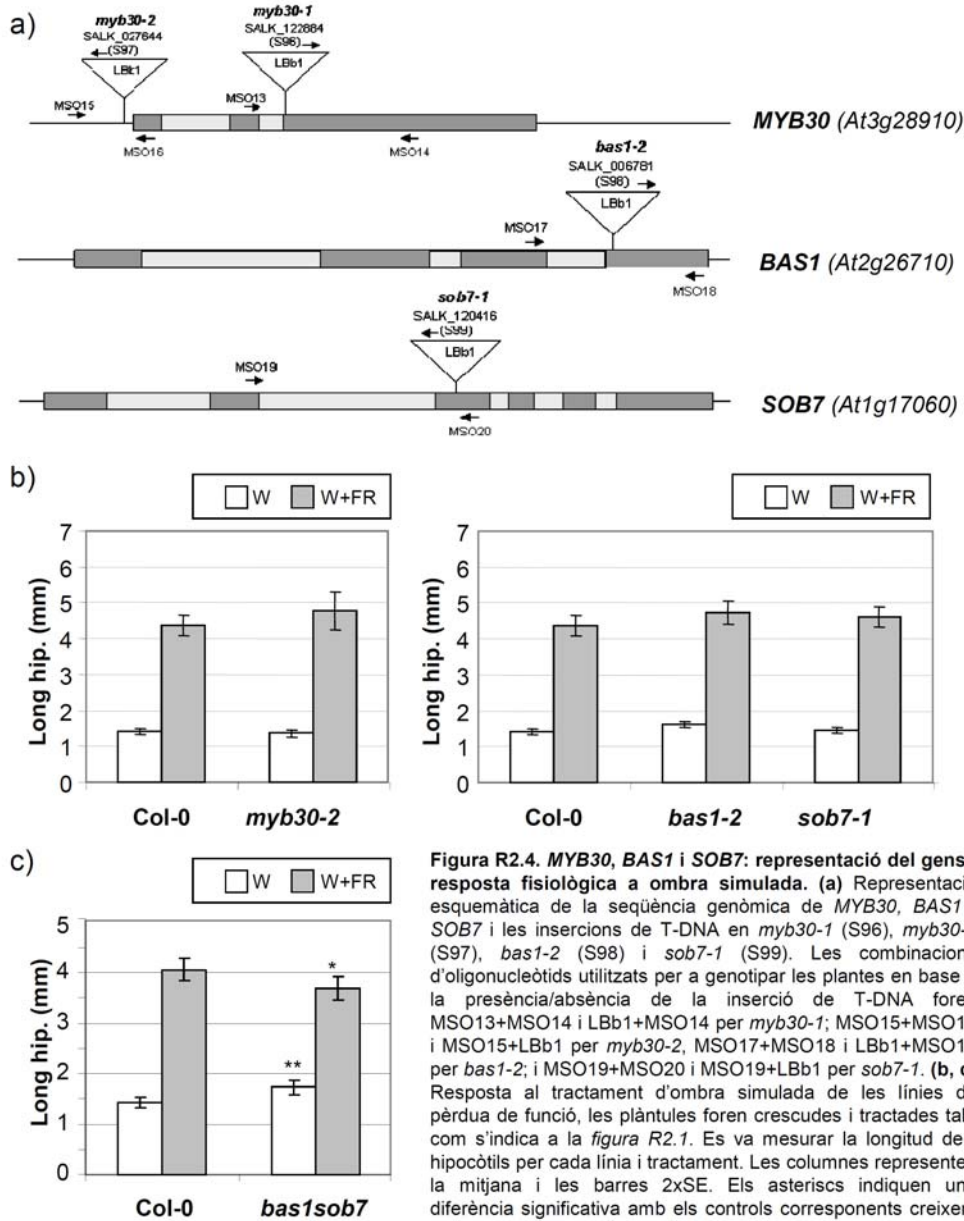


Figura R2.4. MYB30, BAS1 i SOB7: representació del gens i resposta fisiològica a ombra simulada. (a) Representació esquemàtica de la seqüència genòmica de MYB30, BAS1 i SOB7 i les insercions de T-DNA en *myb30-1* (S96), *myb30-2* (S97), *bas1-2* (S98) i *sob7-1* (S99). Les combinacions d'oligonucleòtids utilitzats per a genotipar les plantes en base a la presència/absència de la inserció de T-DNA foren MSO13+MSO14 i LbB1+MSO14 per *myb30-1*; MSO15+MSO16 i MSO15+LbB1 per *myb30-2*; MSO17+MSO18 i LbB1+MSO18 per *bas1-2*; i MSO19+MSO20 i MSO19+LbB1 per *sob7-1*. (b, c) Resposta al tractament d'ombra simulada de les línies de pèrdua de funció, les plàntules foren crescudes i tractades tal i com s'indica a la figura R2.1. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa amb els controls corresponents creixent en les mateixes condicions (*P<0.05; **P<0.01).

2.1.5. BAS1 i SOB7

BAS1 (CYP72B1) és un gen que codifica un enzim catalitzador de la inactivació de BRs, incrementant la velocitat de la hidroxilació del carboni 26 de brassinòlida i quedant aquest inactiu durant el desenvolupament de la plàntula -malgrat no es descarta que pugui actuar en precursors de la ruta de biosíntesi de BR- (Neff et al., 1999; Turk et al., 2003). Anàlisis fisiològics i genètics de la resposta de l'hipocòtil a l'aplicació exògena de BL i a diferents intensitats de llum blanca i monocromàtica suggereixen que *BAS1* és un modulador positiu de la fotomorfogènesi en *Arabidopsis*, inicialment a través de llum FR i en menor grau del B i R, en un model on una plàntula d'*Arabidopsis* en desenvolupament canvia de l'escotomorfogènesi a la llum en part per la ràpida modulació de la sensibilitat i dels nivells de BRs (Turk et al., 2003; Turk et al., 2005).

Funcionalment redundant a *BAS1* s'ha identificat *SOB7*, un gen supressor del *phyB-4* 7 (de l'anglès *suppressor of phyB-4 7*), que codifica pel citocrom P450 CYP72C1. Ambdós inactiven BRs i modulen la fotomorfogènesi. Malgrat ambdós codifiquen per monooxigenases citocroms P450s amb alta homologia de seqüència, sembla ser que tenen mecanismes únics per inactivar els BRs (Turk et al., 2005).

Donat que *BAS1* i *SOB7* poden funcionar en la inactivació de BRs, és possible que també puguin afectar de manera similar altres processos fisiològics en *Arabidopsis*. D'aquesta manera, la germinació, la SAS, el fototropisme i altres respostes relacionades amb la llum que requereixin canvis en l'expansió cel·lular amb elevats nivells de BRs actius, poden implicar l'acció d'aquests dos gens (Turk et al., 2005). Tenint en compte el paper d'ambdós gens en llum i en BRs principalment a través de la modulació de FR dels nivells de BRs (Neff et al., 1999), i amb l'objectiu d'identificar nous membres que connectin les respostes a ombra simulada i hormones, ens vam proposar estudiar una possible implicació en les respostes a la SAS d'aquests gens.

Es van demanar al NASC una línia mutant de pèrdua de funció de *BAS1* i una altra de *SOB7*, anomenades *bas1-2* (SALK_006781) i *sob7-1* (SALK_120416) (*figura R2.4 (a)*), descrites i caracteritzades prèviament per altres autors (Turk et al., 2005). Es van obtenir poblacions homocigotes d'ambdues línies, genotipant-les per PCR utilitzant oligonucleòtids específics (MSO17 i MSO18 per *bas1-2* i MSO19 i MSO20 per *sob7-1*), i es va analitzar el seu fenotip en experiments d'ombra simulada.

Tractaments d'ombra simulada

Es van sembrar llavors en un medi GM-0.5x segons s'indica a l'apartat 2.1.1. (*figura R2.1 (a)*). En el tractament W i en el W+FR els hipocòtils de *bas1-2* i de *sob7-1* es comportaven igual que els controls (*figura R2.4 (b)*). Els nostres resultats suggereixen que BAS1 i SOB7 semblen no tenir per si sols un paper en la regulació de les respostes de la SAS.

Està descrit que el doble mutant *bas1-2 sob7-1* (a partir d'ara *bas1sob7*) presenta una elongació de l'hipocòtil major que el control en condicions de W, indicant que BAS1 i SOB7 estan implicats en la resposta de l'hipocòtil en W, tot i que no són exclusius de les respostes a la llum. Aquest fet és degut segurament a l'habilitat reduïda d'inactivar BRs i a l'increment dels nivells actius de BRs (Turk et al., 2005). Donada la redundància gènica publicada, vam creuar les línies *bas1-2* i el *sob7-1* per obtenir el doble mutant per tal d'estudiar-ne la resposta a W+FR.

Es van sembrar llavors *bas1sob7* en un medi GM-0.5x segons s'indica a l'apartat 2.1.1. (*figura R2.1 (a)*). En condicions de W el mutant presentava un hipocòtil més llarg que el control (*figura R2.4 (c)*), mentre aquest era més curt en resposta al tractament W+FR que el Col-0. Aquests resultats, juntament amb l'anàlisi de variància de dues vies, ens mostren una implicació dels dos gens en el control de les respostes a la llum, com a possibles reguladors positius d'aquestes.

2.2. Implicació d'auxines en respostes SAS: paper de MYB77

Les auxines són hormones vegetals clau pel desenvolupament vegetal, que regulen aspectes diversos tals com la l'expansió del cotilèdon i de la fulla, l'elongació de l'hipocòtil i de la tija i la dominància apical, processos típicament associats a la SAS. MYB77 és un nou factor de transcripció que s'ha implicat en les respostes a auxines perquè els mutants *knockout* presenten una atenuació de l'expressió de gens de respostes a auxines, tal com *SAUR15*, entre d'altres (Shin et al., 2007). MYB77 és capaç d'interaccionar in vitro amb factors de resposta a auxines (ARFs) a través del domini C terminal dels ARFs i el domini d'activació del MYB77 (Shin et al., 2007). Aquesta interacció entre MYB77 i ARFs per alterar la regulació de gens de resposta a auxines permet establir una connexió entre el creixement d'arrels laterals i el desenvolupament sota condicions ambientals canviants.

Tal com s'ha comentat, MYB77 s'ha descrit com un regulador de l'expressió de *SAUR15* (Shin et al., 2007), malgrat que no se sap si actua directament unint-se a seqüències reguladores del seu promotor. No obstant hem decidit incloure l'anàlisi del paper de *MYB77* (línies de sobreexpressió i de pèrdua de funció *myb77*), en la regulació de les respostes de la SAS.

2.2.1. MYB77

Es van demanar tres línies independents de sobreexpressió de *MYB77* al laboratori d'en Daniel P. Schachtman (Donald Danforth Plant Science Center, St. Louis, Missouri, EE.UU.) i es van anomenar DS1, DS2 i DS3. El fenotip publicat era de plàntules poc desenvolupades, amb arrels i tiges raquítiques, fenotip similar a plantes wt crescudes en altes concentracions d'auxines (Shin et al., 2007). Alhora es van demanar al NASC dues línies mutants de pèrdua de funció *myb77-1* (SALK_67655) i *myb77-2* (SALK_55373), prèviament descrites i caracteritzades pels mateixos autors (*figura R2.5 (a)*) (Shin et al., 2007). Es van obtenir poblacions homozigotes d'ambdues línies, genotipant-les per PCR utilitzant oligonucleòtids específics (MSO27 i MSO28 per *myb77-1* i MSO25 i MSO26 per *myb77-2*), i es va analitzar el seu fenotip en experiments d'ombra simulada.

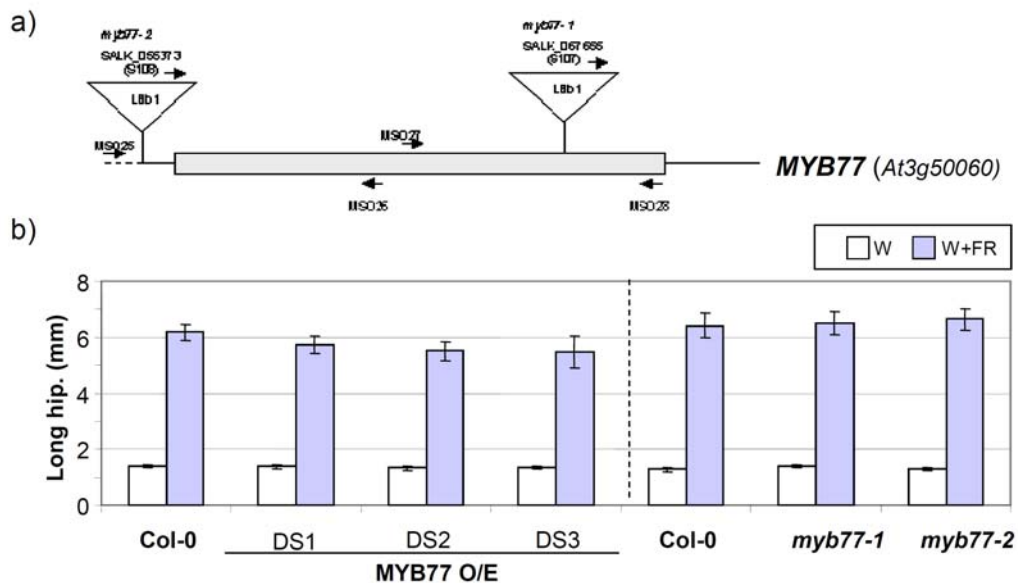


Figura R2.5. MYB77: Representació del gen i resposta fisiològica a ombra simulada. (a) Representació esquemàtica de la seqüència genòmica de *MYB77* i la inserció de T-DNA en *myb77-1* (S107) i *myb77-2* (S108). Les combinacions d'oligonucleòtids utilitzats per a genotipar les plantes en base a la presència/absència de la inserció de T-DNA foren MSO27+MSO28 i LBb1+MSO28 per *myb77-1* i MSO25+MSO26 i LBb1+MSO26 per *myb77-2*. (b) Resposta al tractament d'ombra simulada de tres línies de guany de funció 35S:MYB77 (DS1, DS2 i DS3) i de pèrdua de funció; les plàntules foren crescudes i tractades tal i com s'indica a la *figura R2.1*. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils i els cotiledons per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE.

Tractaments d'ombra simulada

Es van sembrar llavors en un medi GM-0.5x segons s'indica a l'apartat 2.1.1. (*figura R2.1 (a)*). En el tractament W les tres línies de sobreexpressió de *MYB77* no presentaven el fenotip descrit – una menor elongació de l'hipocòtil que Col-0 -, el que suggereix un possible silenciament del transgen, i per tant unes dades no fiables d'aquestes línies de sobreexpressió (DS1, DS2 i DS3). En quant a la pèrdua de funció de *MYB77*, en el tractament W i en el W+FR els hipocòtils de *myb77-1* i de *myb77-2* es comportaven igual que els controls (*figura R2.5 (b)*). Els nostres resultats suggereixen que *MYB77* sembla no tenir per si sol un paper en la regulació de les respostes de la SAS.

3

CAPÍTOL III

Capítol III: *ATHB4*

Malgrat l'abundant informació existent que implica l'acció hormonal en la regulació de les respostes SAS, alhora que l'ombra simulada ràpidament altera la sensibilitat a hormones (Roig-Villanova et al., 2007), el mecanisme molecular concret que connecta les xarxes transcripcionals modulades per hormones i iniciades per ombra roman bàsicament desconegut. La sobreexpressió d'*ATHB4*, un gen *PAR* diana directa de l'acció dels fitocroms (Roig-Villanova et al., 2006), afecta les respostes de les plàntules a ombra simulada i a hormones tals com BRs (Sorin et al., 2009), i és per això que vam procedir a profunditzar-ne l'estudi.

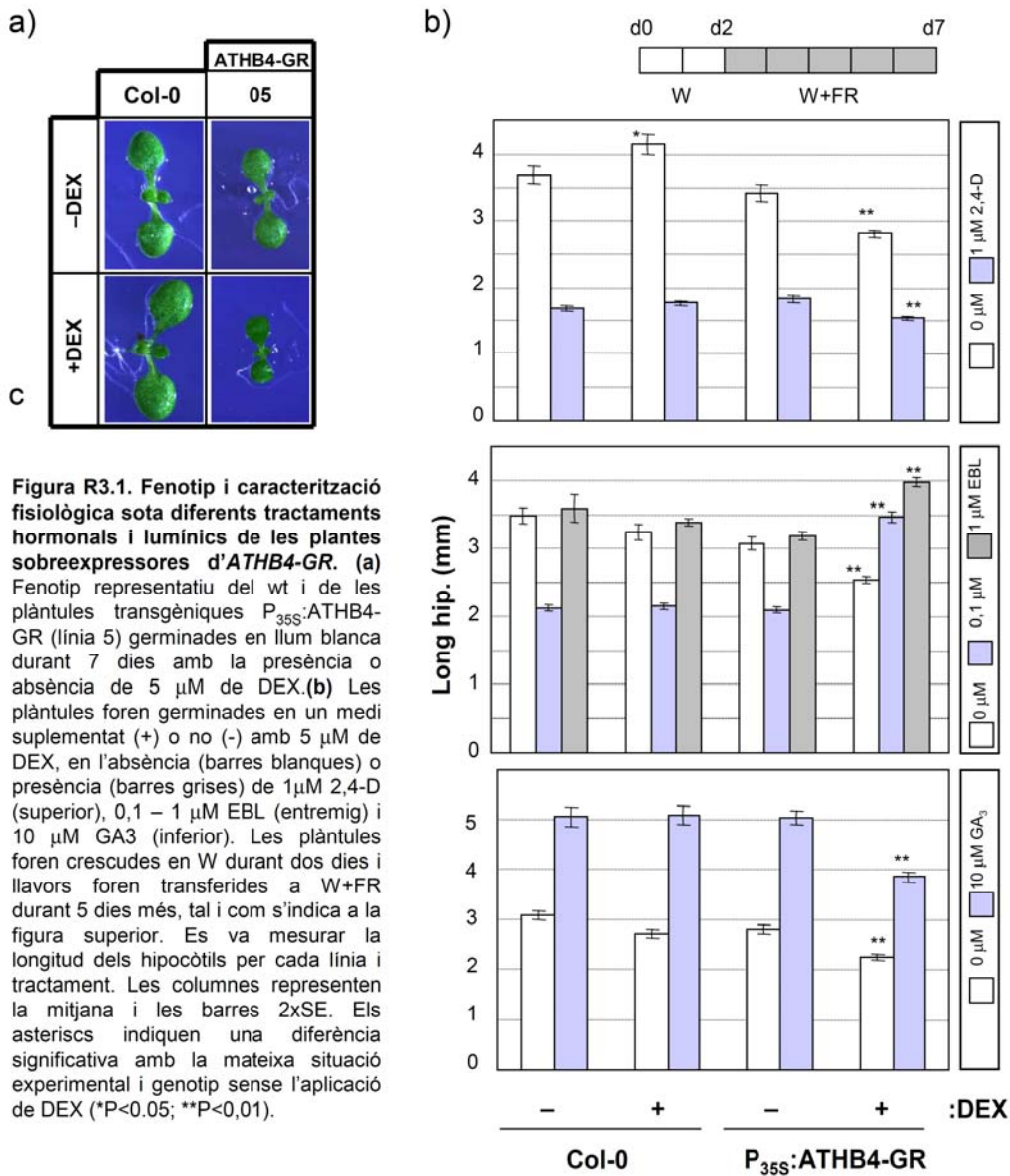
3.1. Sobreexpressió d'*ATHB4*

3.1.1. Caracterització fisiològica

Tal i com s'ha descrit a la introducció, es disposava d'una línia de sobreexpressió d'*ATHB4* d'activitat induïble, $P_{35S}:ATHB4-GR$ (*figura R3.1.(a)*), la qual va permetre comprovar el paper d'aquest gen com a modulador de la SAS, alhora que també s'ha relacionat l'activitat d'aquest gen amb hormones, especialment amb auxines i BRs (Sorin et al., 2009).

Per tal de poder analitzar una possible interacció entre ambdós factors, vam analitzar la resposta a tractaments amb aquestes hormones quan les plàntules Col-0 i de la línia transgènica $P_{35S}:ATHB4-GR$ creixien en condicions de W+FR en un medi MS1 (*figura R3.1.(b)*). En els diferents experiments realitzats, l'aplicació de DEX pràcticament no alterava la resposta d'allargament de l'hipocòtil de la línia Col-0. En canvi, l'aplicació de DEX alterava la resposta d'allargament de l'hipocòtil de la línia transgènica, que es descriuen a continuació. En absència d'hormones, l'aplicació de DEX atenuava l'efecte inductor sobre l'allargament de l'hipocòtil del tractament amb W+FR de les plàntules $P_{35S}:ATHB4-GR$ comparat amb les wt (*figura R3.1 (a)a*) d'acord amb les dades previes (Sorin et al., 2009). En absència de DEX, el tractament de plàntules wt i $P_{35S}:ATHB4-GR$ amb 2,4-D o d'EBL inhibia ($1\mu M$ 2,4-D, $0,1\mu M$ EBL) o no tenia cap efecte ($1\mu M$ EBL) en la inducció de l'elongació de l'hipocòtil, clarament en contrast amb l'efecte que que tenien aquestes hormones en el creixement de l'hipocòtil en W. Per contra, tractaments amb $10\mu M$ de GA_3 en les mateixes condicions produïen un increment en l'elongació de l'hipocòtil. Hipocòtils de plàntules transgèniques tractades amb DEX responien a 2,4-D i GA_3 reduint l'elongació de l'hipocòtil o bé a EBL incrementant l'elongació d'aquest (*figura R3.1.(b)*), tal i com s'havia observat prèviament en W (Sorin et al., 2009); essent destacable l'efecte de les GA_3 en comparació a W (Sorin et al., 2009). L'anàlisi de varianza de dues vies confirmava les

interaccions observades entre l'increment d'activitat d'ATHB4 i l'aplicació d'hormona (2,4-D, EBL i GA₃) en quant a l'elongació de l'hipocòtil. Aquests resultats, sumats als obtinguts prèviament en el grup, indiquen que un increment d'activitat d'ATHB4 altera específicament el nivell de resposta de l'hipocòtil a auxines, BRs i GAs sota condicions de W + FR.



3.1.2. Localització subcel·lular

Els diferents dominis o regions d'altres membres de la subfamília HD-Zip II han estat estudiats i s'hi ha identificat una regió N-terminal (Nt) conservada, el domini d'interacció al DNA (HD), el de dimerització (LZ) i una regió C-terminal (Ct) relacionada

amb l'estat redox (*figura R3.2*). A més, està descrit que la unió al DNA es duu a terme mitjançant una dimerització prèvia (Ariel et al., 2007; Ciabelli et al., 2008; Sessa et al., 1994; Tron et al., 2001). En aquesta tesi s'ha analitzat el paper d'aquestes regions en la localització nuclear d'ATHB4 i la capacitat d'unir DNA i d'homodimeritzar. Per complementar aquests resultats, la seva funció biològica en plantes és objecte d'estudi d'una altra tesi del grup. Amb l'objectiu de discernir funcions dels dominis o regions identificats, es van crear construccions amb diferents combinacions d'aquests (*figura R3.3*). Per esbrinar la localització subcel·lular d'ATHB4, i partint d'una construcció disponible al laboratori d'una proteïna de fusió amb ATHB4-GFP, es va procedir a fer un bombardeig sobre una monocapa de ceba per expressar de forma transitòria diferents construccions d'ATHB4 basades en els dominis descrits (*figura R3.3*).

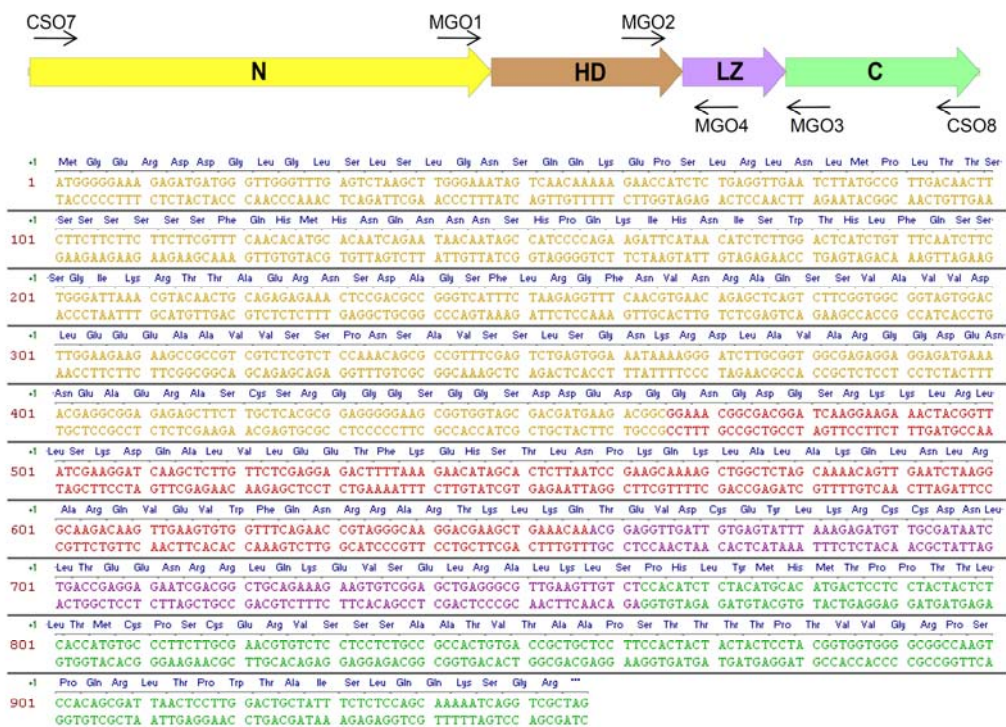


Figura R3.2. Seqüència de cDNA d'ATHB4 (957bp) amb els diferents dominis i regions identificats. Esquema d'ATHB4 on es mostren els diferents dominis o regions, indicats com a regió N terminal (N, en groc), domini HD (en rosat), domini LZ (en lila) i la regió C terminal (C, en verd). Els oligonucleòtids emprats per a crear les diferents construccions estan indicats amb fletxes a la figura superior.

Per homologia de seqüència amb *ATHB2*, un dels membres de la subfamília més estudiats, es van definir les diferents regions descrites a la *figura R3.2.*, i es va procedir a realitzar el clonatge per una posterior seqüenciació. Es disposava de CSO7 i CSO8 per amplificar els extrems Nt (directe) i Ct (reverse), respectivament, ambdós amb una diana BamHI als extrems. Es van dissenyar oligonucleòtids amb una diana

*Bam*HI per amplificar les regions HD (MGO1, directe; MGO4, reverse) i la regió LZ (MGO2, directe; MGO3, reverse) (figura R3.2), i es pren de motlle el cDNA d'ATHB4. Es van amplificar per PCR els fragments descrits a la figura R3.3, es van clonar en un vector PCR TOPO i es van seqüenciar. La diana *Bam*HI permetia clonar els fragments en marc de lectura amb el gen *GR* en un vector binari per a una posterior transformació en *Arabidopsis thaliana* per estudiar-ne la funció biològica, objecte d'estudi d'una altra tesi doctoral del grup.

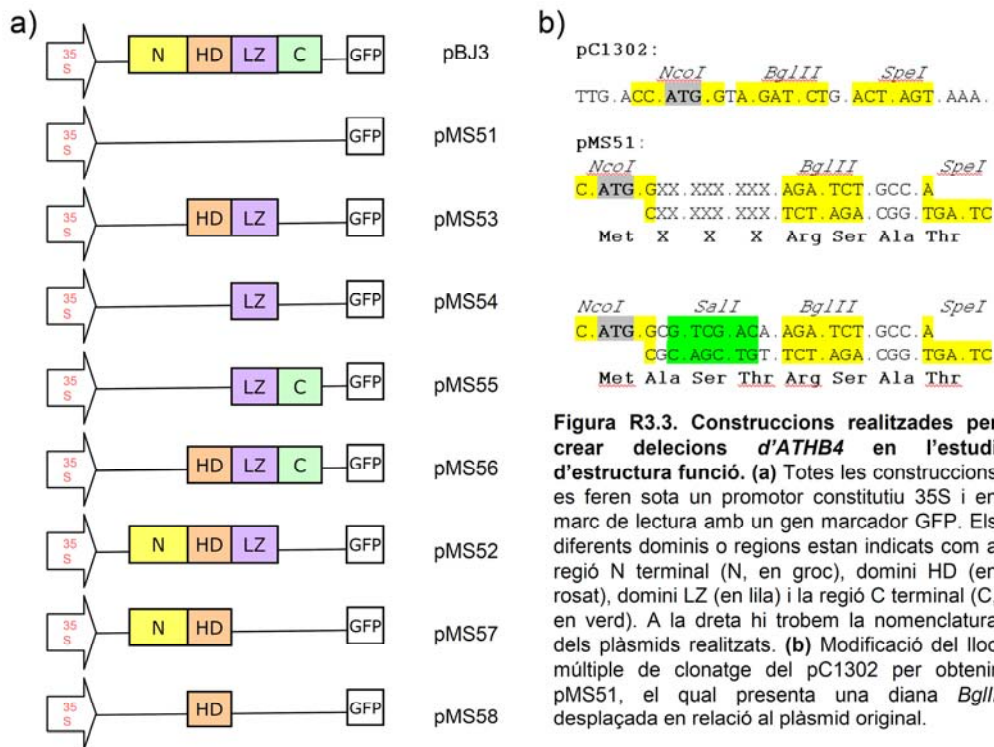


Figura R3.3. Construccions realitzades per crear deletions d'ATHB4 en l'estudi d'estructura funció. (a) Totes les construccions es feren sota un promotor constituïtiu 35S i en marc de lectura amb un gen marcador GFP. Els diferents dominis o regions estan indicats com a regió N terminal (N, en groc), domini HD (en rosat), domini LZ (en lila) i la regió C terminal (C, en verd). A la dreta hi trobem la nomenclatura dels plàsmids realitzats. **(b)** Modificació del lloc múltiple de clonatge del pC1302 per obtenir pMS51, el qual presenta una diana *Bgl*III desplaçada en relació al plàsmid original.

Per tal de poder-los clonar posteriorment en marc de lectura amb el gen reporter *GFP* que codifica la proteïna verda fluorescent (GFP), es va utilitzar el plàsmid *pCAMBIA1302*. Aquest plàsmid es caracteritza per presentar un promotor constituïtiu 35S i un terminador flanquejant el gen *GFP* ($P_{35S}:GFP$), els quals permeten la seva expressió transitòria dins d'una cèl·lula. Com a resultat es produeix la GFP. Es va modificar el lloc de clonatge múltiple (MCS) del *pCAMBIA1302* (pMS51), introduint-hi una diana *Bgl*III que permetia clonar tots els fragments de les diferents construccions d'ATHB4 en marc de lectura amb el gen *GFP* per crear les proteïnes de fusió pertinents. Es van dissenyar dos oligonucleòtids nous que inclogueren set parells de bases més entre la diana *Nco*I i *Bgl*III (figura R3.3 (b)), on s'hi va incloure una diana *Sall* per un futur clonatge en vectors de complementació bimolecular de fluorescència (*BiFC*, de l'anglès *bimolecular fluorescence complementation*). Aquest canvi permetia

clonar tots els fragments d'ATHB4 obtinguts prèviament digerits amb *BamHI* en marc de lectura amb la *GFP* del vector pMS51 digerit amb *BglII* i desfosforilat, ja que ambdues dianes de restricció presenten extrems compatibles.

S'obtingueren les construccions HL-GFP (pMS53), L-GFP (pMS54), LC-GFP (pMS55), HLC-GFP (pMS56), NHL-GFP (pMS52), NH-GFP (pMS57) i H-GFP (pMS58) (*figura R3.3 (a)*). Es comprovà cada construcció per digestió i es realitzà una midiprep per tal d'obtenir suficient DNA per realitzar un microbombardeig.

Per localitzar les cèl·lules transformades, es va utilitzar el plàsmid dsRed ($P_{35S}:RFP$), que permet la producció de la proteïna fluorescent vermella (RFP), que es localitza al nucli i al citoplasma de les cèl·lules. Mitjançant la transformació transitòria de cèl·lules de ceba amb tècniques de microbombardeig, amb la posterior visualització amb microscòpia confocal, es comprovà que aquelles cèl·lules que presentaven activitat RFP també mostraven fluorescència verda al nucli, que correspon a la proteïna de fusió ATHB4-GFP (*figura R3.4 (a)*). Aquest fet és consistent amb el fet que ATHB4 és un factor de transcripció, i que per ser actiu ha d'estar ubicat al nucli, alhora que observem el mateix comportament que altres factors de transcripció implicats en la SAS, tals com *PAR1*, que també es localitzen al mateix compartiment (Roig-Villanova et al., 2007). Desconeixem, però, quina part de la proteïna ATHB4 conté els determinants de la seva localització nuclear, que probablement resideix en regions o dominis concrets de la proteïna, tal com s'ha demostrat al nostre grup per a altres proteïnes nuclears com *PAR1* (Galstyan et al., 2012; Galstyan et al., 2011).

Mitjançant el microbombardeig amb pistola gènica es comprovà que la proteïna GFP sola (pMS51) presentava distribució citoplasmàtica i nuclear dins la cèl·lula, en clar contrast amb la distribució nuclear observada per a la proteïna de fusió ATHB4-GFP (*figura R3.4.(a, b)*).

Les construccions L-GFP i LC-GFP foren les úniques que presentaren distribució citoplasmàtica i nuclear, semblant a la de la GFP sola (plàsmid buit control pMS51) (*figura R3.4.(d, e)*). La resta de construccions (NHL-GFP, HL-GFP, HLC-GFP, NH-GFP i H-GFP) es localitzaren al nucli (*figura R3.4.(c, f, g, h, i)*), coincidint amb el que s'havia observat per a la proteïna sencera ATHB4-GFP.

Donat que totes les construccions amb el domini HD presentaven localització nuclear, vam hipotetitzar que és en aquest domini on es presenta alguna senyal de localització

nuclear (NLS) (Palena et al., 2001). No obstant, no podem descartar la presència de NLSs en altres regions, com per exemple a la regio Nt, ja que cap de les construccions generades conté aquesta regió separada del domini HD.

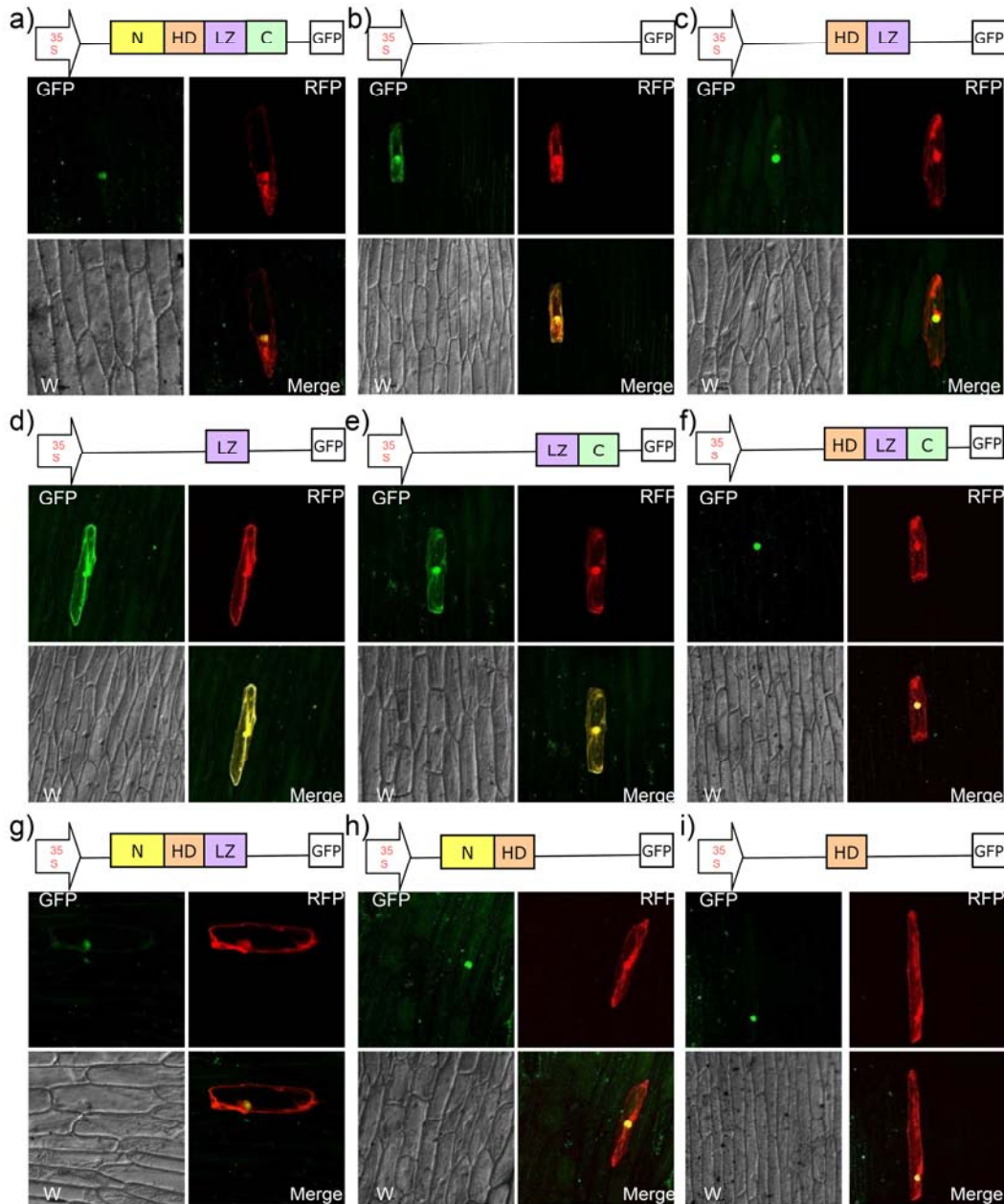


Figura R3.4. Localització subcel·lular de les diferents deletions d'ATHB4 en l'estudi d'estructura funció. Es transformà de manera transitòria les diferents construccions mitjançant bombardeig en cèl·lules de ceba i s'observà per microscopia confocal la localització cel·lular de cada constructe, on **(a)** Nt-HD-LZ-Ct; **(b)** control negatiu amb el plàsmid buit; **(c)** HD-LZ; **(d)** LZ; **(e)** LZ-Ct; **(f)** HD-LZ-Ct; **(g)** Nt-HD-LZ; **(h)** Nt-HD i **(i)** HD. A cada plafó s'hi representa al marge esquerra superior la GFP, al dret superior la RFP (control de bombardeig dsRed), a l'esquerra inferior el camp clar (W) i al dret inferior el solapament entre GFP i RFP, adquirint coloració groga quan el solapament de la senyal és màxim, de la mateixa manera que a la zona superior de cada grup d'imatges hi ha un esquema de la construcció corresponent.

3.1.3. Interacció proteïna – DNA

Per homologia amb altres membres de la família més ben estudiats, es va hipotetitzar que ATHB4 podria unir en forma de dímer la mateixa seqüència de DNA que ATHB1 o ATHB2 (Sessa et al., 1993, 1997; Sessa et al., 1998). És per això que es va produir proteïna ATHB4 per poder realitzar en un futur un EMSA contra la seqüència d'unió d'ATHB2.

3.1.3.1. Producció, purificació i detecció de la proteïna de fusió

Es va realitzar una proteïna de fusió emprant el tag GST. Per a la producció de GST-ATHB4 (pMS44) es va utilitzar com a vector el pGEX.4T.1 (Healthcare; 28-9545-49) digerit amb *EcoRI* i desfosforilat, lligat al cDNA d'ATHB4 digerit amb *EcoRI* per mantenir el marc de lectura. Com a control s'utilitzà un plasmid creat prèviament al laboratori (pJF266) que permet l'expressió de proteïna de fusió GST-His_{6x}, la qual s'indueix a les 2 i a les 4 h de l'aplicació de l'inductor IPTG (*figura R3.5.(a)*). Les construccions es van transformar en la soca d'*E. coli* TOP10 i es van comprovar per PCR i digestió (dades no mostrades). Les construccions escollides (pMS44.4) es van transformar a la soca d'*E. coli* BL21 pGROE (Healthcare), que es caracteritza per tenir una xaperona constitutiva. Es procedí a fer un cultiu a petita escala (3ml), on s'agafà mostra (tres rèpliques) a les 0h, 2h i 4h després d'haver-hi afegit l'inductor IPTG. Aquestes mostres es van resuspendre en tampó de càrrega, es van desnaturalitzar per calor i les proteïnes es van separar en un gel de poliacrilamida del 12%. Posteriorment es realitzà una tinció Coomassie i es va detectar la presència de la proteïna de fusió resultant, la qual tenia una massa molecular calculada d'aproximadament 61 kDa, a les 2 i a les 4h de la inducció (*figura R3.5.(a)*).

Es va procedir a fer la producció a gran escala (200ml), seguit d'una purificació i una tinció Coomassie per detectar-la (*figura R3.5.(b)*). S'agafà mostra a temps 0h i 4h després de la inducció amb IPTG, es centrifugaren les mostres i es resuspengué el pellet en un tampó de lisi amb inhibidors de proteases. Per a la purificació es sonicà la mostra i es centrifugà, separant la fase insoluble (P) de la soluble (Sol). A la fase soluble hi vam afegir la resina i es va mantenir en agitació orbital 1:30h. Després es separà la fase soluble (SAR, de l'anglès *soluble after resine*) de la insoluble, la qual es renta amb tampó d'unió (BB). Vam sedimentar per centrifugació, i de la fase soluble vam guardar-ne 1ml com a control (C1), mentre que la insoluble es va resuspendre de nou amb BB. Es va tornar a guardar 1ml de la fase soluble com a control (C2) i la fase insoluble es va resuspendre amb un tampó d'elució (EB), es va agitar en un orbital 10'

i es va centrifugar. La fase soluble és el primer eluït (E1); es procedeix a repetir el darrer procés amb el EB per obtenir l'E2 i l'E3.

Es quantificà amb un assaig Bradford, alhora que també es féu una estimació quantitativa amb el programa informàtic Multi-Gauge. Amb el primer mètode es quantificaren els eluïts E1 (0,619 µgr/µl), E2 (0,299 µgr/µl) i E3 (0,323 µgr/µl). Amb el segon mètode s'observà que la banda corresponent al tamany esperat representa un 9,13% del total de les bandes de proteïna de l'extracte detectades. Aquesta banda es troba tant després de 4h d'inducció, com en els eluïts, però no està present a temps 0h (*figura R3.5*).

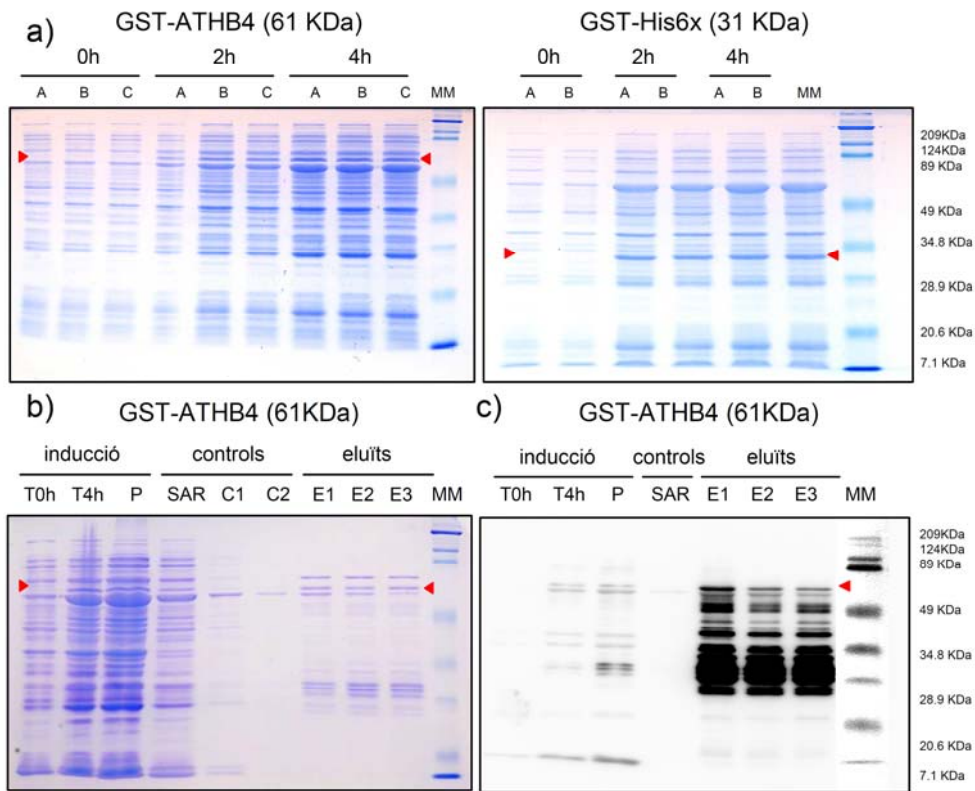


Figura R3.5. Producció, purificació i detecció de la proteïna de fusió GST-ATHB4. (a) Tinció Coomassie de la producció a petita escala de la proteïna de fusió, a les 0, 2 i 4h d'inducció amb tres rèpliques (A, B, C). Les fletxes vermelles assenyalen la banda corresponent a GST-ATHB4. En el plafó de la dreta es mostra la producció d'una proteïna de fusió control amb els tags GST-His_{6x}. (b) Tinció Coomassie de la producció a gran escala de la proteïna de fusió, a temps 0h (T0h) i amb una inducció de 4h (T4h). Es mostren el pellet (P), el SAR (sobrenedant després de la resina), els controls (C1, C2) corresponents a la fase soluble abans d'aplicar-hi el tampó d'elució i els eluïts de T4h (E, E2, E3), així com la marca de les fletxes vermelles. (c) Western amb un anticòs primari contra la GST per detectar la presència de GST-ATHB4, amb les mostres obtingudes al cultiu a gran escala.

Per assegurar-nos de que la banda identificada corresponia a la proteïna de fusió es va realitzar un Western, utilitzant un anticòs primari -de conill- específic contra la GST

(Healthcare AntiGST; 27457701V) (*figura R3.5(c)*). Es revelaren les proteïnes per quimioluminiscència amb un anticòs secundari -contra conill- conjugat amb una peroxidasa de rave (Pierce antirabbit; 1858415), que trenca el reactiu quimioluminiscent ECL (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Pierce; 34095) i emet llum. El marcatge va revelar la presència de la proteïna, malgrat es van detectar altres bandes corresponents a formes truncades de la proteïna de fusió GST-ATHB4 i cert soroll de fons (*figura R3.5 (c)*).

Aquests resultats ens indiquem que hem pogut produir a gran escala i purificar la proteïna de fusió GST-ATHB4 en un sistema d'*E.coli*, per a posteriors estudis l'objectiu dels quals és determinar la interacció d'ATHB4 amb seqüències concretes de DNA.

3.1.4. Interacció proteïna – proteïna

Els possibles dominis funcionals d'ATHB4 identificats (apartat 3.1.2.), juntament amb anàlisis d'unió de les proteïnes de la mateixa família publicats, indiquen que el domini LZ està involucrat en les interaccions proteïna-proteïna entre proteïnes de la família HD-Zip, necessàries per una correcta unió al DNA (Ciarbelli et al., 2008). Per testar la hipòtesi de la dimerització d'ATHB4 amb si mateixa a través d'aquest domini (homodimerització), es van realitzar estudis *in vivo* amb el sistema del doble híbrid de llevat (Y2H, de l' anglès *yeast two hybrid*).

3.1.4.1. Estudi de doble híbrid de llevat

3.1.4.1.1. Homodimerització d'ATHB4

La regió sencera codificant d'ATHB4 es subclonà en marc de lectura en els vectors de Y2H pGBKT7 i PGADT7, per generar pMS31 i pMS30, respectivament. En el llevat, aquests plàsmids expressen proteïnes de fusió (híbrides) d'ATHB4 fusionat o bé al domini d'unió al DNA de GAL4 (pMS31, BD-ATHB4) o bé al domini d'activació transcripcional de GAL4 (pMS30, AD-ATHB4). La soca AH109 de llevats es va co-transformar amb els plàsmids derivats dels pGBKT7 i pGADT7, que confereixen la capacitat de síntesi de Leucina (Leu, L) i Triptòfan (Trp, T) respectivament. Les cèl·lules de llevat cotransformades creixen en un medi mínim (SD) on hi manca Leu i Trp (anomenat SD-LT). Després, les colònies transformades foren utilitzades per veure si hi havia interacció en un assaig de creixement. Aquest assaig reflecteix la interacció entre dues proteïnes híbrides que quan interaccionen es transcriuen dos gens reporters, els quals confereixen capacitat de síntesi d'Adenina (Ade, A) i Histidina (His, H). Com a conseqüència, només quan les dues proteïnes híbrides interaccionen, les cèl·lules de llevat són capaces de créixer en un medi mínim on hi manca Ade, His, Leu

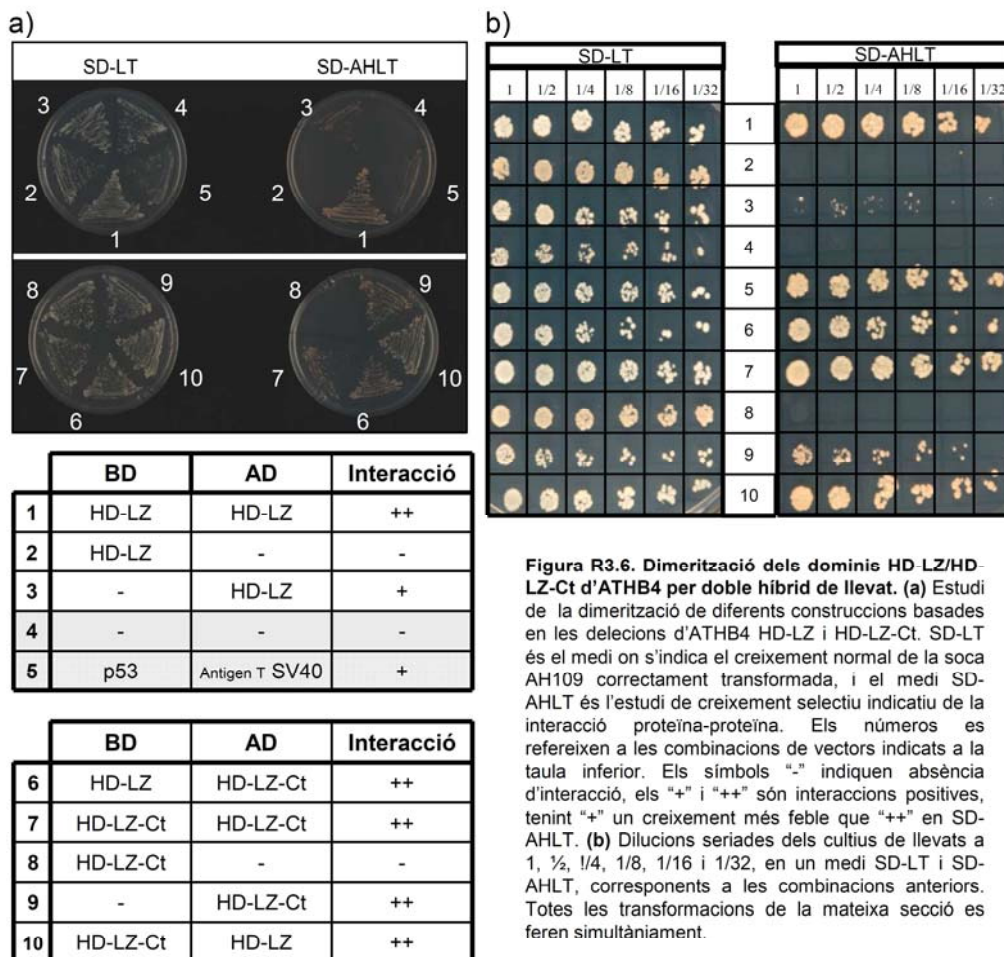
i Trp (SD-AHLT), tal i com està descrit per proteïnes de les quals es coneix la seva interacció tals com murine p53 i l'antigen T SV40 (utilitzades com a control positiu (+) en els experiments, *figura R3.6.*; combinació 5). En un assaig de creixement les cèl·lules transformades, identificades per la seva capacitat de créixer en medi SD-LT, es repicaven consecutivament en un medi SD-AHLT i després en un medi SD-LT, per assajar la interacció proteïna-proteïna i com a control, respectivament. Per assegurar-nos que l'activació de la transcripció de gens reporters era depenent de la interacció entre les dues proteïnes híbrides, BD-ATHB4 i AD-ATHB4 foren provades contra els vectors buits corresponents com a controls.

En els estudis de creixement, no es va observar cap creixement als controls BD/AD-ATHB4 ni en BD-ATHB4/AD, alhora que tampoc s'observà creixement en BD-ATHB4/AD-ATHB4 en un medi SD-AHLT, però sí en el control positiu (dades no mostrades). Donat que aquesta tècnica pot donar falsos negatius segons la conformació, per manca d'expressió i/o per absència de modificacions postraduccionals de les proteïnes híbrides en llevat (per exemple una manca de fosforilació en residus concrets que afecti la interacció entre les proteïnes híbrides), vam procedir a treballar amb construccions que contenen els dominis HD-LZ de la proteïna ATHB4, descrits com a implicats en la dimerització en altres membres de la família (Sessa et al., 1993; Sessa et al., JMB 1997), incloent-hi o no la regió Ct (HD-LZ-Ct i HD-LZ).

La regió codificant dels dominis HLC d'ATHB4 s'amplificà a partir del cDNA del gen sencer i es subclonà en marc de lectura en els vectors de Y2H pGBKT7 i PGADT7, per generar BD-HLC (pMS40) i AD-HLC (pMS38), respectivament. Alhora la regió codificant pels dominis HL d'ATHB4 també es clonà de la mateixa forma obtenint BD-HL (pMS39) i AD-HL (pMS37).

En els estudis de creixement, no es va observar cap creixement als controls que només expressaven aquestes formes truncades fusionades al BD (BD-HLC/AD, combinació 8; i BD-HL/AD, combinació 2) (*figura R3.6 (a)*), similar als cotransformats amb els vectors buits BD/AD (combinació 4); tanmateix sí que hi havia creixement en les combinacions control on els dominis d'ATHB4 estaven fusionats al domini d'activació AD (BD/AD-HL, combinació 9; i BD/AD-HL, combinació 3). En les diferents combinacions d'homodimerització assajades sí que hi havia creixement (BD-HLC/AD-HLC, combinació 7; BD-HL/AD-HL, combinació 1; BD-HLC/AD-HL, combinació 10; i BD-HL/AD-HLC, combinació 6; *figura R3.6*).

Aquest fet ens indica que proteïnes híbrides que contenen els dominis HL fusionats al AD poden accedir als promotors dels gens reporters i activar la seva transcripció, fet que dificulta la interpretació dels resultats. Un mètode alternatiu en aquests casos és el realitzar dilucions seriades en els medis de selecció (SD-AHLT i SD-LT) de les mateixes combinacions testades descrites al paràgraf anterior, per veure si podíem detectar creixement diferencial entre els controls autoactivables esmentats i les combinacions corresponents entre les proteïnes truncades derivades d'ATHB4. Es van créixer cultius líquids amb les combinacions esmentades, es van fer dilucions a 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 i 1/32, i es van créixer en placa en els mateixos medis de selecció.



En els cultius en medi SD-LT totes les concentracions cel·lulars testades de totes les combinacions generades formaven colònies de tamany semblant (*figura R3.6.(b)*). En canvi, en els cultius en medi SD-AHLT derivats de les concentracions cel·lulars més baixes (dilució 1/32), les colònies control on el AD està fusionat a qualsevol de les

dues construccions dels dominis d'ATHB4 (combinació 3 i 9) no creixien. Sí s'observà creixement en concentracions cel·lulars més altes (dilució 1/2), però el tamany de les colònies fou clarament més petit. Així doncs, en les mateixes condicions (SD-AHLT i major dilució) només vàrem veure creixement en el control positiu (combinació 5) i en les quatre combinacions entre les construccions realitzades (combinacions 1, 6, 7 i 10). Aquests resultats suggereixen que el domini HL d'ATHB4 és capaç d'homodimeritzar, similar al que ha estat descrit per altres membres de la família HD-Zip tals com *ATHB1* i *ATHB2*(Sessa et al., 1993).

Donat que els dominis HL sí que eren capaços de dimeritzar, ens vam plantejar la possibilitat que els dominis HL fusionats a BD o AD es poguessin unir a la proteïna ATHB4 sencera. En aquests experiments vam utilitzar la forma truncada HL (sense la regió C), ja que era la que mostrava menys activitat d'autoactivació en l'assaig de creixement utilitzat.

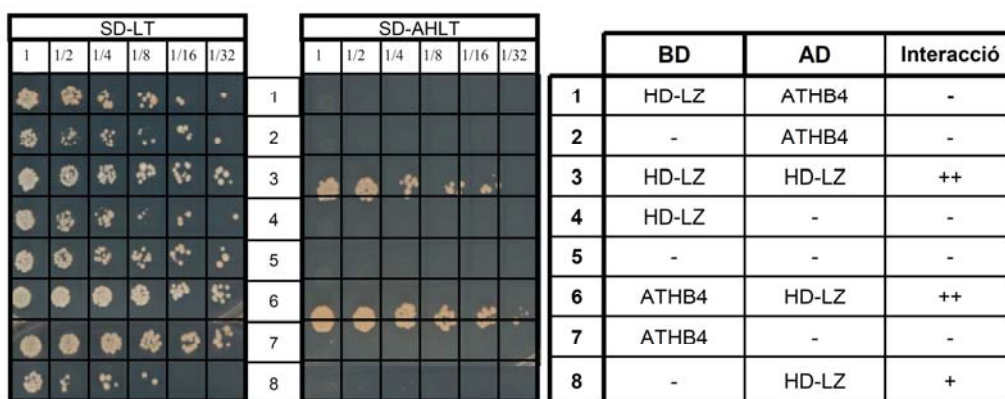


Figura R3.7. Dimerització dels dominis HD-LZ d'ATHB4 per doble híbrid de llevat amb ATHB4. Dilucions seriades dels cultius de llevats a 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 i 1/32 de l'estudi de la dimerització de la construcció basada en la deleció d'ATHB4 HD-LZ i ATHB4. SD-LT és el medi on s'indica el creixement normal de la soca AH109 correctament transformada, i el medi SD-AHLT és l'estudi de creixement selectiu indicatiu de la interacció proteïna-proteïna. Els números es refereixen a les combinacions de vectors indicats a la taula de la dreta. Els símbols "-" indiquen absència d'interacció, els "+" i "++" són interaccions positives, tenint "+" un creixement més feble que "++" en SD-AHLT. Totes les transformacions de la mateixa secció es feren simultàniament.

En les dilucions en medi restrictiu (SD-AHLT) no es va observar cap creixement als controls BD-HL/AD (combinació 4), BD-ATHB4/AD (combinació 7) ni en BD/AD-ATHB4 (combinació 2), comportament també observat en el control negatiu BD/AD (combinació 5) (figura R3.7 (a, b)). Sí vam detectar creixement al control BD-HL/AD-HL (combinació 3), utilitzada com a control positiu; i en la combinació BD/AD-HL (combinació 8) també vam detectar creixement, si bé en aquesta ocasió el tamany de les colònies era molt més petit (pràcticament no es veuen a la fotografia). Quan la proteïna ATHB4 sencera estava fusionada amb el BD, BD-ATHB4, i cotransformada amb AD-HL (combinació 6), sí hi havia creixement, indicant que la proteïna híbrida BD-

ATHB4 s'expressava a llevat i el seu plegament no impedia l'homodimerització amb la proteïna híbrida truncada AD-HL. Per contra, quan la proteïna sencera estava clonada amb el AD, AD-ATHB4, i es cotransformava amb BD-HL (combinació 1), no s'observava cap creixement. Aquest fet ens indica que és possible que AD-ATHB4 no s'expressi en llevats, o que sí ho faci però es plegui malament fet que impediria la dimerització.

Aquestes dades, que recolzen els resultats previs, mostren que el domini HL d'ATHB4 és capaç de dimeritzar amb ATHB4.

3.1.4.1.2. Heterodimerització d'ATHB4 amb altres proteïnes de la ruta dels BRs

Prèviament al grup es va descriure una estreta relació entre BRs i *ATHB4* (Sorin et al., 2009), i fou per aquest motiu que ens vam plantejar una possible interacció entre ATHB4 i dos membres de la ruta de senyalització de BRs, *BES1* i *BIM1*. Ambdós gens dimeritzen per activar directament l'expressió de *SAUR15* unint-se en *trans* a les seqüències E-box del seu promotor (Yin et al., 2005). *BIM1* pertany a la superfamília de factors de transcripció bHLH i *BES1* pertany a una nova família de factors de transcripció que mostra similitats estructurals amb les proteïnes bHLH.

ATHB4 és un regulador negatiu directe de SAUR15

Resultats previs del grup han demostrat que *PAR1*, un regulador negatiu de les respostes a la SAS, exerceix un paper com a regulador negatiu directe sobre l'expressió de *SAUR15* (Roig-Villanova et al., 2007). Tenint en compte que *ATHB4* també té un paper en les respostes a la SAS i sabent que regula negativament l'expressió de *SAUR15* (Sorin et al., 2009), vam plantejar-nos la hipòtesi d'una possible regulació negativa primerenca (directa) per part d'ATHB4, igual que PAR1, de manera que podria compartir un gen diana amb BES1 i BIM1, i aquests podrien ser uns possibles interactants.

Per estudiar aquesta hipòtesi, els nivells de transcrit de *SAUR15* van ser mesurats utilitzant la translocació nuclear d'ATHB4 per efecte de DEX en la línia P_{35S}:ATHB4-GR. Plàntules transgèniques foren sembrades en un medi GM-0,5x, estratificades a 4°C durant tres dies i transferides a llum blanca contínua durant set dies. Llavors es feren 4 tractaments diferents: en absència o presència de DEX (5 µM), i cadascuna d'aquestes en presència o absència de l'inhibidor de síntesi proteïca cicloheximida (CHX, 50 µM). Es realitzà una extracció de RNA, i una posterior RT-qPCR amb primers específics de *SAUR15* (BO33, BO34, figura R3.8). En absència de CHX,

l'addició de DEX redueix l'expressió de *SAUR15*, tal i com s'esperava (Sorin et al., 2009). En presència de CHX, l'expressió d'aquest gen es veu incrementada, tal i com estava descrit anteriorment (Zimmermann et al., 2004). La suma dels dos tractaments, CHX i DEX, reprimeix l'expressió de *SAUR15*. Aquests resultats mostren que la repressió de *SAUR15* dependent de DEX no requereix la síntesi de nova proteïna, consistent amb el fet que aquest gen és una diana directa de l'acció d'ATHB4.

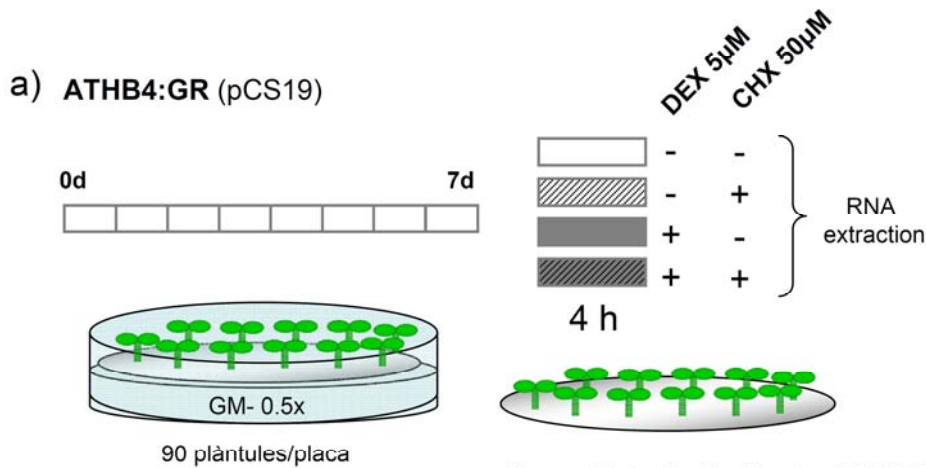
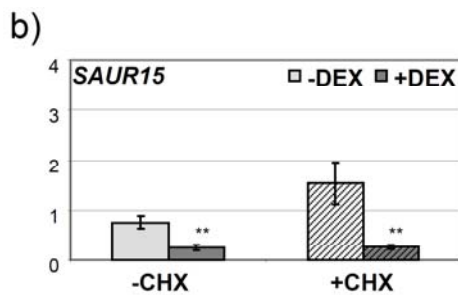


Figura R3.8. Acció directa d'ATHB4 sobre SAUR15. (a) Esquema del tractament aplicat, on plàntules crescudes durant set dies en W foren sotmeses 4h a 0 o 5µM de DEX i 0 o 50µM de CHX. (b) Abundància del transcrit de *SAUR15* en plàntules ATHB4:GR (pCS19), crescudes durant 7 dies en W, després de ser sotmeses als tractaments anteriorment descrits. Cada valor és la mitjana i la SE de tres rèpliques biològiques de qPCR normalitzades amb *UBQ10*. Els asteriscos mostren les diferències significatives amb el tractament 0µM DEX (*P<0.1, **P<0.05).



Connexió d'ATHB4 i la ruta de biosíntesi de BRs

Donat que ATHB4 reprimeix directament l'expressió de *SAUR15*, vam hipotetitzar que ATHB4 podria interactuar amb BIM1 o BES1 per regular l'expressió de *SAUR15*. Per dur a terme aquestes possibilitats, es van utilitzar estudis de Y2H amb les construccions prèviament creades per ATHB4, juntament amb d'altres disponibles al laboratori per BIM1 i BES1. Per minimitzar el volum de combinacions a nivell experimental, es va triar BD-HL com a la construcció representativa per ATHB4 (figura R3.9). Per BIM1 i BES1 es van utilitzar les construccions AD-BIM1 (pAG29) i AD-BES1 (pAG32), tenint en compte que la primera presenta certs nivells d'autoactivació (Galstyan, tesi 2011).

En els estudis de creixement, no es va observar cap creixement als controls BD-HL/AD (combinació 6) i BD/AD-BES1 (combinació 4), similar al control negatiu BD/AD (combinació 7) (*figura R3.9*). Sí vam detectar creixement en la cotransformació BD-HL/AD-HL (combinació 5), que fou inclosa com a control positiu, i en el control BD/AD-BIM1, però amb un baix creixement (combinació 2), confirmant el cert grau d'autoactivació. De les dues interaccions provades, només vam observar creixement en BD-HL/AD-BIM1 (combinació 1), mentre que BD-HL/AD-BES1 (combinació 3) no va donar cap colònia. Aquests resultats suggereixen que el domini HL d'ATHB4 és capaç d'heterodimeritzar amb BIM1 però no amb BES1, si bé no podem descartar que la proteïna híbrida AD-BES1 no s'expressés o es plegués incorrectament en el sistema de llevats.

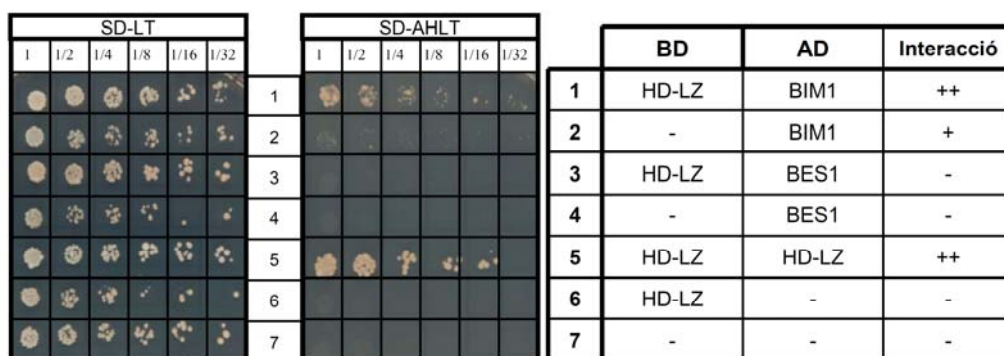


Figura R3.9. Dimerització dels dominis HD-LZ d'ATHB4 per doble híbrid de llevat amb BIM1 i BES1. Dilucions seriades dels cultius de llevats a 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 i 1/32 de l'estudi de la dimerització de la construcció basada en la deleció d'ATHB4 HD-LZ amb BIM1 i BES1. SD-LT és el medi on s'indica el creixement normal de la soca AH109 correctament transformada, i el medi SD-AHLT és l'estudi de creixement selectiu indicatiu de la interacció proteïna-proteïna. Els números es refereixen a les combinacions de vectors indicats a la taula de la dreta. Els símbols "-" indiquen absència d'interacció, els "+" i "++" són interaccions positives, tenint "+" un creixement més feble que "++" en SD-AHLT. Totes les transformacions de la mateixa secció es feren simultàniament.

3.2. Pèrdua de funció d'ATHB4

Per complementar l'estudi de la funció d'ATHB4, es van identificar dues línies SALK amb una inserció de T-DNA anomenades *athb4-1* i *athb4-2*, ambdues identificades com a mutants nuls i sense fenotip diferencial del wt (*figura R3.10.(a)*), suggerint una funció redundent d'aquest gen. Es van sembrar plàntules *athb4-1* i wt en un medi MS1 segons s'indica a l'apartat 2.1.1. per analitzar la seva resposta a ombra simulada (*figura R2.1 (a)*). Ambdues línies mostraven el mateix comportament (*figura R3.10*), tal i com havia estat descrit quan les plàntules creixien sense (Roig-Villanova, tesi 2007) o amb 1% (p/v) sucrosa al medi (Sorin et al., 2009). En aquesta secció es seguí utilitzant el medi MS1 enlloc de GM-0.5x amb l'objectiu de mantenir una coherència amb dades prèvies del paper d'ATHB4 o altres membres de la mateixa subfamília obtingudes al grup.

Anàlisis filogenètics publicats de tota la subfamília HD-ZipII mostren a *HAT3* i *ATHB4* com a paràlegs (figura R3.11 (a)) (Ariel et al., 2007; Ciarelli et al., 2008), essent l'expressió de *HAT3* també induïble per ombra simulada (Sorin et al., 2009). És per això que una línia mutant SALK de *HAT3*, amb inserció de T-DNA interrompent el HD, anomenada *hat3-1*, es va identificar i caracteritzar com a un mutant nul. Donat que

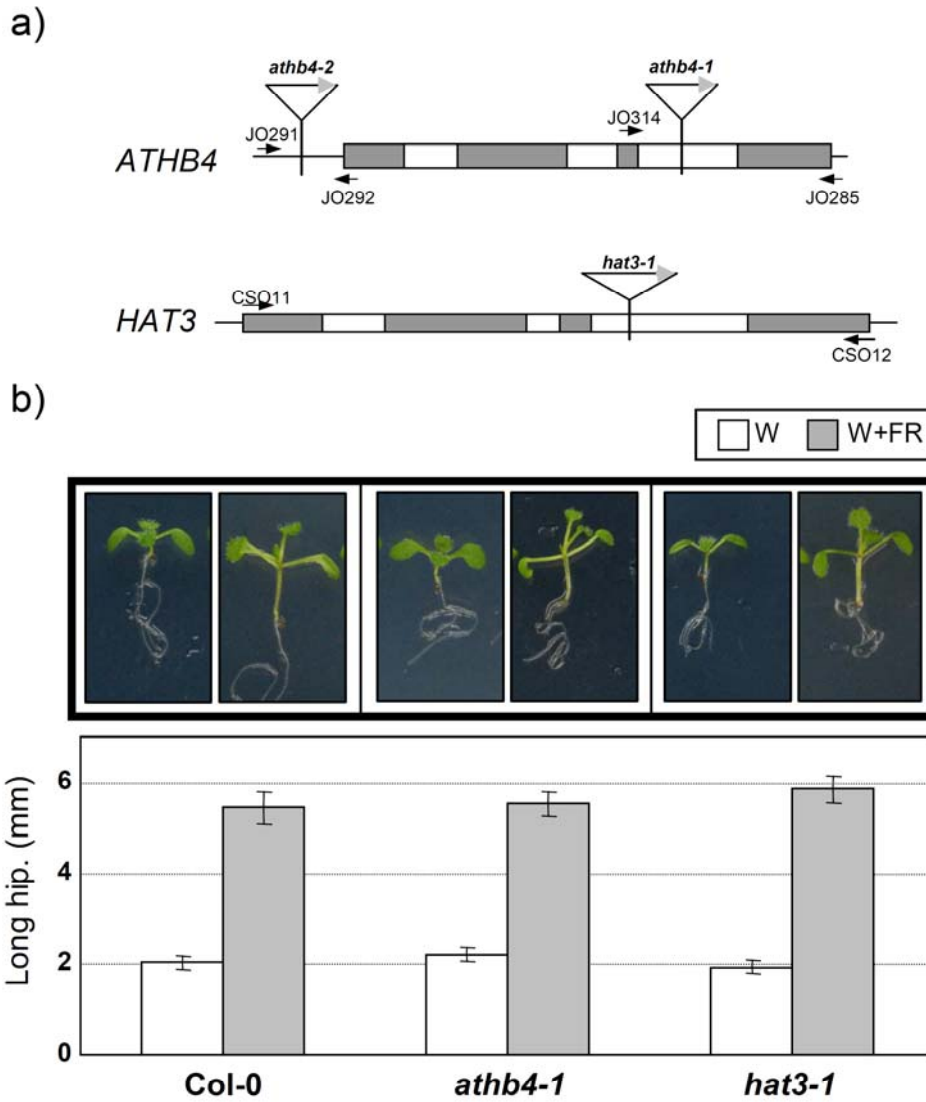


Figura R3.10. *ATHB4* i *HAT3*: representació del gens i resposta fisiològica a ombra simulada. (a) Representació esquemàtica de la seqüència genòmica de *ATHB4* i *HAT3* i les insercions de T-DNA en *athb4-1* i *hat3-1*. Les combinacions d'oligonucleòtids utilitzats per a genotipar les plantes en base a la presència/absència de la inserció de T-DNA foren JO314+JO285 i LBb1+JO385 per *athb4-1*; i CSO11+CSO12 i LBb1+CSO12 per *hat3-1*. (b) Resposta al tractament d'ombra simulada de les línies de pèrdua de funció, les plàntules foren crescudes i tractades tal i com s'indica a la figura R2.1. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa amb els controls corresponents creixent en les mateixes condicions (*P<0.05; **P<0,01).

tampoc presentava un fenotip diferencial en W ni en W+FR (*figura R3.10.(b)*), al laboratori es va procedir a obtenir el doble mutant *athb4-1 hat3-1* (*athb4hat3* a partir d'ara).

3.2.1. Caracterització fisiològica d'*athb4hat3*

Les plantes dobles mutants *athb4hat3* presentaven defectes en el desenvolupament al llarg de tot el cicle vital de la planta. En l'estadi de roseta basal, *athb4hat3* no presentava tantes fulles com el wt, i les que presentava tenien un limbe foliar més aviat lineal o recargolat en els extrems. Alhora, en planta adulta *athb4hat3* presentava alteracions en la fórmula floral, així com en la formació i desenvolupament de la silícula, esdevenint pràcticament estèril (*figura R3.11 (b-d)*). Les silíquies que arribava a formar presentaven una forma recargolada, i contenien molt poques llavors. A més, en condicions de W, les plàntules *athb4hat3* presentaven uns cotiledons lanceolats enlloc d'arrodonits tal com el wt (*figura R3.12.(a)*).

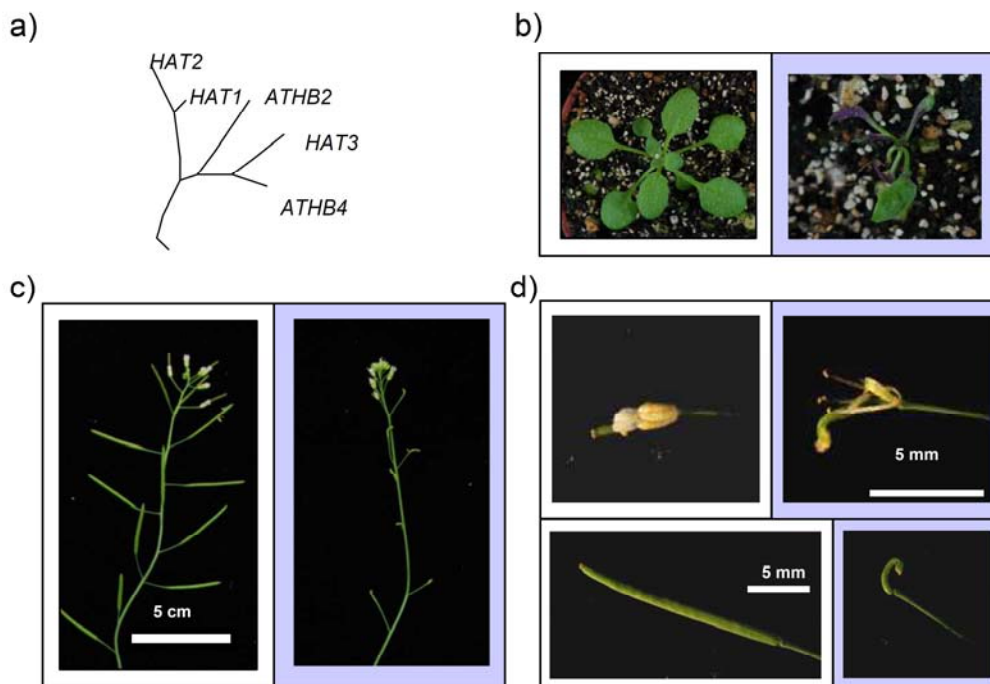


Figura R3.11. Fenotip del doble mutant de pèrdua de funció *athb4hat3* en diferents estadis de desenvolupament. (a) Arbre filogenètic on es mostra *ATHB4* i els quatre membres més propers (adaptat d'Ariel et. al, 2007). (b, c, d) Fenotip del Col-0 (quadre blanc) i del doble mutant *athb4hat3* (quadre gris) en l'estadi de roseta basal (b) i de planta adulta (c), així com un detall de les flors i silíquies (d).

Donat que es tractava d'un doble mutant pràcticament estèril, per tal de poder treballar amb plàntules *athb4hat3* es van mantenir poblacions mutants homozigotes *athb4* i segregants per *HAT3/hat3*. D'aquesta manera, ¼ part de la descendència eren dobles mutants fàcilment identificables pel fenotip. Fou amb aquesta població segregant que es va procedir a realitzar tots els experiments que es descriuran a continuació, a excepció dels descrits a l'apartat 3.2.1.3 i 3.2.1.4., on s'utilitzà directament llavors del doble mutant.

3.2.1.1. Tractament d'ombra simulada d'*athb4hat3*

a) Amb transferència de medi

Es van sembrar llavors en un medi MS1 i es van créixer en W durant tres dies fins que les plàntules *athb4hat3* foren identificables, i llavors sota condicions estèrils es transferiren plàntules mutants i control en plaques noves MS1. Una part es va mantenir en W i una altra es va transferir a W+FR durant 4 dies més, en dia 7 es van realitzar les fotografies per mesurar la llargada dels hipocòtils (*figura R3.12.(a)*). En W els hipocòtils d'*athb4hat3* no presentaven diferències significatives amb els controls; i quan aplicàvem el tractament d'ombra simulada els wt responien allargant l'hipocòtil, tal i com era d'esperar, mentre que les plàntules dobles mutants perdien aquesta capacitat de resposta.

Els cotiledons d'*athb4hat3* sota tractament W+FR presentaven epinàstia, així com un cert allargament longitudinal dels cotilèdons, indicant que aquestes plàntules no havien perdut la capacitat de respondre a l'ombra simulada (*figura R3.12.a*).

b) Sense transferència de medi

La manipulació exercida sobre les plàntules amb la transferència podia representar un possible artefacte sobre la capacitat de resposta de l'hipocòtil, de manera que vam procedir a fer el tractament d'ombra simulada estàndard del laboratori sense transferència, i mesurant després només els individus identificables com a *athb4hat3*. Es van sembrar llavors en un medi MS1 i es van créixer en W durant dos dies, i llavors part es va transferir a llum W+FR o es van mantenir en W durant 5 dies més, en dia 7 es van realitzar les fotografies per mesurar la llargada dels hipocòtils (*figura R3.12.(b)*). Els resultats foren molt semblants als obtinguts en l'apartat anterior, però en aquest cas les plàntules *athb4hat3* sí que podien allargar l'hipocòtil en resposta a ombra simulada, malgrat aquesta elongació fou molt menor a la del control, confirmant el paper redundat dels dos gens en les respostes a la SAS.

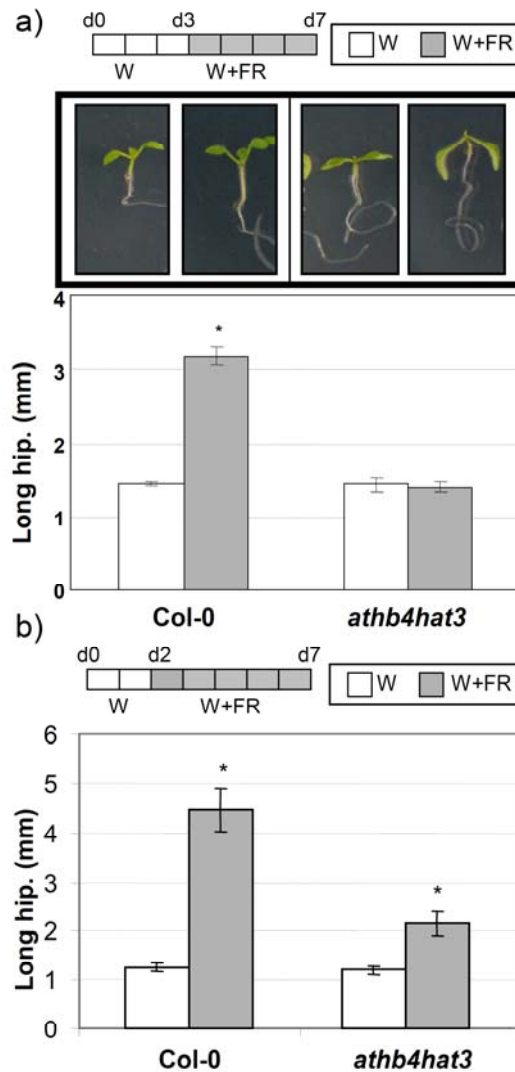


Figura R3.12. Fenotip de la línia *athb4hat3* en resposta a ombra simulada. (a) Línies transgèniques *athb4hat3* i Col-0 foren crescudes en MS1 durant tres dies en W i després es transferiren a noves plaques en W o en W+FR durant quatre dies més. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada línia i tractament. (b) Línies transgèniques *athb4hat3* i Col-0 foren crescudes en MS1 i tractades tal i com s'indica a la figura R2.1. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa amb els controls corresponents creixent en les mateixes condicions (* $P < 0.05$; ** $P < 0,01$).

Els resultats d'aquests dos subapartats ens indiquen que la transferència de medi sembla tenir un efecte important en la resposta de les plàntules als tractaments

d'ombra simulada. No obstant, un altre factor diferencial entre els dos experiments descrits anteriorment és el moment d'aplicació de l'ombra simulada, en dia 3 i dia 2, respectivament. Per comprovar si la durada del tractament amb ombra simulada afectava l'elongació de l'hipocòtil, vam dissenyar un experiment de *time-course* on es

van sembrar llavors *athb4hat3* i wt en un medi GM-0.5x i es van créixer en W durant 1, 2, 3, 5 i 7 dies, i llavors part es va aplicar llum W+FR fins a dia 7, quan es va mesurar la llargada dels hipocòtils (*figura R3.13.(a)*). En W, el control i el doble mutant no presentaven diferències significatives. Quan les plàntules foren tractades amb W+FR en dia 1, 2 i 3 els controls presentaven una elongació de l'hipocòtil molt major que el doble mutant, però sense presentar diferències significatives entre els tres tractaments lumínics dins el mateix genotip. Quan el tractament amb W+FR era al dia 5, les plàntules control no elongaven l'hipocòtil tant com les condicions anteriors, però

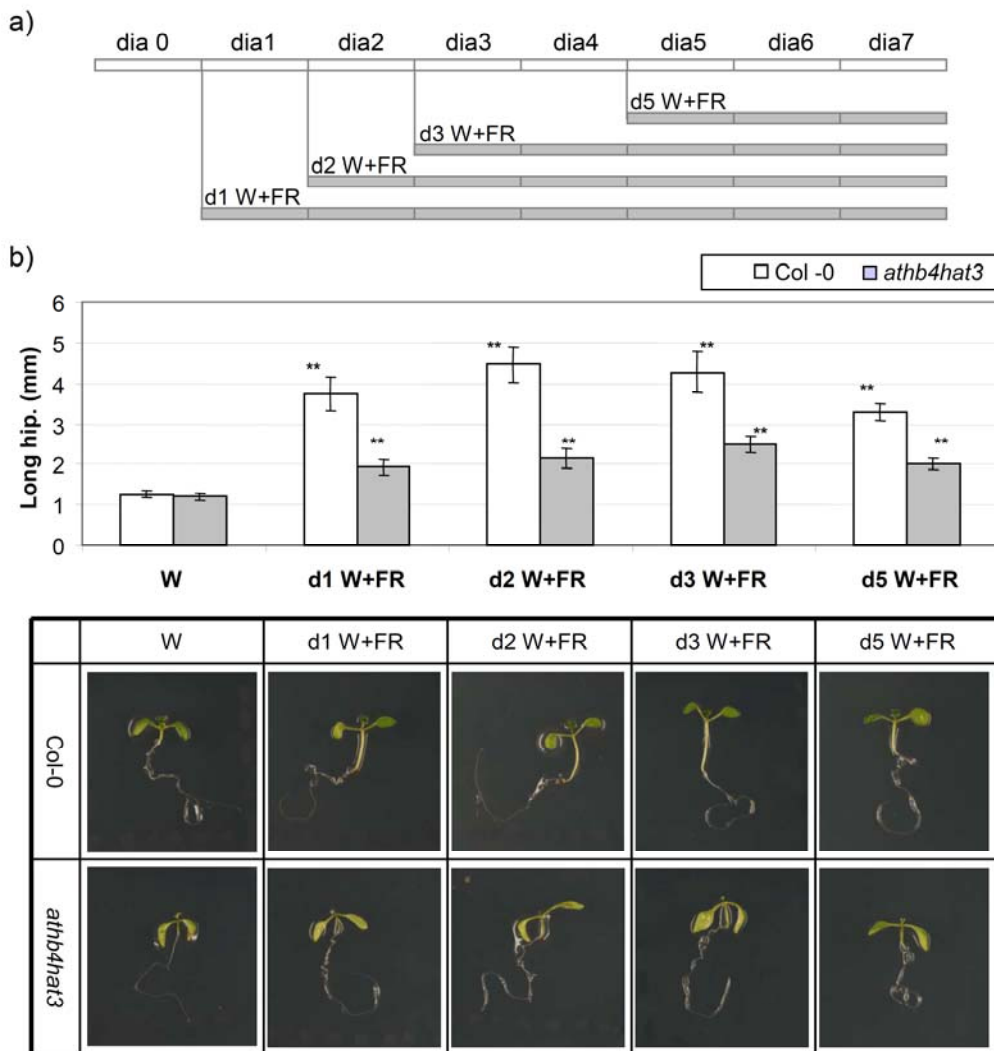


Figura R3.13. Fenotip de la línia *athb4hat3* en resposta a un *time-course* d'ombra simulada. (a) Esquema experimental de les diferents transferències a ombra simulada realitzades en aquest experiment. (b) Resposta de l'hipocòtil del wt i d'*athb4hat3* a diferents temps de tractament d'ombra simulada, amb les fotografies d'individus representatius corresponents als diferents tractaments i línies utilitzades. Les plàntules foren germinades en un medi GM-0.5x durant 1, 2, 3, 5 i 7 dies en W i després es transferiren a W+FR fins a dia 7. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa amb el mateix genotip creixent en W (*P<0.05; **P<0,01).

encara hi havia capacitat de resposta i aquest era major que en W; plàntules *athb4hat3* també mantenien la capacitat de resposta a W+FR, essent menor que el control però de la mateixa magnitud que en els tractaments lumínics anteriors. Comparativament, *athb4hat3* allargava menys l'hipocòtil a W+FR que plàntules Col-0, fos quin fos el dia que s'aplicava el tractament (*figura R3.13 (b)*).

Aquests resultats suggerien que la transferència de plàntules afectava a la capacitat de resposta de l'hipocòtil a W+FR. Aquesta resposta minvada per la transferència pot ser deguda a que quan la plàntula pateix un estrés -com per exemple un canvi de medi, un cert dany o una dessecació- a dia 3 del seu desenvolupament, aquest és suficient per reduir el seu creixement. Com a conseqüència, la plàntula pot necessitar un temps d'aclimatació al nou medi abans de respondre a estímuls externs (tals com un tractament d'ombra simulada).

3.2.1.2. Tractaments hormonals d'*athb4hat3*

Per complementar l'estudi del paper d'*ATHB4* en l'acció hormonal, vam centrar-nos en les respostes a BRs, GAs i auxines, analitzant la llargada de l'hipocòtil de plàntules *athb4hat3* crescudes en un medi amb o sense hormona (*figura R3.14.(a,b,c* respectivament)). Es van sembrar llavors en un medi MS1 i es van créixer en W en un medi suplementat amb 0 o 1 μM d'EBL; amb 0, 5 o 10 μM de GA_3 ; o amb 0, 0,5 o 5 μM de picloram, i en dia 7 es va mesurar la llargada dels hipocòtils.

EBL: En absència d'hormona, les plàntules *athb4hat3* mostraven uns hipocòtils lleugerament més curts que el wt. Quan hi aplicàvem hormona, els hipocòtils d'*athb4hat3* mostraven una resposta reduïda a 1 μM d'EBL, indicant que la pèrdua de funció d'*ATHB4* (i *HAT3*) reduïa significativament la resposta a BRs ($p < 0,01$) (*figura R3.14 (a)*). Aquest fet està en concordança amb la hiposensibilitat a EBL mostrada pel mutant *athb4hat3* quan es transferia de medi (Sorin et al., 2009), suggerint que *ATHB4* jugaria un paper com a regulador positiu de les respostes a BRs.

GA_3 : En absència d'hormona en aquest cas les plàntules mutants presentaven una menor elongació de l'hipocòtil (*figura R3.14 (b)*). Quan hi aplicàvem qualsevol de les dues concentracions d'hormona els hipocòtils d'*athb4hat3* presentaven una resposta significativament reduïda, fet que vam comprovar amb l'anàlisi de varianza de dues vies ($p < 0,0001$).

Picloram: En ambdues concentracions de picloram els hipocòtils d'*athb4hat3* presentaven una resposta significativament reduïda ($p < 0,0001$ en l'anàlisi de varianza

de dues vies) en comparació al control, de manera similar al que s'observa amb l'aplicació de GA₃ (figura R3.14 (c)).

Aquests resultats suggereixen que *athb4hat3* presenta una resposta alterada als tractament hormonal, resultant en una reducció de l'elongació de l'hipocòtil.

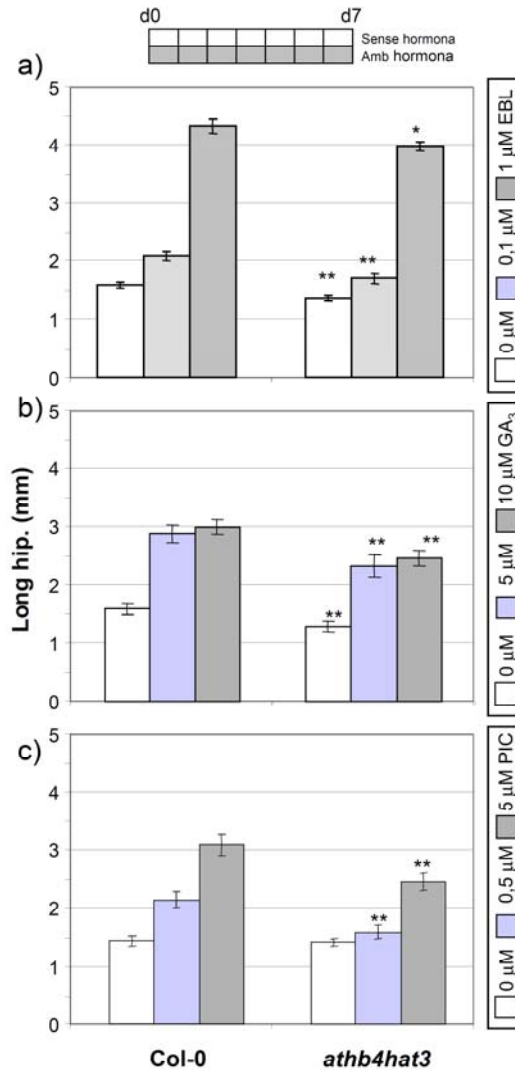


Figura R3.14. Fenotip de la línia *athb4hat3* en resposta a BRs, GAs i Aux. Línies transgèniques *athb4hat3* i Col-0 foren crescudes durant set dies en W en un medi GM-0,5x en concentracions de 0 µM, 0,1 µM i 1 µM d'EBL (a), en 0 µM, 5 µM i 10 µM de GA₃ (b), o en 0 µM, 0,5 µM i 5 µM de PIC (c) durant 7 dies en W. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa en relació al mateix tractament en la línia wt (*P<0,05; **P<0,01).

3.2.1.3. Tractament de fosc

Per comprovar que la reducció de resposta dels hipocòtils d'*athb4hat3* no era deguda a una incapacitat d'elongació d'aquest, vam dur a terme un experiment de creixement en fosc, condicions en les quals la manca de llum indueix el màxim d'allargament

d'aquest òrgan. Es van sembrar llavors wt i *athb4hat3* (en aquest cas es tractava d'una població no segregant) en un medi GM-0.5x o en un medi MS1, es van estratificar durant tres dies i se'ls hi va fer un pols de llum W durant 30 minuts, llavors es van posar en foscor a 22°C durant quatre dies i transcorregut aquest temps es mesurà l'allargament de l'hipocòtil (*figura R3.15*). No s'observaren diferències significatives entre el control i el doble mutant en un medi GM-0,5x, però sí en un medi MS1, on hi havia una major elongació de l'hipocòtil del *athb4hat3* enfront al wt. Aquests resultats suggereixen que *athb4hat3* no té compromesa la capacitat d'elongació de l'hipocòtil.

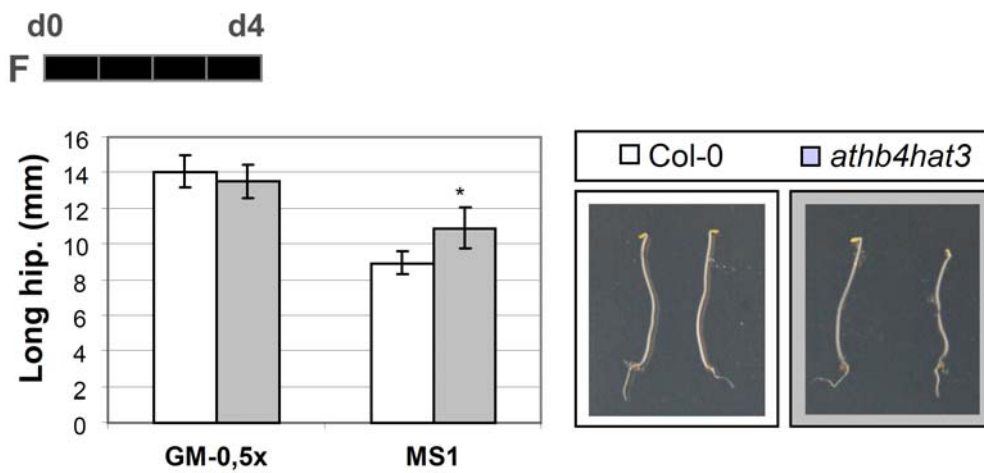


Figura R3.15. Fenotip de la línia *athb4hat3* en resposta a un tractament de foscor. Línies transgèniques *athb4hat3* i Col-0 foren creixudes en GM-0,5x o en MS1 durant 4 dies en foscor en un medi GM-0.5x, després d'un pols de 30 minuts de W. Fotografies d'individus representatius creixent en GM-0,5x corresponents als diferents tractaments i línies utilitzades es mostren a la dreta. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa en relació al wt (*P<0.05; **P<0,01).

3.2.1.4. Caracterització amb microscòpia electrònica de rastreig (SEM)

Sabent que *athb4hat3* té capacitat d'elongar l'hipocòtil tant com el wt, la següent qüestió fou preguntar-nos quin podria ser el motiu pel qual no era capaç de respondre en la mateixa magnitud que els controls a estímuls tals com canvis en la llum o hormonals. Estudis fisiològics suggereixen que les fulles perceben i responen a la SAS, però es desconeixen exactament els mecanismes involucrats en el processament de les senyals lumíniques dins les fulles. Un estudi en *Arabidopsis thaliana* on s'utilitzà un sistema d'*enhancer-trap* específic de teixits amb l'expressió de phyB-GFP mostrà que és important l'expressió del PHYB a les cèl·lules del mesòfil per tal de complementar la longitud de l'hipocòtil en línies on aquest presentava una

alteració (Endo et al., 2005). Aquests resultats, juntament amb el fet que quan manquen els cotiledons l'hipocòtil no respon a tractament d'ombra simulada (*figura R5.1*) ens van fer pensar en una possible alteració histològica en els cotiledons del doble mutant *athb4hat3*, recolzat alhora per l'alteració morfològica observada en els cotiledons d'aquestes plàntules (*figura R3.12(a)*).

Una primera aproximació per comprovar aquesta hipòtesi fou utilitzant un microscopi electrònic de rastreig per tal d'estudiar la morfologia de les plàntules. Vam sembrar llavors wt i *athb4hat3* en un medi MS1, es van estratificar 3 dies i vam transferir les plaques a llum contínua. En els dies 0, 3, 5, 7 i 10 vam transferir el material fresc, sense cap tractament, al microscopi MEB Hirox SH-1500 (*Hirox Europe-Jyfel*), on es baixa fins a -30°C per obtenir la imatge.

Per observar l'estadi d'embrió vam embeure les llavors en un paper Whatman amb H₂O durant un mínim de dues hores, i amb l'ajuda d'una lupa, unes pinces de dissecció i una agulla emmanegada vam treure el tegument. Aquests embrions foren mantinguts en aigua fins el moment de l'observació al microscopi. Les plàntules wt presentaven els dos cotiledons de secció semicircular plegats un sobre l'altre, perfectament simètrics, seguits de l'eix embrionari. Els embrions *athb4hat3* tenen un eix embrionari significativament més llarg (pvalor $\leq 0,01$) seguit de dos cotiledons de secció irregular replegats de forma asimètrica (*figura R3.16 (b, c, g)*).

Plàntules de dia 3 ja mostraven diferències molt més marcades, amb una diferent penetrabilitat de fenotip en les *athb4hat3* (*figura R3.16 (d, e, f)*). Les plàntules wt tenen els dos cotiledons arrodonits, de forma convexa i molt semblants entre ells (*d*), mentre que les plàntules *athb4hat3* presenten dos fenotips clarament marcats: un fenotip sever, on els dos cotiledons són estrets, lanceolats, allargats i de perfil còncav; i un fenotip intermedi, on acostuma a presentar un cotilèdon de fenotip sever i l'altre més semblant a un wt, però amb una forma clarament menys perfilada i definida (*e, f*, respectivament).

Per observar la morfologia de les fulles primàries, vam seleccionar plàntules de dia 5 i vam realitzar el mateix procediment (*figura R3.17*). Les plàntules wt presentaven fulles amb una polaritat ben marcada, amb presència de tricomes a la cara superior (o adaxial) (*a*), mentre que les *d'athb4hat3* eren de simetria radial i amb absència de tricomes (de vegades se'n veien d'abortats) (*b*). Al llarg del desenvolupament, els cotiledons del doble mutant continuaven amb un desenvolupament alterat, a l'igual que

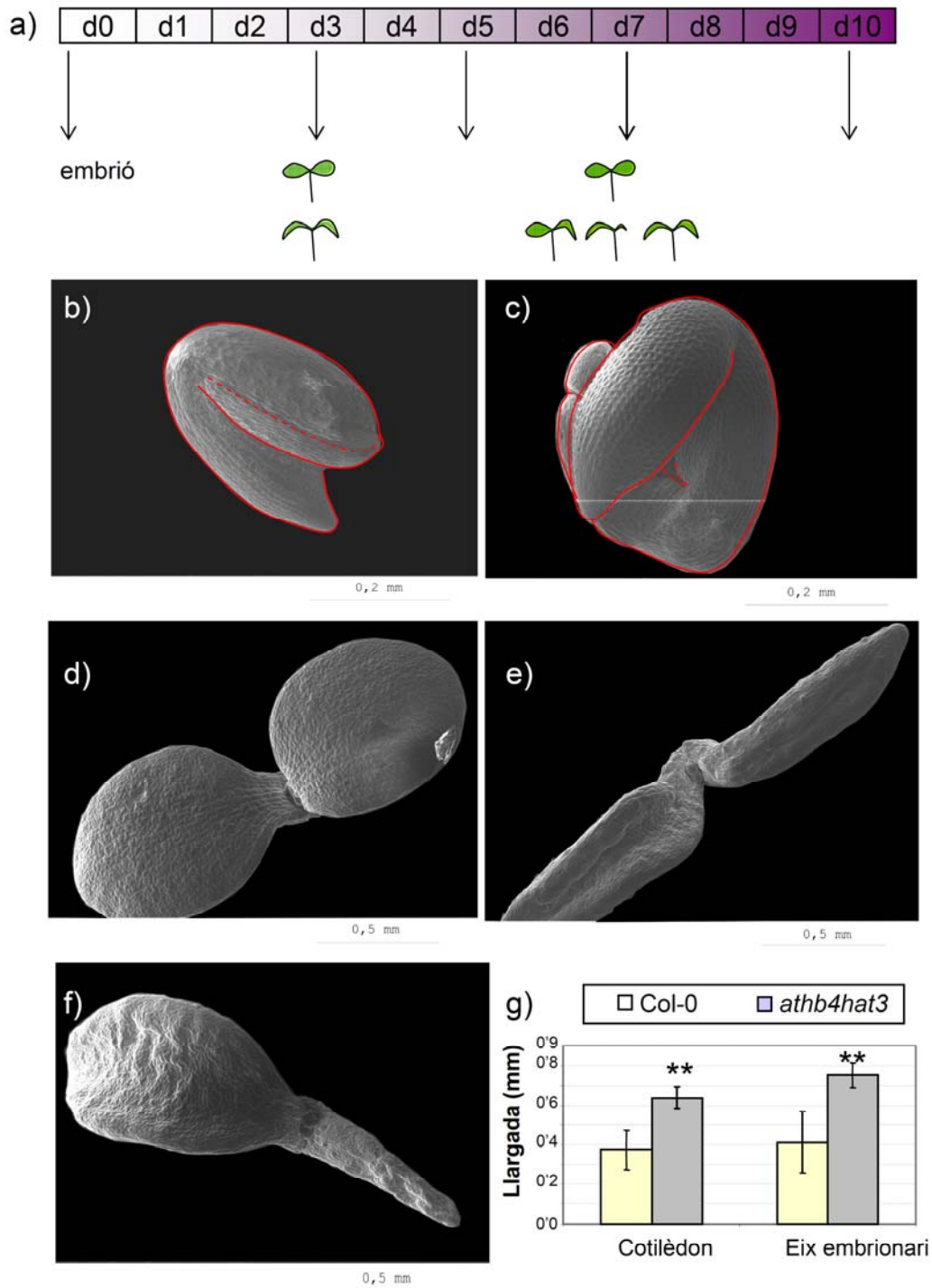


Figura R3.16. Fenotip de la línia *athb4hat3* en imatges de microscòpia electrònica de rastreig en dia 0 i 3. (a) Esquema del mostreig per procedir al SEM, es van recollir mostres a dia 0, 3, 5, 7 i 10. Fenotip de l'embrió en wt (b) i del doble mutant (c) a dia 0. La línia vermella ressegueix el contorn de l'eix embrionari i dels cotiledons, separats entre ells per una línia discontinua. Fenotip en dia 3 del wt (d) i del doble mutant *athb4hat3* (e, f), on s'aprecia la diferent penetrància de fenotips en els cotiledons d'aquest darrer. (g) Mesura de la llargada d'un cotilèdon (n=20) i de l'eix embrionari (n=10) de plàntules de dia 1. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa en relació al wt (*P<0,05; **P<0,01).

les fulles primàries i la resta de fulles que van sorgint (*figura R3.17 (c, d, e, f)*), les quals eren filiformes i de simetria radial.

El tret distintiu d'una polaritat alterada i radial en el doble mutant, similar a una pèrdua de domini adaxial en les fulles primàries, ens plantejà a formular una hipòtesi d'abaxialització en *athb4hat3*, observable tant als cotiledons com a les fulles. En les fulles de les angiospermes, la cara adaxial o superior està especialitzada en la captura de la llum, mentre que la cara abaxial o inferior està especialitzada en l'intercanvi de

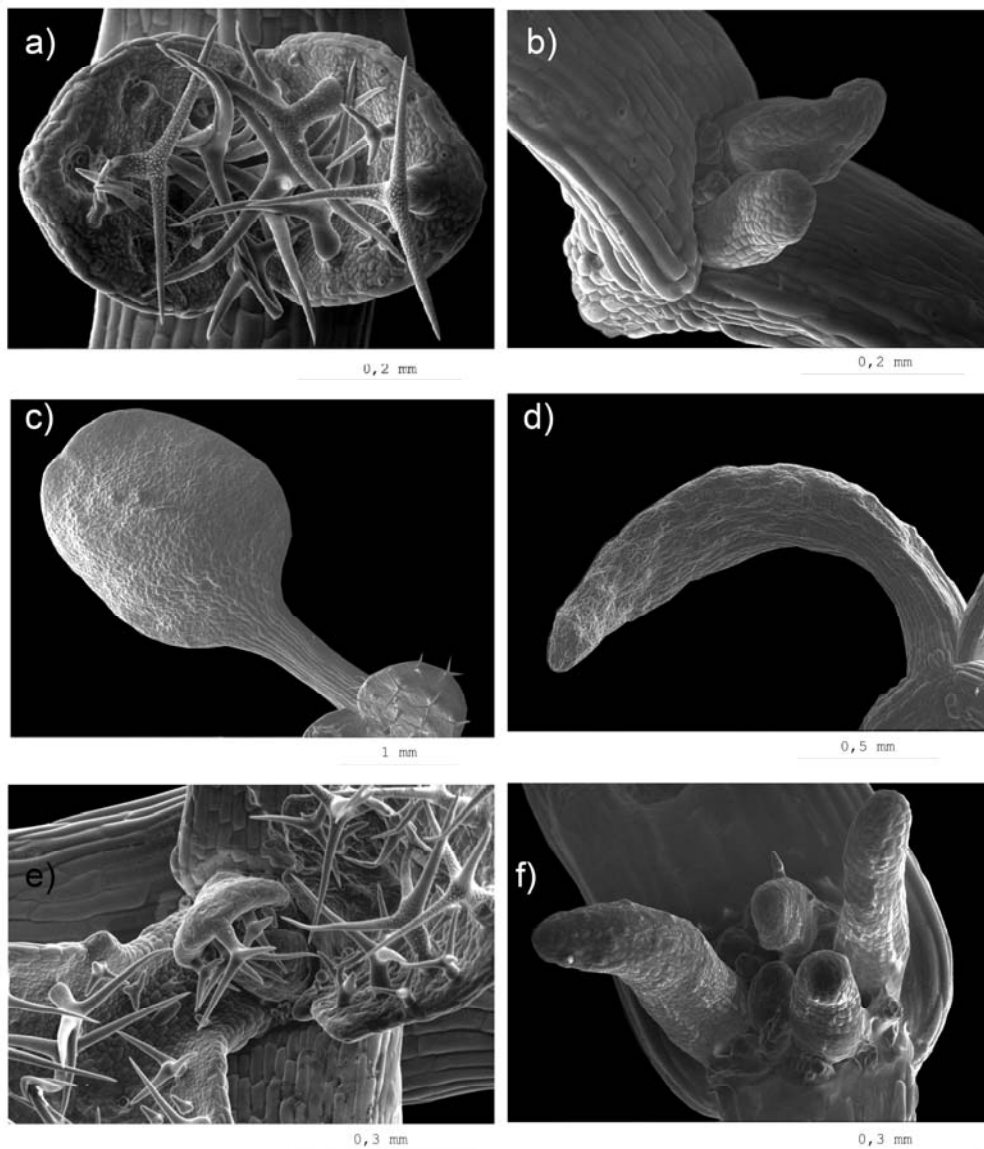


Figura R3.17. Fenotip de la línia *athb4hat3* en imatges de microscòpia electrònica de rastreig en dia 5, 7 i 10. Fenotip de les fulles primàries del wt en dia 5 (a) i 7 (c), i del doble mutant en els mateixos dies (b, d respectivament). Fenotip de les fulles primàries i les adjacents en el wt (e) i en *athb4hat3* (f).

gasos (McConnell et al., 2001), de manera que l'establiment de la polaritat a la fulla probablement requereix la generació i la percepció d'informació de posició al llarg de la dimensió radial de la planta (adaxial versus abaxial, o central versus perifèric). Entenem com a abaxialització el fenomen pel qual un determinat òrgan perd la identitat de la zona adaxial, i incrementa la zona abaxial. La hipòtesi plantejada es basa en que ATHB4/HAT3 podrien ser factors adaxialitzadors, de manera que quan manquen (*athb4hat3*) el domini abaxial és predominant. La hipòtesi neix després de les imatges de microscòpia de rastreig, que suggereixen un increment de la simetria radial en el cotiledons, i simetria radial i absència de tricomes en fulles primàries, trets característics en mutants abaxialitzats (Carlsbecker et al., 2010; Prigge et al., 2005).

3.2.1.5. Caracterització amb Confocal

Aquesta alteració en la morfologia externa, tant de cotilèdons com de fulles, suggeria una possible modificació de l'estructura interna a aquests òrgans, probablement amb una possible alteració d'algun tipus cel·lular (Endo et al., 2005). Per tal de poder estudiar l'estructura interna d'aquests teixits es va procedir a aplicar la tinció pseudo-Schiff de iodur de propidi (*mPS-PI*, (Truernit et al., 2008; Truernit E, 2008; Truernit and Palauqui, 2009; Wuyts et al., 2009). Vam sembrar llavors wt i *athb4hat3* en un medi MS1, es van estratificar 3 dies i vam transferir les plaques a llum contínua 22°C. En els dies 0, 1, 2, 3, 5, 7 i 10 vam transferir el material fresc en plaques multipous i es va procedir a fer la tinció *mPS-PI*. Breument, aquesta tinció es caracteritza per una decoloració de les plàntules en una solució d'etanol:àcid acètic, seguida per una fixació en metanol:àcid acètic. Després es transfereix el material en diferents solucions d'etanol, incubant-se a 80°C i rentant-se en aigua. Seguidament s'incuben les mostres en àcid periòdic, es renten i s'incuben amb el reactiu de Schiff amb iodur de propidi fins que les plàntules romanen tenyides. Aleshores es renten i es transfereixen en portaobjectes coberts amb una solució de hidrat de cloral, on hi romanen un dia i es monten en una solució Hoyer.

De les imatges obtingudes, i amb l'ajuda del programa de distribució lliure Osirix (<http://osirix.softonic.com/mac/>), vam realitzar una reconstrucció tridimensional (*figura R3.18 (b)*). Quan vam visualitzar un tall transversal dels cotilèdons de mostres de dia 1 vam observar que el wt presentava l'estructura descrita per aquest tipus de teixit, és a dir, una primera capa d'epidermis, seguida d'una capa cel·lular semblant al parènquima en palissada de les fulles, després un parènquima aerífer o mesòfil esponjós i per acabar una epidermis inferior, on hi trobaríem localitzats la major proporció d'estomes de l'epidermis (*figura R3.18 (a, c esquerra)*). En plàntules

athb4hat3 l'estructura estava desorganitzada, ja que si bé és cert que ens trobàvem una epidermis envoltant tot el cotilèdon, a l'interior d'aquest només hi trobàvem parènquima aerífer, essent irreconeixible el parènquima en palissada (figura R3.18 (c dreta)). En quant als feixos conductors, la simetria d'aquests també era radial, alhora que molts cops es presentaven desorganitzats i/o interromputs, el que és consistent en que les plàntules *athb4hat3* presentaven una forta abaxialització.

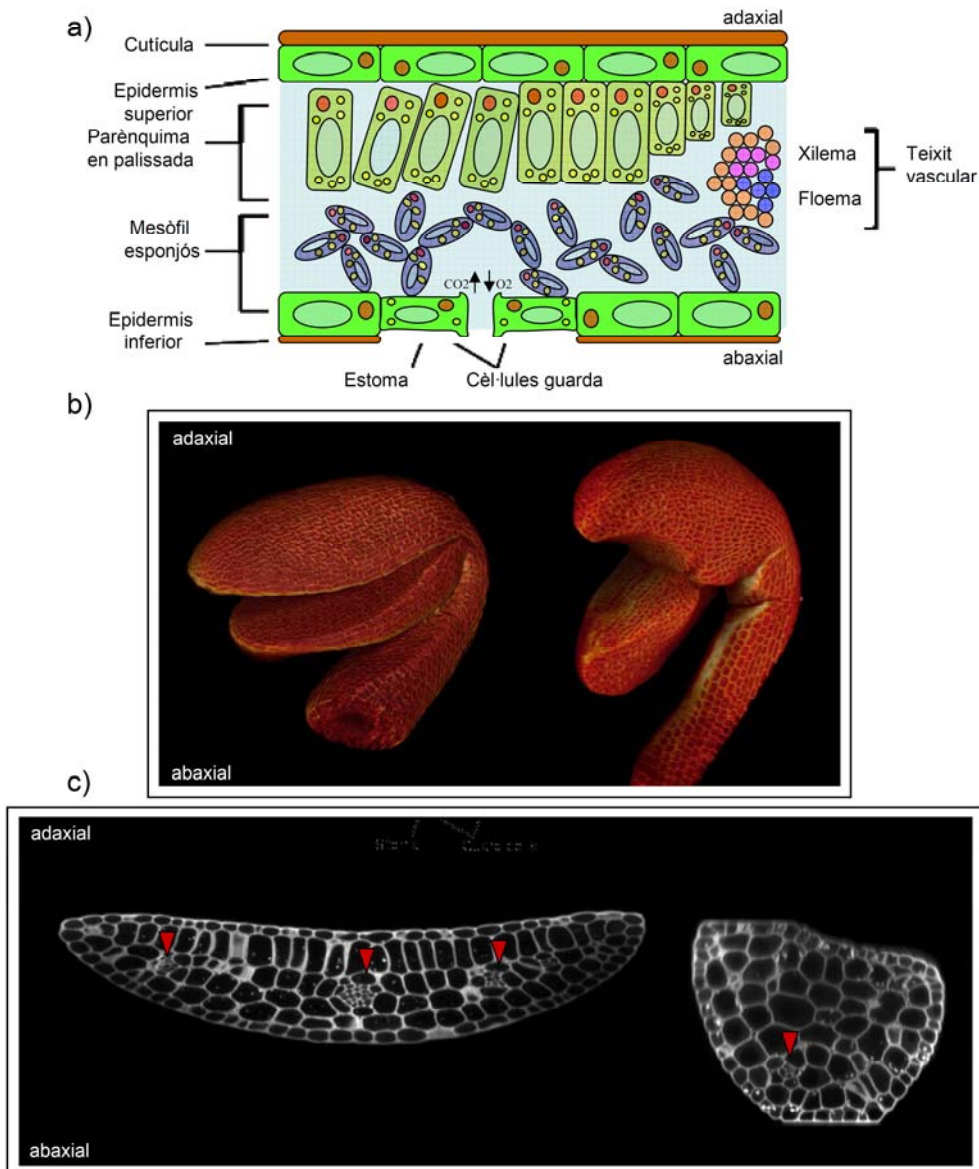


Figura R3.18. Fenotip de la línia *athb4hat3* en imatges de microscòpia confocal en dia 1. (a) Esquema d'un tall transversal d'una fulla en una plàntula wt. (b) Reconstrucció tridimensional amb el programa Osirix a partir de talls de confocal de plàntules wt (esquerra) i *athb4hat3* (dreta) de 1 dia. (c) Tall transversal d'un cotilèdon de plàntula wt (esquerra) i *athb4hat3* (dreta) on es pot veure la diferent estructuració dels tipus cel·lulars descrits a l'apartat (a) d'aquesta figura. Els triangles vermells marquen la distribució dels feixos vasculars.

Els estudis histològics mostraren que les fulles primàries d'*athb4hat3* observades en plàntules de major edat (dia 5, 7 i 10) eren totalment radials i els mancaven les estructures adaxials característiques en comparació al wt (*figura R3.19*).

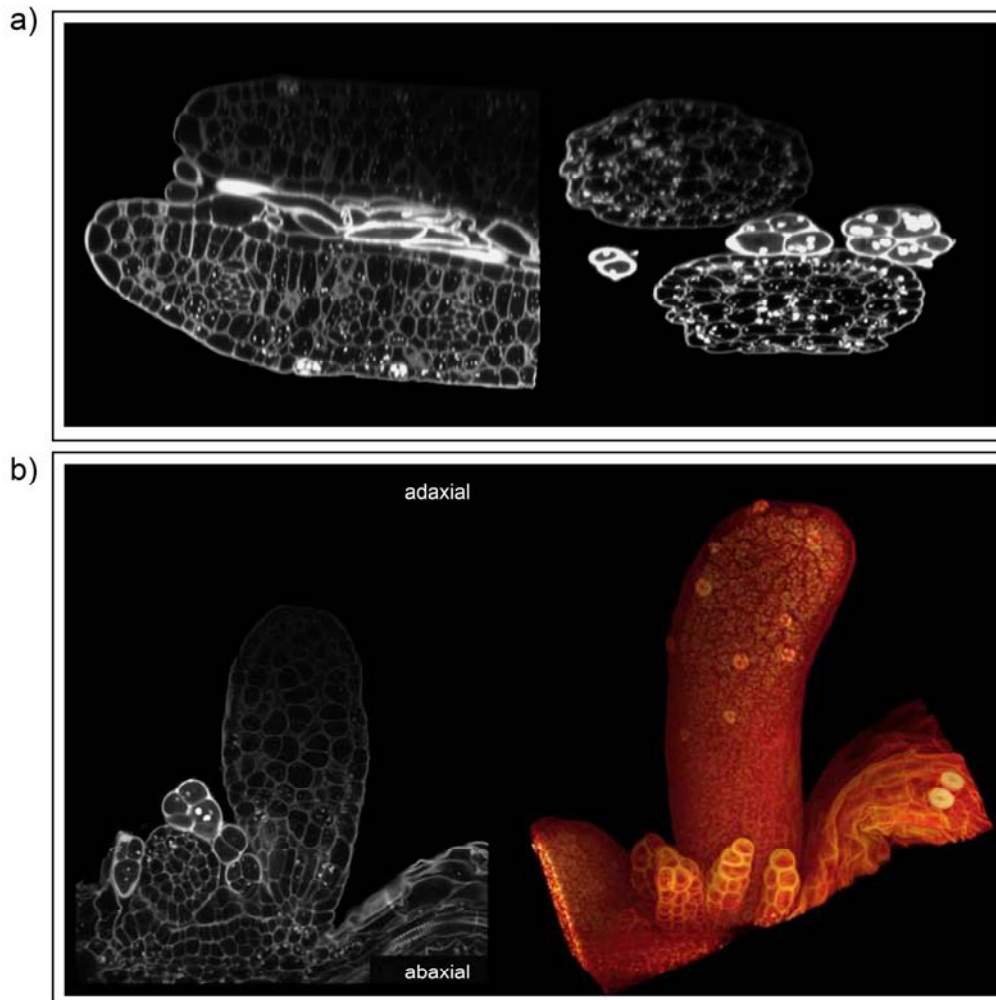


Figura R3.19. Fenotip de la línia *athb4hat3* en imatges de microscòpia confocal en dia 5 i 7. (a) Tall transversal d'una fulla primària wt (esquerra) i *athb4hat3* (dreta) de dia 5. **(b)** Tall longitudinal d'una fulla primària d'*athb4hat3* de dia set (esquerra) i la seva reconstrucció tridimensional amb el programa Osirix a partir de talls de confocal (dreta).

Aquest fenotip d'abaxialització d'*athb4hat3* s'assemblava al fenotip de mutants pertanyents a la subfamília HD-ZipIII, i és per això que ens va portar a plantejar una possible relació entre aquests factors de transcripció (*apartat 3.2.2*).

3.2.2. Caracterització molecular d'*athb4hat3*

Per dur a terme la caracterització molecular del doble mutant *athb4hat3* es va analitzar l'expressió de *SAUR15*, *SAUR68*, *HAT2* i/o *IAA1* en resposta a ombra simulada, 2,4-D o EBL (*figura R3.20*). En col·laboració amb un altre membre del grup (Jordi Bou), es van sembrar plàntules wt i *athb4hat3* en un medi MS1, es van estratificar durant 3 dies i llavors es van créixer durant 7 dies en W. Llavors es féu un tractament de 0 o 1h de W+FR (b), i de 0 o 4h de 50µM 2,4-D (c) o de 1µM EBL (d). Posteriorment es feu una extracció de RNA i una RT-qPCR amb primers específics d'aquests gens (Sorin et al., 2009).

Ombra simulada: L'expressió dels 4 gens esmentats estava alterada en diferent grau en els mutants *athb4hat3* després d'1h de tractament de FR. Mentre que l'expressió de *SAUR15*, *SAUR68* i *HAT2* es veia lleugerament augmentada, l'expressió de *IAA1* estava significativament reduïda (*figura R3.20(b)*).

Auxines: Després de 4h de tractament amb 50µM de 2,4-D l'expressió de 3 dels 4 gens es veia afectada, romanent equiparables els nivells de *SAUR68* en el mutant i el wt. Mentre que l'expressió de *SAUR15* i *HAT2* es veia augmentada, la de *IAA1* es veia reduïda (*figura R3.20(c)*).

BRs: Després de 4h de tractament amb 1µM d'EBL només l'expressió de *SAUR15* es veié incrementada, mentre que la de *SAUR68* romangué inalterada (*figura R3.20 (d)*).

D'aquesta manera el doble mutant *athb4hat3* presentava una alteració de l'expressió de gens regulats per auxines, BRs i ombra simulada. A més, aquests resultats indicaven que a nivell molecular el doble mutant responia clarament al tractament amb ombra simulada, tot i la reducció en la resposta fisiològica observada (*figura R3.14*).

A part de l'estudi de gens regulats per hormones i ombra simulada, i seguint els resultats obtinguts a l'apartat anterior, vam voler veure els nivells de gens relacionats amb el desenvolupament. S'han descrit varis gens com a determinants de l'adaxialització (*PHB*, *PHV*, *REV*) i l'abaxialització (*KAN*, *YABBY*) dels òrgans en plantes. *PHB*, *PHV* i *REV* codifiquen proteïnes pertanyents a la família HD-Zip III, propera als HD-Zip II on pertanyen *ATHB4* i *HAT3*, motiu pel qual vam voler estudiar si estaven afectats els nivells de dos d'aquests gens: *PHB* i *PHV*. El paper de *PHB* i *PHV* és força semblant, consistent filogenèticament amb l'origen d'ambdós degut a una duplicació gènica relativament recent en el llinatge de les eudicotiledònies (Prigge et

al., 2005). Ambdós gens estan implicats en la percepció de la posició radial en el primordi foliar (McConnell et al., 2001), ja que mutants dominants de *PHB* i *PHV* causen una transformació dramàtica dels trets abaxialitzadors de les fulles en trets adaxialitzadors.

Per tal d'estudiar si els nivells d'expressió d'aquests gens estaven alterats en plàntules *athb4hat3* es van dissenyar i utilitzar encebadors específics (MSO40 amb MSO41) per *PHB* i (MSO42 amb MSO43) per *PHV* (Carlsbecker et al., 2010). Vam créixer plàntules wt i *athb4hat3* durant 7 dies en W, i llavors es procedí a fer una extracció de RNA i una RT-qPCR. Per tal de poder detectar petites diferències, i degut a la diferent penetrabilitat que presenten els mutants *athb4hat3*, vam dividir la mostra en dos grups: plàntules amb un fenotip intermedi, que eren aquelles que tenien un cotilèdon altament

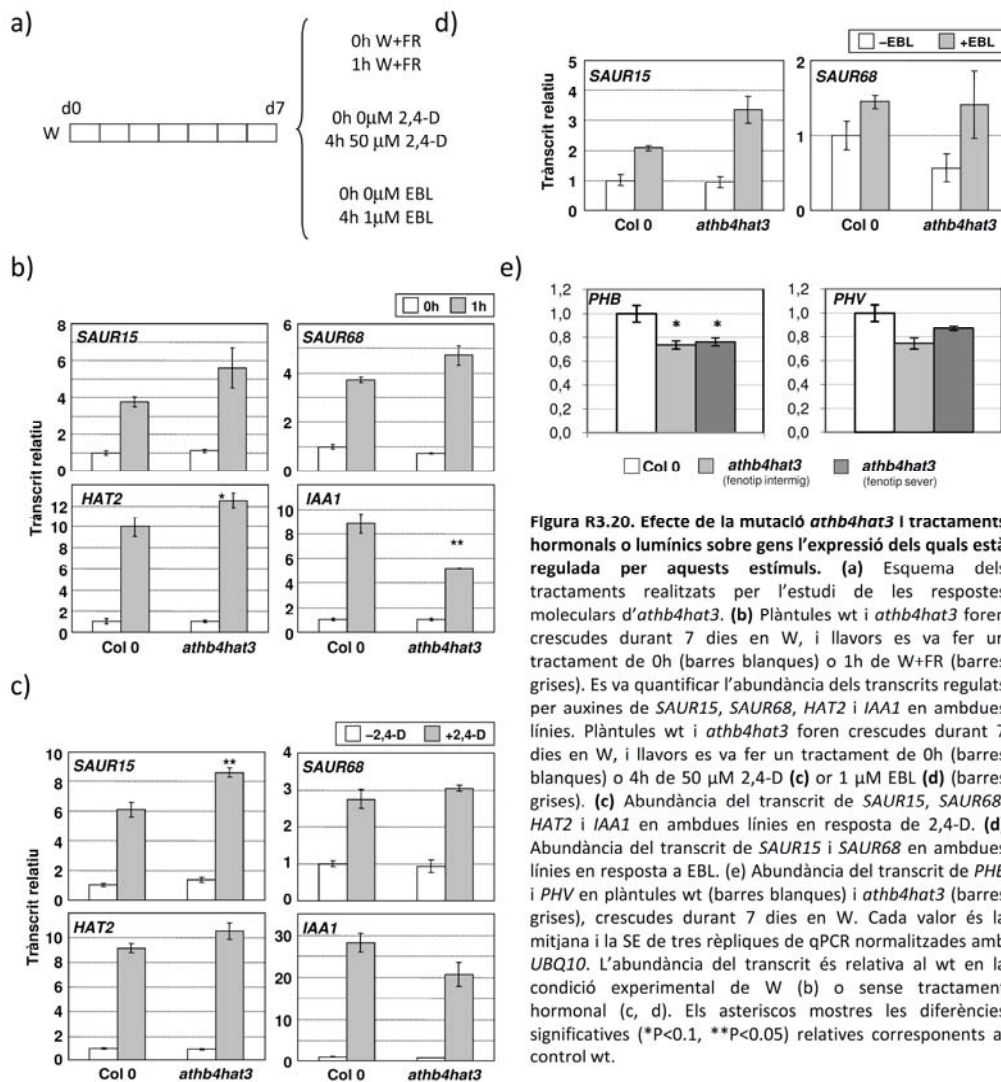


Figura R3.20. Efecte de la mutació *athb4hat3* i tractaments hormonal o lumínics sobre gens l'expressió dels quals està regulada per aquests estímuls. (a) Esquema dels tractaments realitzats per l'estudi de les respostes moleculars d'*athb4hat3*. **(b)** Plàntules wt i *athb4hat3* foren crescudes durant 7 dies en W, i llavors es va fer un tractament de 0h (barres blanques) o 1h de W+FR (barres grises). Es va quantificar l'abundància dels transcrits regulats per auxines de *SAUR15*, *SAUR68*, *HAT2* i *IAA1* en ambdues línies. Plàntules wt i *athb4hat3* foren crescudes durant 7 dies en W, i llavors es va fer un tractament de 0h (barres blanques) o 4h de 50 μ M 2,4-D (c) o 1 μ M EBL (d) (barres grises). **(c)** Abundància del transcrit de *SAUR15*, *SAUR68*, *HAT2* i *IAA1* en ambdues línies en resposta de 2,4-D. **(d)** Abundància del transcrit de *SAUR15* i *SAUR68* en ambdues línies en resposta a EBL. **(e)** Abundància del transcrit de *PHB* i *PHV* en plàntules wt (barres blanques) i *athb4hat3* (barres grises), crescudes durant 7 dies en W. Cada valor és la mitjana i la SE de tres rèpliques de qPCR normalitzades amb *UBQ10*. L'abundància del transcrit és relativa al wt en la condició experimental de W (b) o sense tractament hormonal (c, d). Els asteriscos mostres les diferències significatives (* $P < 0.1$, ** $P < 0.05$) relatives corresponents al control wt.

alterat i l'altre semblant al wt; i fenotip sever, que eren les que presentaven els dos cotilèdons altament alterats. Tant els nivells de *PHB* com els de *PHV* estaven lleugerament però significativament reduïts en les plàntules *athb4hat3*, malgrat no observàvem diferències entre el fenotip intermedi i el sever (*figura R3.20 (e)*).

D'aquesta manera, doncs, veiem que hi ha una reducció en l'expressió d'alguns gens relacionats amb la determinació de la polaritat en el desenvolupament (*PHB*, *PHV*). Aquestes dades suggereixen que *ATHB4* pot exercir un efecte sobre l'expressió d'aquests gens, ja sigui de forma directa o indirecta, modificant la senyalització de la polaritat de la planta.

3.2.3. Implicació del desenvolupament en respostes SAS

Els resultats a nivell molecular de gens marcadors de desenvolupament en plàntules *athb4hat3* descrits anteriorment, juntament amb les anàlisi histològiques dels seus cotilèdons on s'aprecia el defecte en el correcte desenvolupament del parènquima en palissada dels seus cotilèdons, amb predominança del parènquima esponjós (*figura R3.18 (c)*), i l'absència de tricomes de les fulles primàries (*figura R3.17 (b, f)*), ens porten a pensar que les plàntules *athb4hat3* mostren un fenotip clar d'abaxialització.

Aquests resultats ens van portar a plantejar-nos l'estudi de la resposta a ombra simulada de mutants pertanyents a la subfamília HDZipIII per establir una possible relació entre ambdós processos: desenvolupament i senyalització per llum.

La família HD-zip III s caracteritza per tenir un domini HD-Zip capaç de dimeritzar i unir DNA (Sessa et al., 1998), un motiu START d'unió a lipids o esteroids (Ponting and Aravind, 1999) i un domini C terminal conservat, la funció del qual es desconeix (Prigge et al., 2005). Donat que la majoria dels mutants disponibles estaven en un ecotip diferent a Col-0 i sabent que hi ha una forta influència del fons genètic en membres d'aquesta família en quant als nivells d'expressió (Otsuga et al., 2001), vam procedir a demanar llavors de mutants amb un fons genètic uniformitzat (Carlsbecker et al., 2010; Prigge et al., 2005).

Es van demanar els mutants *rev-6* (Otsuga et al., 2001), *phb-13* (SALK 021684) i el doble mutant *phb-13phv-11* (on *phv-11* (SALK JP91_0F10L.47.75)) al laboratori de Ykä Helariutta (Institute of Biotechnology, Helsinki, Finlàndia), totes en un fons genètic Col-0 amb la mutació *er-2* introduïda (Col-*er2*; (Carlsbecker et al., 2010)). El mutant *rev-6* presentava una reducció en la formació de meristemes laterals i en l'activitat dels

meristemes florals (Otsuga et al., 2001); mentre que ni *phb-13* ni *phb-13phv-11* mostraven un fenotip diferencial. Malauradament no es disposava de llavors de mutants dels altres membres de la família, així com d'altres dobles mutants publicats, en aquest fons genètic (Prigge et al., 2005).

Tractaments d'ombra simulada

Es van sembrar llavors en un medi GM-0.5x segons s'indica a l'apartat 2.1.1. (figura R2.1 (a)). Cap dels mutants simples o dobles analitzats mostraven plàntules amb

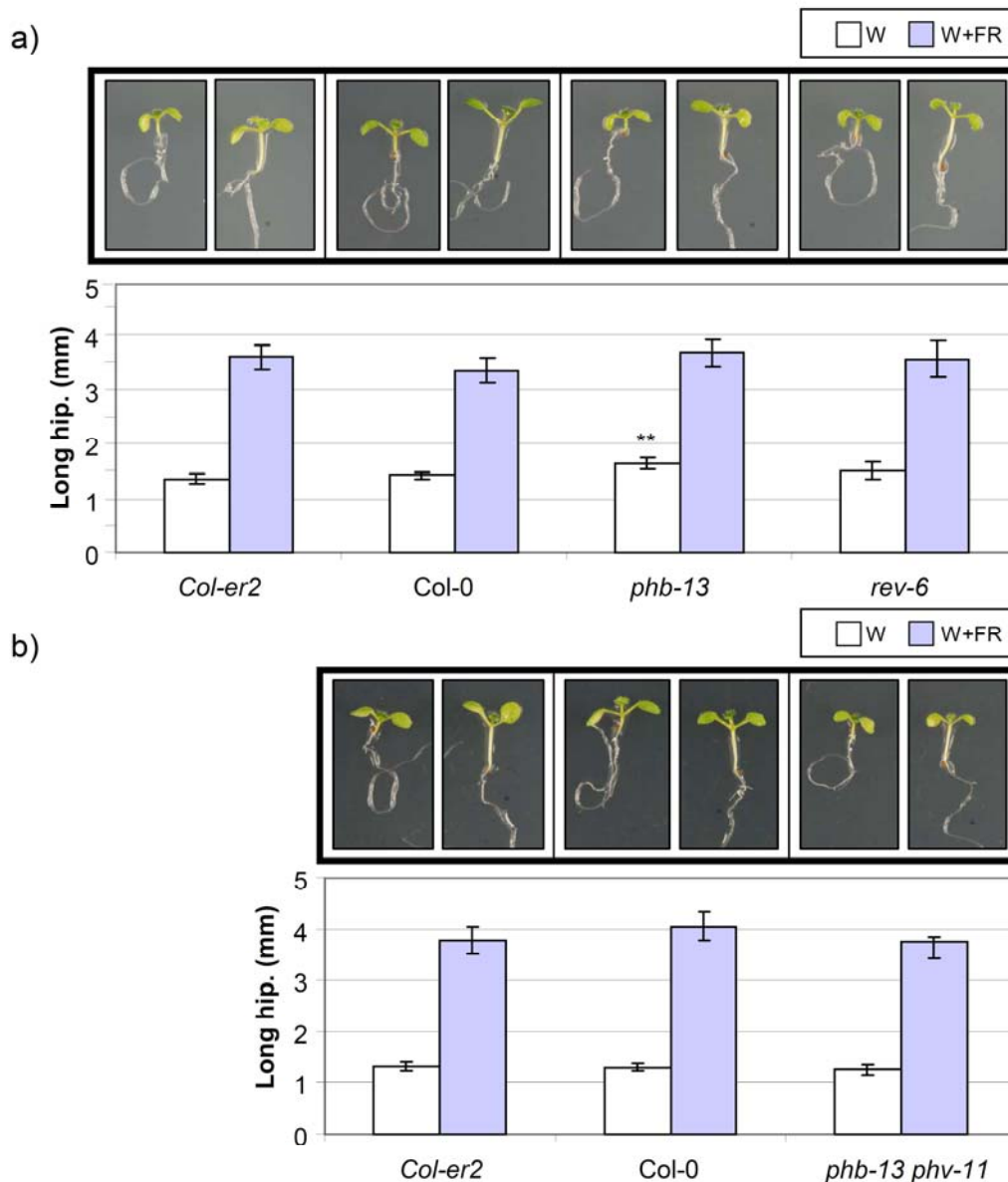


Figura R3.21. Fenotip de les línies *Col-0*, *Col-er2*, *phb-13*, *rev-6* i *phb-13 phv-11* en resposta a ombra simulada. Resposta al tractament d'ombra simulada de les línies de pèrdua de funció de *phb-13*, *rev-6* i *phb-13phv-11* amb el seu control corresponent *Col-er2*; les plàntules foren crescudes i tractades tal i com s'indica a la figura R2.1. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa amb els controls corresponents creixent en les mateixes condicions (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

defectes al desenvolupament semblant a les observades al doble mutant *athb4hat3*. En el tractament W i en el W+FR Col-*er2* es comportava igual que el Col-0 (*figura R3.21 (a, b)*). En quant als simples mutants, en el tractament W i en el W+FR els hipocòtils de *rev-6* es comportaven igual que els controls; i malgrat l'hipocòtil de *phb-13* era lleugerament més llarg en W, l'anàlisi de variància de dues vies mostrava que les diferències no eren significatives, resultats que suggereixen que PHB i REV semblen no tenir per si sols un paper en la regulació de les respostes de la SAS.

En quant al doble mutant, en el tractament W i en el W+FR els hipocòtils de *phb13phv11* es comportaven igual que els controls, suggerint que PHB i PHV semblen no tenir un paper redundant en la regulació de les respostes de la SAS.

3.2.4. Estudi de la zona del promotor d'ATHB4

Amb l'objectiu de discernir en quin teixit actua ATHB4 vam voler utilitzar el gen reporter *GUS* fusionat al promotor d'*ATHB4*. Es disposava al laboratori d'una construcció d'1kb del promotor aigües amunt de l'ATG d'*ATHB4* subclonat en un gen reporter *GFP-GUS* en el vector pC1304. Es seleccionaren tres línies independents amb una inserció de T-DNA i es realitzà un time-course seguit d'un assaig histoquímic per veure l'expressió del gen reporter *GUS* (*figura R3.22 (a)*). Vam sembrar plàntules de les tres línies en un medi GM-0.5x i les vam créixer sota W, en dia 3, 5 i 7 es va procedir a fer una tinció GUS. Els nostres resultats mostren que mentre que hi ha línies que expressen ATHB4

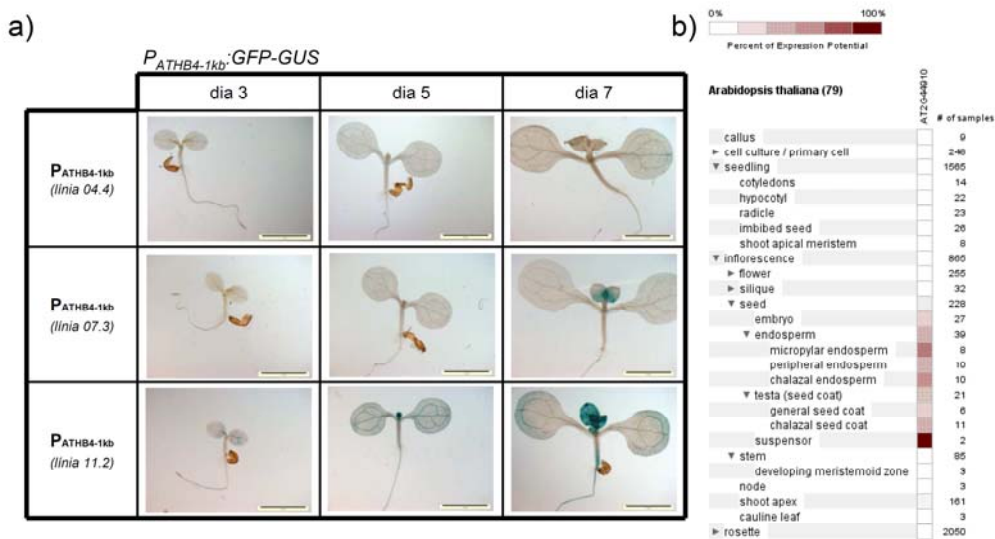


Figura R3.22. Expressió espai-temporal d'ATHB4. (a) Llavors *P_{ATHB4-1kb}:GFP-GUS* de tres línies independents foren germinades en un medi GM-0.5x sota W, i en dia 3, 5 i 7 foren sotmeses a una tinció GUS de 2h30min amb un tampó ferro/ferri 0.5 mM. Es mostren imatges d'individus representatius sotmesos als diferents tractaments descrits. (b) Nivells d'expressió d'ATHB4 segons bases de dades del programa informàtic Genevestigator V3 (Hruz et al., 2008).

des del dia 3 (línia 11.2), n'hi ha que només es mostren a dia 7 (línia 04.4). A trets generals, però, les tres línies presenten una tinció a les fulles primàries i als cotilèdons.

Aquests resultats ens suggereixen que hi ha una expressió d'ATHB4 diferencial al llarg del temps, i que s'expressa majoritàriament en fulles primàries i un xic als cotilèdons en estadi de plàntula. Dades amb les obtingudes en la base de dades del Genevestigator (Hruz et al., 2008) mostraven que ATHB4 també presenta nivells d'expressió elevats en l'estadi d'embrió (*figura R3.22 (b)*).

3.2.5. ATHB4 i els fitocroms

Tal i com ja s'ha descrit a la introducció, els diferents fitocroms presenten propietats bioquímiques i fisiològiques particulars, estan expressats diferencialment i es troben involucrats en la percepció de diferents senyals lumíniques (Whitelam et al., 1998).

En condicions de FR monocromàtic, el *phyA* és el major regulador de les respostes associades a aquesta llum, tals com la germinació o l'establiment de la plàntula; mentre que les respostes associades a la llum R monocromàtica són controlades per múltiples fotoreceptors, essent el *phyB* el que té un paper central (Josse et al., 2008). Sota tractament de R continua, l'allargament de l'hipocòtil està principalment controlat per *PHYB*, mentre que el *PHYA* té un paper minoritari (Al-Sady et al., 2008; Halliday et al., 1997).

Per tal de discernir en quina ruta de senyalització estaria actuant *ATHB4* i el seu paràleg *HAT3*, es va creuar el doble mutant *athb4hat3* amb els mutants de pèrdua de funció *phyB-9* (Reed et al., 1993) i *phyA-301* (SALK_014575; caracteritzat al nostre laboratori).

athb4hat3phyB

Es creuaren individus *athb4phyB* (obtingut prèviament al laboratori) amb *athb4hat3* i es buscaren per PCR els individus *athb4hat3phyB* mitjançant les combinacions d'oligonucleòtids pertinents (CSO11+CSO12 i LBb1+CSO12 per *HAT3*, MSO24+JO285 i LBb1+JO285 per *ATHB4* i JO349w+JO144 i JO349m+JO144 per *PHYB*). Donat que el triple mutant produïa poques llavors degut a l'efecte *athb4hat3*, es buscà una població homozigota per *phyB* i *athb4*, i segregant per *HAT3/hat3* (CMS10.16). Posteriorment, es van identificar els individus triples mutants per fenotip, pels quals es comprovà per PCR que eren triples mutants.

El fenotip del triple mutant en llum blanca presentava una morfologia intermèdia entre *athb4hat3* i *phyB*, ja que la longitud de l'hipocòtil era intermèdia i la morfologia dels cotilèdons era com la dels individus *athb4hat3*, presentant alhora una diferents penetrabilitat en el fenotip d'aquests havent-hi per una banda individus amb un limbe foliar gran i per l'altra d'altres amb el lanceolat i recargolat (figura R3.23(a)). Aquests resultats mostraven que *athb4hat3* suprimia parcialment el fenotip d'hipocòtil llarg de *phyB*, suggerint que ATHB4/HAT3 estarien implicats en la ruta de senyalització del phyB.

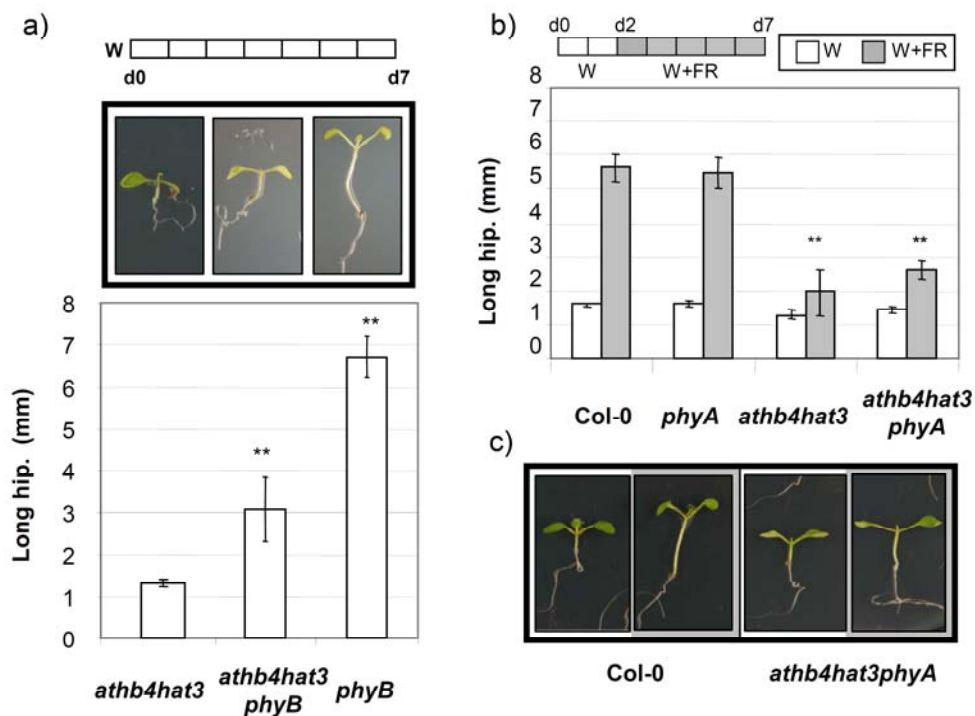


Figura R3.23. Fenotip de les línies *athb4hat3phyB* i *athb4hat3phyA* en resposta a ombra simulada. (a) Resposta de l'hipocòtil del wt, d'*athb4hat3phyB* i *phyB* crescudes durant 7 dies en W, amb fotografies d'individus representatius corresponents als diferents tractaments i línies utilitzades. (b) Línies wt, *phyA*, *athb4hat3* i *athb4hat3phyA* foren crescudes i tractades tal i com s'indica a la figura R2.1. (c) Fotografies d'individus representatius del wt i d'*athb4hat3phyA* després del tractament de l'apartat anterior. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. En (b), els asteriscs indiquen una diferència significativa en relació a la línia wt sota el mateix tractament (*P<0.05; **P<0.01).

athb4hat3phyA

Es creuaren individus *athb4hat3* amb *phyA*, i es buscaren per PCR els individus *athb4hat3phyA* mitjançant les combinacions d'oligonucleòtids pertinents (MSO31+MSO32 i MSO31+LBb1 per *PHYA*). Pel mateix motiu descrit amb l'anterior creuament, es buscà una població homozigota per *phyA* i *athb4*, segregant per *HAT3/hat3* (CMS26.31). Posteriorment, es van identificar els individus triples mutants per fenotip, pels quals es comprovà per PCR que eren triples mutants.

Es van realitzar experiment d'ombra simulada, pels quals es van sembrar llavors en un medi GM-0.5x segons s'indica a l'apartat 2.1.1. (*figura R2.1 (a)*). El triple mutant en llum blanca presentava els cotilèdons amb la mateixa morfologia que els *athb4hat3*, mantenint la variabilitat descrita anteriorment, amb una longitud de l'hipocòtil no significativament diferent dels controls. Sota condicions de W+FR, el triple mutant continuava mantenint la morfologia dels cotilèdons esmentada, alhora que presentava un allargament de l'hipocòtil semblant al del doble mutant *athb4hat3*, essent menor que els controls Col-0 i *phyA* (*figura R.23 (b, c)*). Donat que les plàntules *phyA* no presentaven un fenotip diferencial sota el tractament W+FR, aquests resultats no ens permeten discernir una possible acció epistàtica d'*ATHB4/HAT3* sobre *PHYA* en quant a l'elongació de l'hipocòtil.

3.2.6. ATHB4 i la ruta dels BRs

S'ha descrit anteriorment la connexió entre *ATHB4* i la ruta de biosíntesis de BRs (*apartat 3.1.1. i 3.2.1.2.*), però se'n desconeix el nivell al qual *ATHB4* estaria actuant. Per tal de poder estudiar una possible epistàsia entre aquest factor de transcripció i dos dels gens major estudiats en aquesta ruta hormonal, vam procedir a realitzar creuaments entre *athb4hat3* i mutants de *BES1* i *BZR1*.

athb4hat3bes1-Dbc7

Es creuaren individus *athb4hat3* amb *bes1-Dbc7* (Gonzalez-Garcia et al., 2011) per tal d'obtenir el triple mutant, i es buscaren per PCR els individus *athb4hat3bes1-Dbc7* mitjançant les combinacions d'oligonucleòtids pertinents (per *BES1* s'utilitzà MSO35+MSO21 pel wt i MSO35+MSO22 pel mutant). Pel mateix motiu descrit amb l'anterior creuament, es buscà una població homozigota per *bes1-Dbc7* i *athb4*, i segregant per *HAT3/hat3* (CMS27.11). Posteriorment, es van identificar els individus triples mutants per fenotip, pels quals es comprovà per PCR que eren triples mutants.

Es van realitzar experiments d'ombra simulada, pels quals es van sembrar llavors en un medi GM-0.5x segons s'indica a l'apartat 2.1.1. (*figura R2.1 (a)*). En condicions de W, el triple mutant no presentava diferències en l'elongació de l'hipocòtil en comparació amb el control, mentre els cotilèdons sí presentaven un fenotip semblant al del doble mutant *athb4hat3* (*figura R3.24 (a, b)*) però amb un limbe foliar més gran i recargolat, fenotip semblant al de *bes1-Dbc7*. En quant a les respostes de W+FR, el triple mutant es comportava igual que *athb4hat3*, i no com *bes1-Dbc7*, suggerint que *ATHB4/HAT3* serien epistàtics a *BES1* en quant a l'elongació de l'hipocòtil.

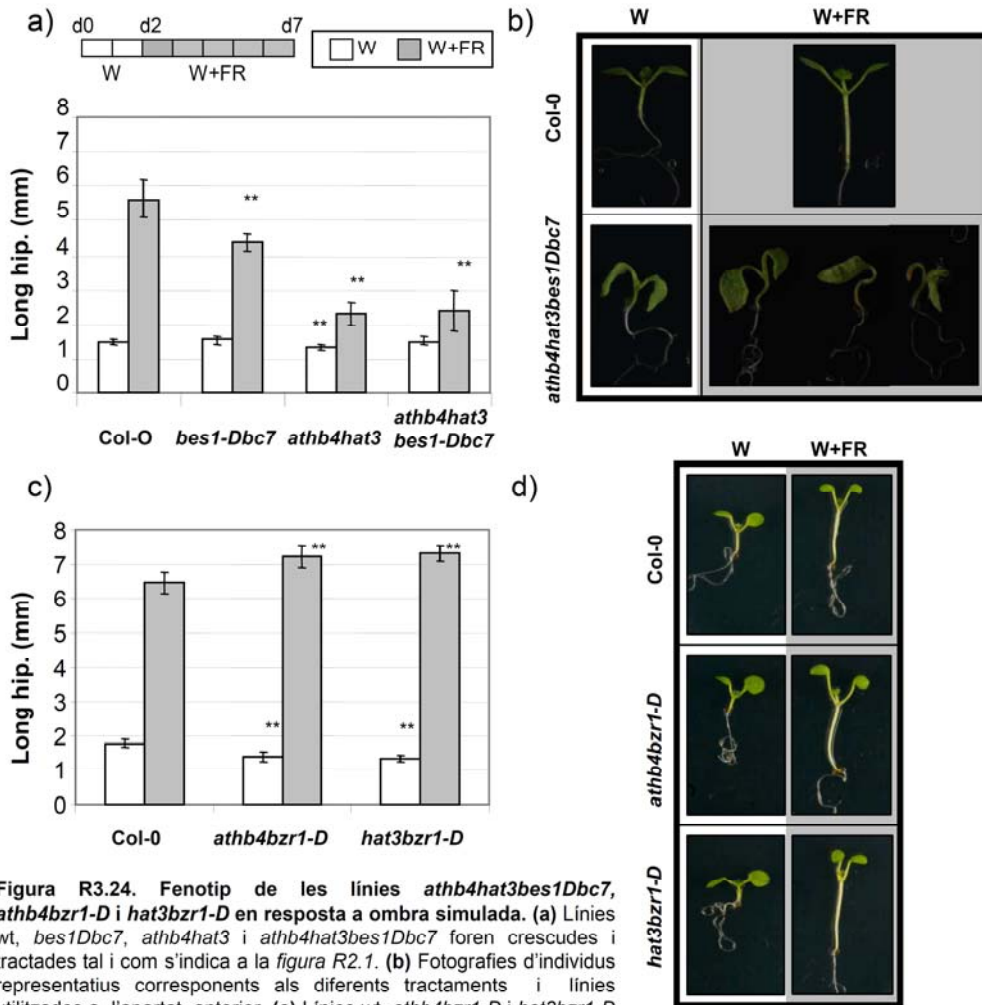


Figura R3.24. Fenotip de les línies *athb4hat3bes1Dbc7*, *athb4bzip1-D* i *hat3bzip1-D* en resposta a ombra simulada. (a) Línies wt, *bes1Dbc7*, *athb4hat3* i *athb4hat3bes1Dbc7* foren crescudes i tractades tal i com s'indica a la figura R2.1. (b) Fotografies d'individus representatius corresponents als diferents tractaments i línies utilitzades a l'apartat anterior. (c) Línies wt, *athb4bzip1-D* i *hat3bzip1-D* foren crescudes i tractades tal i com s'indica a la figura R2.1. (d) Fotografies d'individus representatius corresponents als diferents tractaments i línies utilitzades a l'apartat anterior. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. En (b), els asteriscs indiquen una diferència significativa en relació a la línia wt sota el mateix tractament (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

athb4bzip1-D* i *hat3bzip1-D

Una aproximació alternativa a l'obtenció d'un possible triple mutant rau en l'obtenció primer dels dobles mutants. Amb tal finalitat es creuaren individus *athb4* amb *bzip1-D* i *hat3* amb *bzip1-D* (Gonzalez-Garcia et al., 2011) per tal d'obtenir els dobles mutants. Es buscaren per PCR els individus *athb4bzip1-D* (CMS19.9) i *hat3bzip1-D* (CMS21.15) mitjançant les combinacions d'oligonucleòtids pertinents (per *BZR1* s'utilitzà NCO11+MSO21 pel wt i NCO11+MSO22 pel mutant).

Un cop obtinguts *athb4bzip1-D* i *hat3bzip1-D*, es van fer experiments d'ombra simulada; pels quals es van sembrar llavors en un medi GM-0.5x segons s'indica a l'apartat

2.1.1. (*figura R2.1 (a)*). En ambdós casos, sota W l'hipocòtil era significativament més curt que en el control, tal com estava descrit pel simple mutant de *bzr1-D* ((He et al., 2005); apartat 2.1.3) (*figura R3.24 (c, d)*). En el tractament d'ombra simulada, els dos dobles mutants presentaven una major elongació de l'hipocòtil en relació al control, contrastant amb la resposta del simple mutant *bzr1-D* que no presentava diferències significatives amb els controls (apartat 2.1.3). Aquests resultats, juntament amb l'anàlisi de variància de dues vies, suggereixen una interacció entre els membres *ATHB4* i *HAT3* pertanyents al HD-ZipII i *BZR1* en quant l'elongació de l'hipocòtil en les respostes SAS.

D'aquest bloc de tesi s'han publicat dos articles:

- Sorin et al., PJ 2009 (Annex),
- Brandt et al., PJ 2012 (Annex)

3

CAPÍTOL IV

Capítol IV: Estudi de la subfamília HD-Zip II

El genoma d'*Arabidopsis* conté 9 o 10 gens pertanyents a la subfamília HD-Zip II (Ariel et al., 2007; Ciarbelli et al., 2008). Per tal d'aprofundir en l'estudi dels quatre més propers a *ATHB4* (*HAT1*, *HAT2*, *HAT3*, *ATHB2*; figura R3.11 (a)), l'expressió dels quals també està alterada per ombra simulada, i alhora assolir l'objectiu general de dissecionar la cascada de transducció del senyal durant la SAS, vam voler caracteritzar aquests factors i estudiar la seva funció durant la resposta a l'ombra. Amb tal finalitat vam seguir una estratègia de genètica inversa, que es basa en la deducció de la funció d'un factor determinat a partir de l'estudi del fenotip dels seus mutants de guany (sobreexpressió) i de pèrdua o reducció de funció.

4.1. Sobreexpressió de HAT1

4.1.1. Caracterització fisiològica:

Prèviament, al grup es va clonar el cDNA de HAT1 en el vector binari pBinAr (vector que es caracteritza per presentar un promotor d'expressió constitutiva, CaMV 35S, i un terminador, OCS-term, els quals permeten l'expressió en plantes del gen insertat al lloc múltiple de clonatge MCS) i es van transformar *Arabidopsis thaliana* per infiltració floral, resultant la construcció P_{35S}:HAT1 (pCS31.05.0) (C. Sorin, resultats sense publicar). Es disposava de llavors T1 d'aquesta construcció, de manera que es procedí amb la selecció de línies amb una sola inserció homozigotes. De tres línies independents de T2, en vam seleccionar 3 de la T3 que eren 100% resistents, i per tant homozigotes per al transgen. Tanmateix, dins aquestes línies hi havia una segregació de dos fenotips diferenciats: plàntules amb un fenotip wt i plàntules més fosques, amb cotiledons més arrodonits i petits (figura R4.1 (a)). Una possible explicació és que la sobreexpressió constitutiva d'aquest factor de transcripció no s'està donant en tots els individus, i que en algunes plàntules HAT1 es troba silenciada.

Per analogia amb el que estava publicat per *HAT2* (Sawa et al., 2002), on els individus presentaven hipocòtils i pecíols llargs, alhora que cotiledons epinàstics, foren aquests individus els que vam agafar com a representants de sobreexpressió de *HAT1*. Basant-nos en aquesta subpoblació, el fenotip en l'estadi de plàntula creixent en llum (W) venia marcat per un hipocòtil més llarg que el control (figura R4.1.(a)), alhora que per una epinàstia dels cotilèdons, que tenien un tamany més petit i arrodonit.

4.1.2. Tractament d'ombra simulada

Es van sembrar plàntules P_{35S}:HAT1 en un medi MS1 segons s'indica a l'apartat 2.1.1. (figura R2.1 (a)). Per congruència amb els resultats previs del grup (capítol III de la

present tesi) dels mutants de guany i pèrdua de funció d'ATHB4 on s'havia treballat amb MS1, vam procedir a realitzar els experiments en aquest medi. En W, les plàntules de sobreexpressió de *HAT1* presentaven un hipocòtil més llarg que el control, i sota tractament W+FR responien menys (figura R4.1.(a)). Els nostres resultats suggereixen que *HAT1* actua com a regulador d'aquest tret de la SAS.

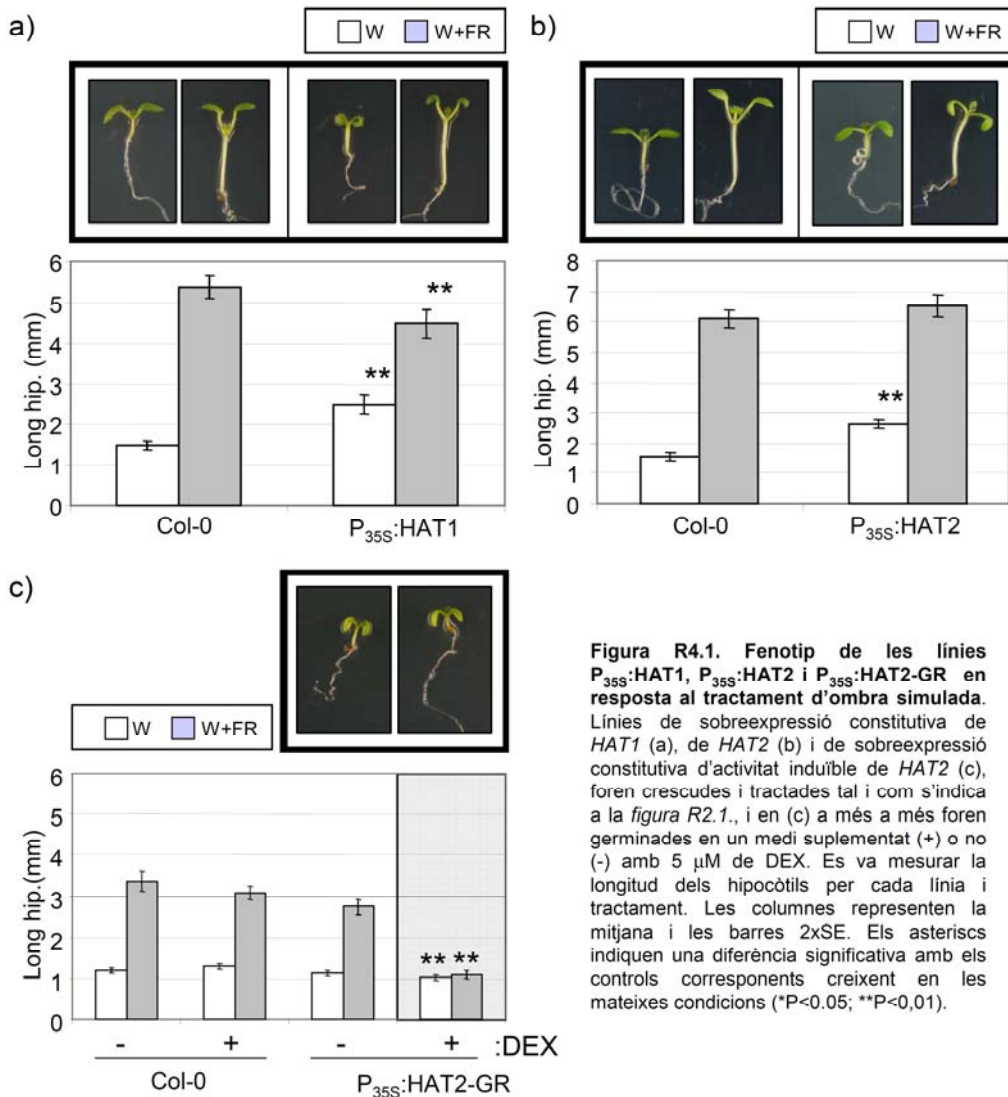


Figura R4.1. Fenotip de les línies *P_{35S}:HAT1*, *P_{35S}:HAT2* i *P_{35S}:HAT2-GR* en resposta al tractament d'ombra simulada. Línies de sobreexpressió constitutiva de *HAT1* (a), de *HAT2* (b) i de sobreexpressió constitutiva d'activitat induïble de *HAT2* (c), foren crescudes i tractades tal i com s'indica a la figura R2.1., i en (c) a més a més foren germinades en un medi suplementat (+) o no (-) amb 5 µM de DEX. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa amb els controls corresponents creixent en les mateixes condicions (**P*<0.05; ***P*<0.01).

4.2. Sobreexpressió de *HAT2*

4.2.1. Caracterització fisiològica:

Ens fou cedida una línia de sobreexpressió constitutiva de *HAT2* (plantes *P_{35S}:HAT2*) pel grup de la Ida Ruberti (Institute of Molecular Biology and Pathology, Roma, Itàlia) (Ciarelli et al., 2008). Es refrescaren les llavors a l'hivernacle per tal de dur a terme

els experiments descrits a continuació. En W aquestes plàntules presenten hipocòtils llargs, cotilèdons epinàstics, peciols llargs i fulles petites arrodonides, fenotip típic dels mutants amb sobreproducció d'auxines (*figura R4.1(b)*) (Sawa et al., 2002).

Paral·lelament, al grup es va clonar el cDNA de *HAT2* fusionat a GR en el vector binari pCS14 (pCS18.22.0), el qual permet l'expressió en plantes del gen inserat sota el control del promotor CaMV 35S, en aquest cas *HAT2-GR*. Es va transformar en *Arabidopsis thaliana* per infiltració floral, resultant la fusió P_{35S}:HAT2-GR. Es disposava de llavors T1 d'aquesta construcció, de manera que es procedí amb la selecció de línies amb una sola inserció i homozigotes per al transgen. Es seleccionaren tres línies independents de les quals, com a mínim, hi havia una T3 100% resistent amb fenotip diferencial quan afegíem DEX al medi.

El fenotip de les plàntules P_{35S}:HAT2-GR crescudes en W i en absència de DEX era igual que el wt crescut en les mateixes condicions, mentre que les plàntules germinades en un medi amb DEX a dia 7 presentaven un hipocòtil més curt que el wt crescut en les mateixes condicions, alhora que els cotilèdons eren epinàstics i arrodonits (*figura R4.1(c)*).

4.2.2. Tractament d'ombra simulada

Es van sembrar plàntules P_{35S}:HAT2-GR i P_{35S}:HAT2 en un medi MS1 segons s'indica a l'apartat 2.1.1. (*figura R2.1 (a)*).

En W, les plàntules de sobreexpressió de HAT2 (P_{35S}:HAT2) presentaven un hipocòtil més llarg que el control (*figura R4.1(b)*), mentre que no presentaven diferències significatives en l'allargament sota tractament W+FR amb el control. Aquests resultats, juntament amb l'anàlisi de variància de dues vies, ens mostren una implicació de HAT2 en el control de les respostes de la SAS.

En W les plàntules de sobreexpressió amb activitat induïble (P_{35S}:HAT2-GR) presentaven el mateix comportament que les wt quan eren crescudes en absència de DEX (*figura R4.1 (c)*), mentre que quan hi afegíem DEX, les plàntules eren significativament més curtes que el wt. Sota el tractament W+FR les plàntules wt i les P_{35S}:HAT2-GR sense DEX responien allargant l'hipocòtil, mentre que quan afegíem DEX al medi les plàntules P_{35S}:HAT2-GR perdien la capacitat de respondre a aquest estímul, mantenint la mateixa llargada de l'hipocòtil que en tractament W. Aquests resultats recolzen la implicació de HAT2 en el control de les respostes a la SAS.

Quan comparàvem les dues línies sobreexpressores vèiem un comportament diferent en l'elongació de l'hipocòtil en W, essent major en P_{35S}:HAT2 que en P_{35S}:HAT2-GR (*figura R4.1 (b, c)*). Aquest fet pot ser degut a diferents motius, per exemple una variació en els nivells d'expressió de HAT2 entre les dues línies, o en un efecte de la sobreexpressió de HAT2 en el desenvolupament de la plàntula previ a la germinació. Tanmateix, l'increment de l'activitat nuclear de HAT2 en resposta a W+FR té el mateix efecte, és a dir, hi ha una reducció de la resposta a la SAS, recolzant així el paper d'aquest gen en aquest tipus de respostes.

Donat que la germinació de la línia P_{35S}:HAT2 no era del 100% i de vegades hi havia plàntules que no mostraven el fenotip descrit (Sawa et al., 2002), es va procedir a realitzar els tractaments hormonal amb la línia P_{35S}:HAT2-GR. Tampoc es realitzaren amb les línies P_{35S}:HAT1 ja que, tal com s'ha comentat anteriorment (*apartat R4.1.*), les línies seleccionades no presentaven un fenotip homogeni.

4.2.3. Tractaments hormonal

Vam estudiar la resposta dels mutants P_{35S}:HAT2-GR a tractaments de BRs (EBL) i d'auxines (PIC). Es van sembrar plàntules en un medi MS1 amb o sense DEX, i es van créixer en W en un medi suplementat amb 0, 0,1 o 1 µM d'EBL; o amb 0, 0,5 o 5 µM de PIC. en dia 7 es va mesurar la llargada dels hipocòtils (*figura R4.2 (a, b)*).

EBL: Les línies de sobreexpressió P_{35S}:HAT2-GR mostraven una lleugera hipersensibilitat a dosis intermèdies d'EBL (0,1 µM) (*figura R4.2 (a)*), ja que en absència de l'hormona l'hipocòtil era lleugerament més curt i quan hi aplicàvem l'EBL aquest responia més. Tanmateix, en dosis elevades d'aquesta hormona (1 µM) no hi havia diferències significatives d'elongació de l'hipocòtil. Aquests resultats suggereixen que HAT2 no estaria implicat en el control de l'allargament de l'hipocòtil induït per BRs.

PIC: Les línies de sobreexpressió P_{35S}:HAT2-GR presentaven una resposta reduïda a auxines, tant a dosis intermèdies (0,5 µM) com a dosis elevades (5 µM) (*figura R4.3 (b)*), confirmant la implicació de HAT2 en les respostes a auxines (Sawa et al., 2002).

Cal ressaltar que, malgrat les diferències, l'aplicació exògena d'aquestes hormones té un efecte inductor de l'allargament de l'hipocòtil de les plàntules de les línies amb alta activitat nuclear de HAT2, el que contrasta amb l'anulació de l'efecte inductor de l'ombra simulada.

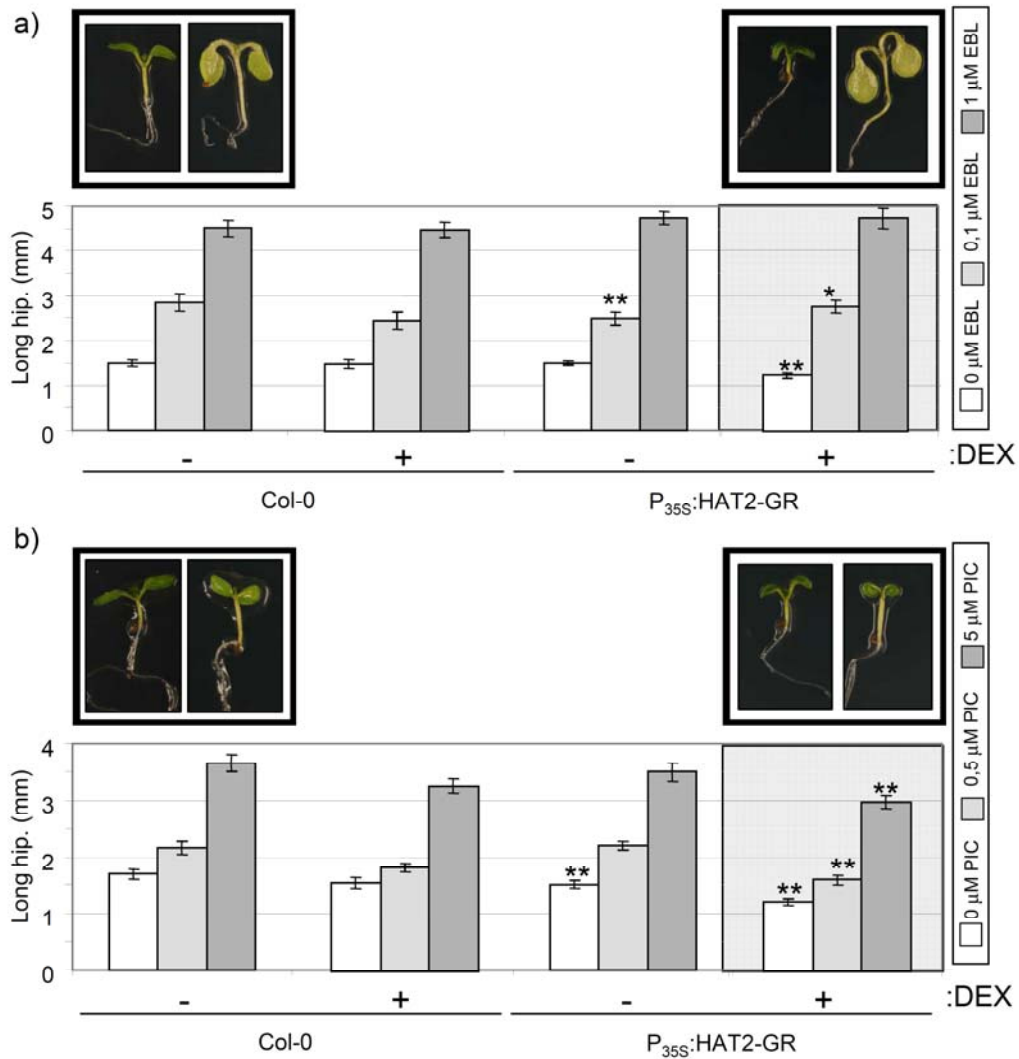


Figura R4.2. Fenotip de la línia P_{35S}:HAT2-GR en resposta al tractament de BRs i Aux. Allargament de l'hipocòtil de la línia de sobreexpressió constitutiva d'activitat induïble de *HAT2* sota tractament d'epibrassinolida (EBL) (a) i de picloram (PIC) (b). Les plàntules foren germinades en un medi suplementat (barres grises) o no (barres blanques) amb 0,1 i 1 μM de EBL o 0,5 i 5 μM de PIC; amb (+) o sense (-) 5 μM de DEX des del primer dia. Les línies transgèniques i les wt foren crescudes durant set dies en W. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa amb els controls corresponents creixent en les mateixes condicions (*P<0,05; **P<0,01).

4.3. Pèrdua de funció de *HAT1* i *HAT2*

4.3.1. Caracterització fisiològica:

Es van demanar mutants simples de *HAT1* i *HAT2* de la col·lecció de mutants del SALK (*HAT1*, línia Salk_059835, d'ara en endavant anomenada *hat1-1*; *HAT2*, línia Salk_0147145, d'ara en endavant anomenada *hat2-1*; figura R4.3(a)). Les llavors rebudes es van sembrar per membres anteriors del grup a terra i quan les plantes es trobaven en estadi de roseta se'n va extreure DNA genòmic i es van genotipar analitzant la presència del T-DNA per PCR amb els primers adients. Aquelles plantes

que presentaven el transgen en homozigosi van ser seleccionades i utilitzades per als posteriors experiments moleculars i fisiològics.

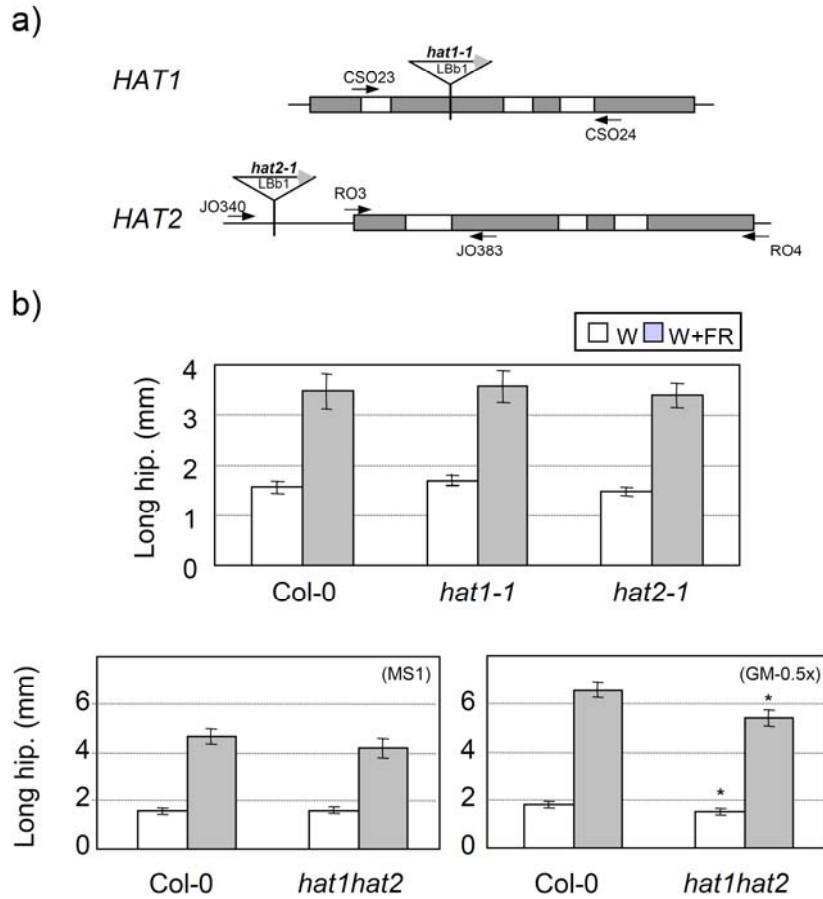


Figura R4.3. Fenotip de les línies de pèrdua de funció de HAT1 i/o HAT2 en resposta al tractament d'ombra simulada. (a) Representació esquemàtica de la seqüència genòmica de *HAT1* i *HAT2* i la inserció de T-DNA en *hat1-1* i *hat2-1*. Les combinacions d'oligonucleòtids utilitzats per a genotipar les plantes en base a la presència/absència de la inserció de T-DNA foren CSO23+CSO24 i LBb1+CSO24 per *hat1-1*; JO340+JO383 i LBb1+JO383 per *hat2-1*. (b) Línies transgèniques *hat1-1*, *hat2-1* i *hat1hat2* foren crescudes i tractades tal i com s'indica a la figura R2.1. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa amb els controls corresponents creixent en les mateixes condicions (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). Els experiments foren duts a terme en un medi MS1, a excepció del doble mutant on s'hi indica el canvi de medi a un GM-0.5x.

Anteriors membres del grup van analitzar per *northern-blot* l'expressió de *HAT1* i *HAT2* en plantes homozigotes per la mutació (Sorin et al., 2009, S4), comprovant que no hi havia expressió d'aquests gens en els mutants. Tal i com passava amb altres membres de la mateixa subfamília II dels HD-Zip (*athb4*, *hat3*; capítol III de la present tesi), els mutants simples no presentaven cap fenotip obvi ni a nivell de plàntula ni al ser cultivats a l'hivernacle (figura R4.3(b)). Donat que *HAT1* és paràleg de *HAT2*

(figura R3.11(a)), vam decidir obtenir el doble mutant *hat1-1 hat2-1* (*hat1hat2* a partir d'ara) mitjançant creuament. Al contrari que en plàntules *athb4hat3*, les plantes dobles mutants *hat1hat2* no presentaven cap fenotip aparent en W (figura R4.3(c)).

4.3.2. Tractament d'ombra simulada

Es van sembrar plàntules *hat1-1*, *hat2-1* i *hat1hat2* en un medi MS1 segons s'indica a l'apartat 2.1.1. (figura R2.1 (a)). En aquest medi, els mutants simples presentaven el mateix comportament que les plàntules control tant en W com en W+FR en quant a l'allargament del hipocòtil (figura R4.3.(b)). El doble mutant *hat1hat2* en el mateix medi tampoc presentava diferències significatives amb el control (figura R4.3.(c)).

Tot els experiments relacionats amb membres pertanyents a HD-ZipII es van realitzar en un medi MS1 per coherència amb resultats previs del grup amb aquesta subfamília (Sorin et al., 2009). La sucrosa és important en la resposta de l'elongació de l'hipocòtil, ja que suprimeix l'allargament d'aquest sota W i l'estimula en fosc (Zhang et al., 2010); alhora que redueix la resposta a W+FR (Liu et al., 2011). Per aquesta raó ens vam plantejar comprovar si el comportament de les línies dobles mutants *hat1hat2* era semblant en un medi amb (MS1) o sense (GM-0,5x) sucrosa.

En GM-0.5x, plàntules del doble mutant *hat1hat2* presentaven un hipocòtil lleugerament més curt en W que el de Col-0, mentre que en W+FR responien menys (figura R4.3.(c)). Els nostres resultats, juntament amb l'anàlisi de variància de dues vies, suggereixen que en un medi sense sucrosa (GM-0,5x) el doble mutant *hat1hat2* respon menys a ombra simulada.

Aquests resultats indiquen que la pèrdua de funció dels gens *HAT1* i *HAT2* individualment no provoca un fenotip a la planta quan aquesta és cultivada en W ni quan és sotmesa a ombra simulada, degut possiblement a l'alta redundància gènica de la família. En canvi, el doble mutant *hat1hat2* sí mostra un fenotip subtil però consistent tant quan és cultivat en W com en W+FR, i que s'observa només quan al medi li manca sucrosa. D'aquesta manera, i integrant resultats d'apartats anteriors de la tesi, podem postular que una reducció en l'activitat ATHB/HAT resulta en un creixement i elongació subòptims de l'hipocòtil.

4.4. Sobreexpressió d'ATHB2

4.4.1. Caracterització fisiològica:

Disposàvem d'una línia de sobreexpressió d'ATHB2, anomenada P_{35S}:ATHB2. Aquesta línia fou cedida per grup de la Dra. Ida Ruberti (Ciarbelli et al., 2008). Les línies de sobreexpressió d'ATHB2 presenten hipocòtils més llargs, cotiledons i fulles més petites, i un sistema radicular més prim (Schena et al., 1993). Alhora l'expansió dels cotiledons es veu significativament reduïda en comparació amb els controls (Steindler et al., 1999). Es van refrescar llavors i es va procedir a realitzar els tractaments descrits a continuació.

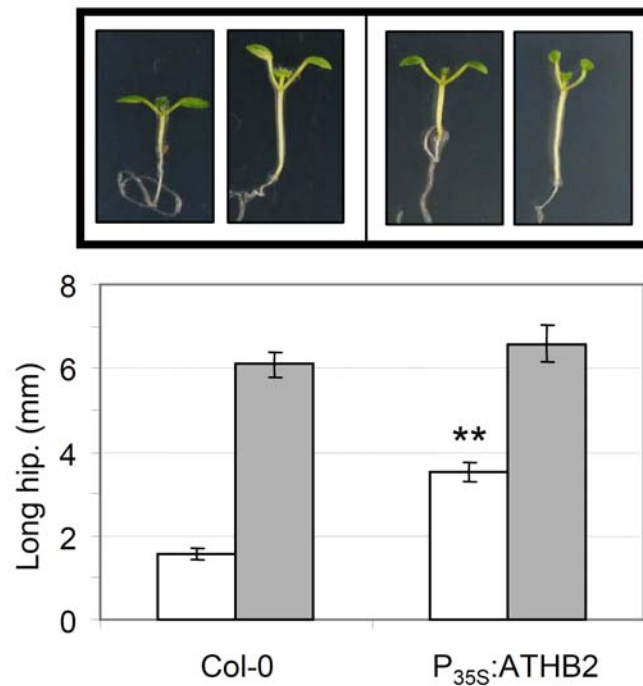


Figura R4.4. Fenotip de la línia P_{35S}:ATHB2 en resposta al tractament d'ombra simulada. Les plàntules foren crescudes i tractades tal i com s'indica a la figura R2.1 en un medi GM-0,5x. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa amb els controls corresponents creixent en les mateixes condicions (*P<0,05; **P<0,01).

4.4.2. Tractament d'ombra simulada

Es van sembrar plàntules P_{35S}:ATHB2 en un medi GM-0.5x segons s'indica a l'apartat 2.1.1. (*figura R2.1 (a)*).

En condicions W, els hipocòtils de les plàntules sobreexpressants eren significativament més llargs (*figura R4.4.*), consistentment amb el que hi havia publicat anteriorment (Ciarbelli et al., 2008). Per contra, sota un tractament W+FR, l'allargament d'aquests no fou significativament diferent de les plàntules control. L'anàlisi de variància de dues vies mostra una reducció de la resposta significativa (pvalor $\leq 0,01$). Aquests resultats ens mostren una implicació d'ATHB2 en el control de les respostes de la SAS.

3

CAPÍTOL V

Capítol V: Senyalització espai-temporal entre els òrgans de la planta

Per estudiar les respostes a nivell molecular de la SAS en *Arabidopsis* l'anàlisi més comunament utilitzat és a nivell de plàntula sencera. Tanmateix, els models que descriuen l'acció dels fitocroms, els seus interactors i el seu efecte en l'expressió gènica normalment són restringits a nivell cel·lular. De fet, en un context de fotomorfogènesi mediada per fitocroms és obvi que aquestes xarxes reguladores a nivell transcripcional estan situades en un context multicel·lular, on no totes les cèl·lules estan expressant els mateixos gens al mateix temps ni responen al mateix estímul de llum de la mateixa manera (Bou-Torrent et al., 2008; Chandler et al., 2009; Josse et al., 2008; Montgomery, 2008).

En el context de plàntula sencera, la percepció d'ombra simulada implica almenys dos passos: a) **senyalització intracel·lular**, que es refereix als canvis que tenen lloc a dins de la cèl·lula iniciats per molècules de fitocrom després de la percepció de la baixa proporció R:FR i b) **senyalització intercel·lular**, que es refereix als canvis mesurables de creixement i desenvolupament, que tenen lloc en cèl·lules o teixits diferents dels que han percebut la senyal lumínica. La distinció entre els dos tipus de senyalització espacial implica que els llocs de percepció i d'acció de la llum poden estar físicament separats en la planta, i remarca la importància de la comunicació entre cèl·lules i òrgans (és a dir, a llarga distància) per entendre completament com el desenvolupament vegetal és regulat per la llum durant les respostes de la SAS (Bou-Torrent et al., 2008; Martínez-García et al., 2010).

En la mostassa (*Sinapis alba*), l'allargament de l'epicòtil és induït després de la irradiació de la plàntula sencera amb ombra simulada o amb EOD-FR. Tanmateix, la irradiació localitzada només de les fulles primàries també produeix el creixement de l'epicòtil. Aquests experiments suggereixen que existeixen senyals difusibles generades per l'estímul d'ombra a les cèl·lules irradiades (les fulles primàries, que serien el lloc de percepció de la llum) i es transmet en la distància a cèl·lules de resposta en un òrgan diferent (el lloc d'acció de la llum) (Casal and Smith, 1988; Martínez-García et al., 2010; Morgan et al., 1980).

Consistentment, l'eliminació dels cotiledons d'*Arabidopsis thaliana* abans de l'inici del tractament diferencial amb W+FR abolia l'allargament de l'hipocòtil induït per l'ombra simulada, indicant la importància dels cotiledons per aquesta resposta; fins i tot en plàntules que mostren una resposta constitutivament activa a la SAS, com són els

mutants *phyB*, l'eliminació dels cotilèdons reduïa la llargada de l'hipocòtil en plàntules de dia 7, amb o sense tractament d'ombra simulada (*figura R5.1 (a)*).

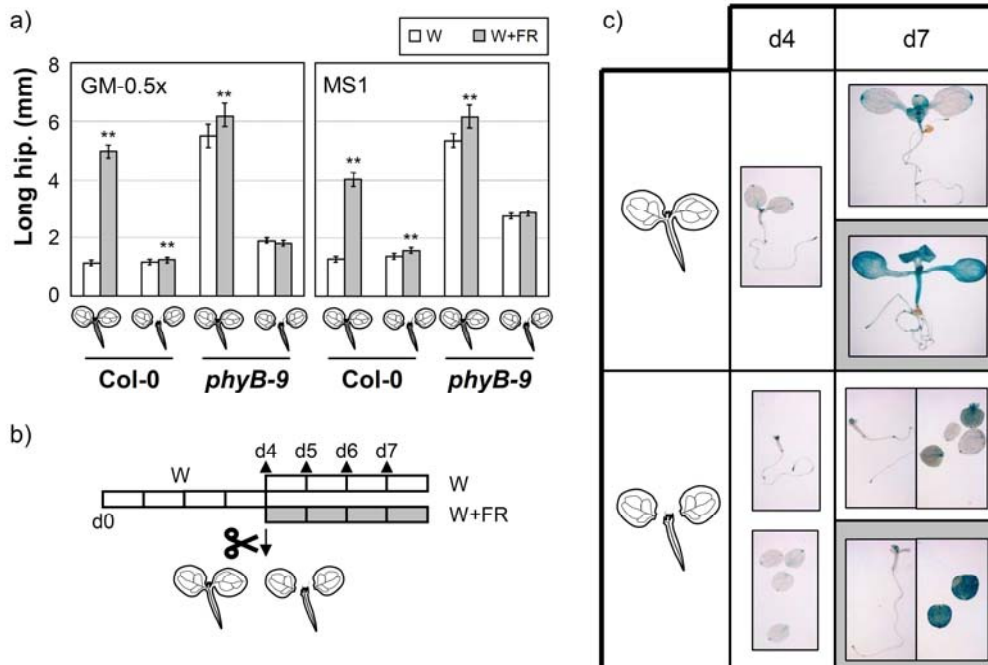


Figura R5.1. Efecte de la presència dels cotilèdons en l'allargament de l'hipocòtil en resposta al tractament d'ombra simulada. (a) Línies Col-0 i *phyB-9* foren crescudes en W durant quatre dies, quan es va procedir a tallar els cotilèdons (☉) o no (☿). Seguidament, la meitat de les plaques es van transferir a llum W+FR i l'altra meitat es van mantenir en W durant cinc dies més. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa entre la presència/absència de cotilèdons de cada situació experimental (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). **(b)** Esquema de l'experiment on es creixen plàntules DR5:GUS durant quatre dies en W i llavors una part de la població experimental es manté sense cap lesió i una altra part pateix la lesió d'ambdós cotilèdons en dia quatre. Les plàntules són mantingudes en W (quadres blancs) o en W+FR (quadres grisos) durant 3 dies més, on es prenen mostres a dia quatre, cinc, sis i set (▲). **(c)** Tinció GUS de l'experiment de l'apartat anterior en plàntules de dia quatre i de dia set, amb la presència/absència dels cotilèdons.

Hem de tenir en compte que la presència de sucrosa en el medi és important per l'elongació de l'hipocòtil, tant en condicions de llum, on s'inhibeix el creixement i el desenvolupament de les plàntules (Liu et al., 2011; Moore et al., 2003; Rolland and Sheen, 2005; Zhang et al., 2010), com en fosc, on la sucrosa exerceix un efecte oposat induint l'elongació de l'hipocòtil (Zhang et al., 2010). Experiments realitzats al laboratori amb plàntules Col-0 i *phyB-9* on s'eliminaren els cotilèdons en dia 4, i es mantenen a W o es transferiren a W+FR en medis amb presència o absència de sucrosa mostren que malgrat aquesta tenia un efecte en l'elongació, era més important l'efecte dels cotilèdons ja que en ambdós medis l'allargament de l'hipocòtil es veia reduït quan mancaven els cotilèdons (*figura R5.1 (a)*). A més, com que en plàntules crescudes en llum els cotilèdons tenen probablement un paper principal en la

producció de fotoassimilats, els nostres resultats indiquen que la manca d'allargament dels hipocòtils sense cotilèdons no és deguda a una limitació en la quantitat de fotoassimilats, sinó d'alguna senyal produïda en els cotilèdons.

Tincions histoquímiques de l'activitat GUS de plàntules de la línia marcador DR5:GUS fetes al laboratori mostraven una tinció restringida a les fulles primàries i als hidatodes¹ en W, mentre que aquesta s'incrementava als cotilèdons, fulles primàries i hipocòtil en tractament W+FR ((Tao et al., 2008); Irma Villanova-Roig, tesi doctoral 2007), suggerint que l'activitat GUS de l'hidatode podria estar relacionada amb la tinció posterior al conjunt del cotilèdon. Plàntules DR5:GUS sotmeses al mateix tipus de separació de cotilèdons descrit anteriorment mostraven una major tinció als cotilèdons enfront als hipocòtils, sobretot després d'un tractament d'ombra simulada (*figura R5.1 (b,c)*). Les fulles primàries, per contra, presentaven una dràstica reducció del seu desenvolupament, i com a conseqüència una menor activitat GUS, en ambdós tractaments W i W+FR quan els cotilèdons no hi eren presents. Aquests resultats suggereixen que els cotilèdons són necessaris per a l'allargament de l'hipocòtil en resposta a ombra simulada.

Tal i com s'ha descrit a la introducció, els fitocroms estan presents en tots els teixits analitzats (Sharrock and Mathews, 2006), i en el context de plàntula sencera. Aquest fet, recolza la hipòtesi que el fitocrom modula xarxes transcripcionals de manera diferencial en funció dels òrgans de la plàntula i del temps. Dades de perfils transcriptòmics en arrels, hipocòtils i cotilèdons de plàntules d'*Arabidopsis* mostren patrons d'expressió de diferents gens PIFs i d'un grup de dianes primerenques de l'acció del fitocrom durant la SAS diferents de plàntules crescudes en llum (Bou-Torrent et al., 2008; Ma et al., 2005). En el cas dels factors de transcripció HD-Zip amb un paper en la SAS, plàntules transgèniques que expressen un gen reporter conduït per 1kb de la regió promotora d'ATHB2 i d'ATHB4 (línies P_{ATHB2}:GFP-GUS i P_{ATHB4}:GFP-GUS, respectivament) mostren una distribució espacial restringida i diferent entre ambdues construccions (Martínez-García et al., 2010). Degut a que l'expressió d'aquests gens és ràpidament induïda per ombra simulada, aquestes observacions suporten la hipòtesi exposada anteriorment, és a dir, que després de la percepció d'una baixa raó R:FR les xarxes transcripcionals que involucren a la SAS ràpidament divergeixen de forma específica en cèl·lules o òrgans, resultant

¹ hidatode: [bot] Òrgan situat generalment a les fulles i que secreta aigua. Els hidatodes poden ésser unicel·lulars, formats per una cèl·lula epidèrmica transformada que presenta una prolongació a través de la qual surt l'aigua, o pluricel·lulars, constituïts per un teixit parenquimàtic especialitzat anomenat *epitema* i per una obertura d'eixida d'aigua anomenada *estoma aquífer*. Pels hidatodes té efecte la *gutació*.

eventualment en diferents respostes dels òrgans al mateix tipus d'estímul (Bou-Torrent et al., 2008).

Per tots aquests motius ens vam plantejar analitzar el paper de diferents òrgans d'*Arabidopsis thaliana* en les respostes SAS i hormonals, mitjançant dues aproximacions: eliminacions o lesions físiques i mutants deficientes en determinats òrgans.

5.1. Paper dels cotilèdons en l'allargament de l'hipocòtil en tractaments hormonals i d'ombra simulada

5.1.1. Cotilèdons en la resposta de l'hipocòtil a la SAS i la seva relació amb la senyalització per auxines

El paper de les auxines a la SAS és important, ja que s'ha descrit que el seu transport és imprescindible per a una correcta resposta (Kanyuka et al., 2003; Morelli and Ruberti, 2000; Steindler et al., 1999; Vanneste and Friml, 2009). Està descrit que una baixa raó R:FR indueix l'expressió de força gens coneguts de resposta a auxines a través del metabolisme d'auxines induït per citoquinines (Carabelli et al., 2007; Kurepin et al., 2012). Donat que hi ha síntesi d'auxines a la part apical de les fulles joves en desenvolupament, amb un posterior transport basipètal cap a la punta de l'arrel (Chandler et al., 2009), ens vam plantejar si les auxines que arribaven a través dels cotilèdons eren les responsables d'un creixement diferencial de l'hipocòtil.

Prèviament al grup ja s'havia corroborat que els cotilèdons estaven involucrats en la senyal de creixement de l'hipocòtil (*figura R5.1*), sobretot en quant a les respostes a la SAS. Per tal de relacionar el transport d'auxines a través d'aquests amb l'elongació de l'hipocòtil principalment en resposta a la SAS, i tenint en compte la importància de la presència / absència dels cotilèdons com a fonts d'aquesta hormona, vam dissenyar un experiment on s'eliminava un o els dos cotilèdons i s'observava el creixement de l'hipocòtil al llarg del temps. Per complementar aquestes dades amb el paper que podien jugar els cotilèdons en l'allargament de l'hipocòtil induït per altres hormones, es va realitzar el mateix tipus d'experiment descrit amb l'aplicació de EBL i GA₃ (apartat 5.1.2.).

Es va dissenyar un experiment on vam tallar un, els dos o cap cotilèdon en plàntules Col-0 de dia 4 en un medi GM-0,5x, i vam transferir les plantes fins a dia 8 a W (*figura R5.2 (a)*) o a W+FR (*figura R5.2 (b)*). Es van prendre fotografies individu per individu en condicions estèrils en dia 5 i en dia 8, partint d'una població de 10 individus per cada condició experimental, per tal de poder seguir el creixement de l'hipocòtil.

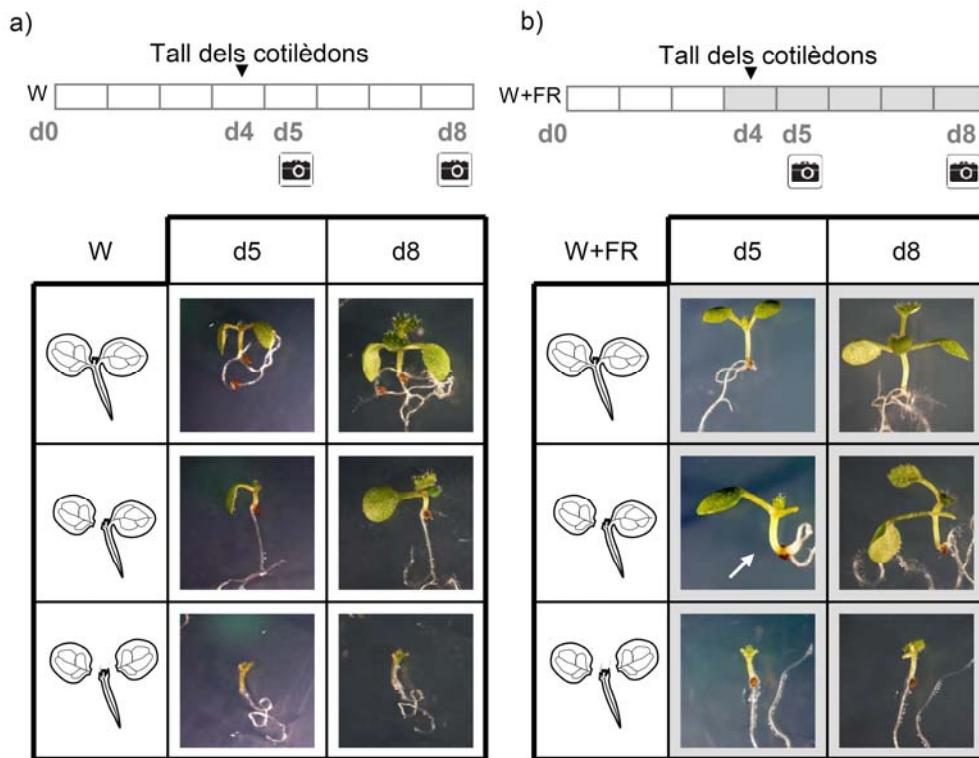


Figura R5.2. Efecte de la presència dels cotilèdons en la curvatura de l'hipocòtil en resposta al tractament d'ombra simulada. Plàntules Col-0 van ser crescudes en W durant quatre dies, i llavors vam tallar un, dos o cap cotilèdon en condicions estèrils. Les plàntules es van mantenir en W (**a**) o es van transferir a W+FR (**b**). Es van realitzar fotografies en dia cinc i vuit dels mateixos individus, observant-se una major curvatura en determinats casos (fletxa blanca).

A **nivell fisiològic** sota condicions W, les plàntules sense cap cotilèdon, així com les que només en tenien un, presentaven el mateix tipus de creixement de l'hipocòtil que les plàntules intactes, suggerint que en aquestes condicions no semblava haver-hi un creixement diferencial produït pels cotilèdons (*figura R5.2 (a)*). Sota condicions W+FR, el creixement de l'hipocòtil s'indueïa clarament en la plàntula sencera; les plàntules de dia 5 que tenien només un cotilèdon presentaven una certa curvatura de l'hipocòtil, produint-se probablement per un major creixement en la zona de l'eix central de l'hipocòtil en contacte amb el cotilèdon (fletxa blanca en la *figura R5.2 (b)*). Per contra, aquest fet no s'observà quan hi mancaven els dos cotilèdons. Aquests resultats suggereixen que hi ha una senyalització d'auxines provinent dels cotilèdons que causa

l'allargament de l'hipocòtil; fet que es visualitza en plàntules amb només un cotilèdon sota tractament W+FR.

Per comprovar com afectava a **nivell molecular** a la distribució d'auxines la lesió d'un cotilèdon després d'un tractament de SAS, vam procedir a fer el mateix experiment però amb la línia marcadora d'auxines DR5:GUS. Es van germinar llavors en W i se'ls hi va eliminar un, els dos o cap cotilèdon en dia 4. Immediatament després van ser sotmeses a W o W+FR durant un període de 48h, al llarg del qual es van prendre mostres a les 0, 4, 8, 12, 24 i 48 hores després de la lesió i del tractament lumínic; sotmetent-les a una posterior tinció histoquímica GUS (*figura R5.3, figura R5.4*).

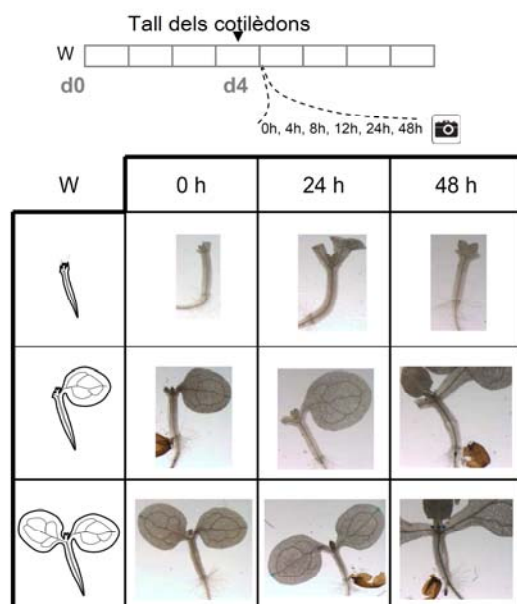


Figura R5.3. Efecte de la presència dels cotilèdons en la distribució espai-temporal d'activitat GUS en W. Plàntules DR5:GUS foren crescudes i tractades tal i com s'indica a la *figura R5.2 (a)*. Es va realitzar una tinció GUS després de 0, 4, 8, 12, 24 i 48h de la lesió dels cotilèdons en dia quatre.

Sota tractament W no vam detectar diferències en la tinció GUS fos quina fos la lesió realitzada, destacant que aquesta era molt tènue al llarg del temps i situacions experimentals estudiades (*figura R5.3*), localitzant-se a la zona de l'hidatode dels cotilèdons i a les fulles primàries.

En condicions de W+FR i a la plàntula sencera, la tinció GUS s'iniciava en els cotilèdons (4h) i posteriorment es detectava cap a l'inici de l'hipocòtil (especialment a les 4, 8 i 12 hores després del tractament)(*figura R5.4*). Quan s'eliminava un cotilèdon,

l'activitat GUS es detectà al cotilèdon restant i continuava per l'hipocòtil per la zona propera a aquest seguint el mateix patró que el cas anteriorment descrit. Tanmateix, quan no hi havia cotilèdons no hi havia la tinció GUS a l'hipocòtil, el que suggeriria l'absència d'una senyal d'auxines provinent de la zona superior (exceptuant la zona basal d'aquest). Aquests resultats ens porten a suggerir un paper important de les auxines provinents dels cotilèdons en la senyalització de l'allargament de l'hipocòtil en resposta l'estímul de l'ombra simulada.

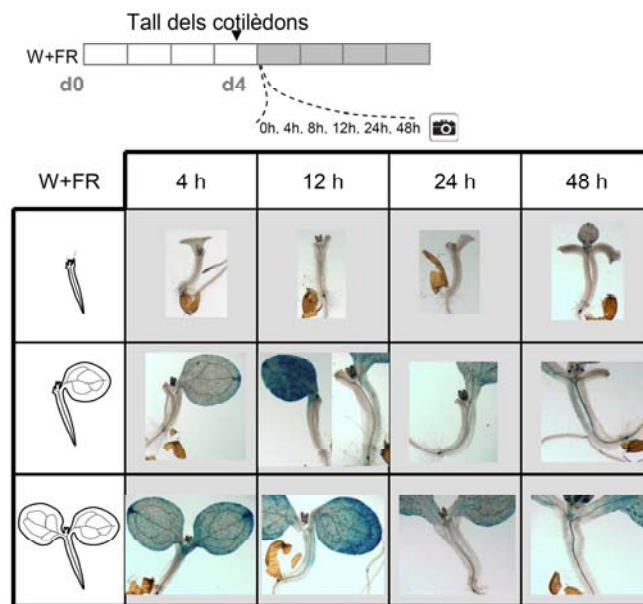


Figura R5.4. Efecte de la presència dels cotilèdons en la distribució espai-temporal d'activitat GUS en W+FR. Plàntules DR5:GUS foren crescudes i tractades tal i com s'indica a la figura R5.2 (b). Es va realitzar una tinció GUS després de 0 (figura R5.3), 4, 8, 12, 24 i 48h de la lesió dels cotilèdons en dia quatre coincident amb l'inici del tractament diferencial amb W+FR.

5.1.2. Cotilèdons en la resposta de l'hipocòtil a tractaments hormonals de BRs o GAs

Per poder aprofundir en el paper de les hormones en l'allargament de l'hipocòtil a través dels cotilèdons vam fer el mateix experiment que a l'apartat anterior, però transferint les plàntules a medis amb o sense hormona, i en dia 7 vam mesurar l'hipocòtil. Les hormones aplicades foren dos: brassinosteroides (EBL) i giberel·lines (GA_3) (figura R5.5 (a)).

Quan s'aplicava EBL o GA_3 al medi, l'hipocòtil de plàntules senceres s'allargava tal i com estava descrit en anteriorment (apartat 2.1.2.). En el cas de l'EBL, quan

mancaven els cotilèdons, l'hipocòtil encara tenia capacitat per respondre a l'aplicació exògena d'hormona, allargant-se significativament més que quan no tenia EBL al medi (*figura R5.5. (b)*); tanmateix, l'allargament era menor que el de la plàntula sencera. Quan aplicàvem GA₃ al medi es produïa una elongació dels hipocòtils una mica més gran que sense la hormona, i quan mancaven els cotilèdons, l'hipocòtil perdia la capacitat de resposta a l'aplicació exògena de GA₃. Aquests darrers resultats suggereixen un possible paper dels cotilèdons en la resposta a GAs a través d'aquests òrgans, malgrat hem de tenir en compte que la resposta de l'hipocòtil a aquesta hormona és molt subtil.

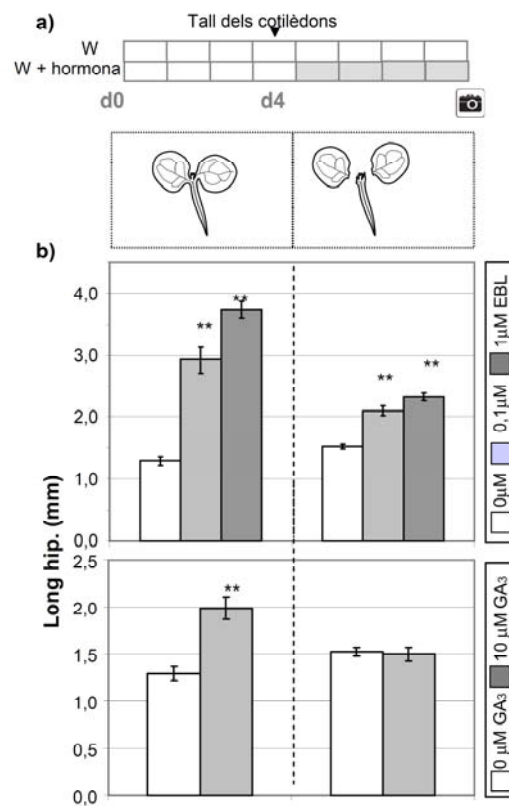


Figura R5.5. Efecte de la presència dels cotilèdons en l'allargament de l'hipocòtil en resposta a l'aplicació exògena d'EBL i GA₃. (a) Plàntules Col-0 foren crescudes en W durant quatre dies, quan es va procedir a tallar els cotilèdons a la meitat de la població. Seguidament, les plàntules es van transferir a un medi GM-0.5x sense hormona (barres blanques) o en un medi amb EBL o GA₃ durant quatre dies més. (b) Allargament de l'hipocòtil en resposta a l'aplicació exògena d'hormona a partir de dia quatre en plàntules senceres (esquerra) o en plàntules amb els cotilèdons lesionats (dreta). Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa amb el control corresponent creixent en un medi sense hormona (*P<0.05; **P<0,01).

Els nostres resultats indiquen que els cotilèdons, tot i ser necessaris per una correcta elongació de l'hipocòtil en resposta a hormones, no són essencials per a l'allargament d'aquest òrgan. També ens suggereixen que la manca de resposta dels hipocòtils al tractament d'ombra simulada en plàntules a les que se'ls ha eliminats els cotilèdons no és deguda a la pèrdua intrínseca d'aquest òrgan de la capacitat d'allargament.

5.1.3. Importància de la lesió *versus* la manca de cotilèdons en la resposta de l'hipocòtil a tractaments hormonal o d'ombra simulada

En els apartats anteriors hem vist que els cotilèdons tenen un paper important en l'elongació de l'hipocòtil en la resposta a estímuls hormonal i d'ombra simulada; i hem pogut observar més concretament que en resposta al tractament amb ombra simulada l'activitat d'auxines s'incrementava a la zona de l'hidatode dels cotilèdons i va avançant fins arribar a l'hipocòtil. Partint d'aquests resultats previs, vam plantejar-nos si aquesta alteració de l'allargament de l'hipocòtil era deguda a la manca de cotilèdons o a la lesió *per se* produïda. Per dur-ho a terme vam procedir a realitzar 3 lesions diferents als cotilèdons: la primera fou el tall sencer dels cotilèdons, deixant a la plàntula sense aquests; la segona fou una lesió a la zona apical on hi ha l'hidatode; i la tercera fou una lesió a la zona lateral sense tocar el feix vascular principal del cotilèdon (*Figura R5.6 (a)*). Les lesions es van realitzar en condicions d'esterilitat i amb l'ajuda d'una lupa, degut al petit tamany del material vegetal. Les plàntules foren germinades, crescudes i manipulades tal i com s'indica a la *figura R5.5.(a)*.

- **Auxines (picloram)**

Per poder complementar l'observació de les respostes fisiològiques d'allargament de l'hipocòtil amb dades a nivell molecular, vam realitzar els experiments amb plàntules DR5:GUS.

A **nivell fisiològic** podem veure que quan no hi havia cotilèdons l'elongació de l'hipocòtil es veia pràcticament abolida, en comparació a l'elongació que hi havia quan aplicàvem PIC exògen a la plàntula sencera (*figura R5.6 (b)*). Els dos tipus de lesió de cotilèdon esmentats, l'apical i el lateral, permetien un allargament de l'hipocòtil intermig entre els dos casos anteriors. Aquests resultats ens porten a concloure que malgrat l'efecte de les lesions sí influeix desembocant en una reducció de la resposta a auxines, és la manca de cotilèdons la que en redueix la capacitat de resposta.

A **nivell molecular**, quan plàntules DR5:GUS es creixien en absència d'hormona observàvem activitat GUS tènue als hidatodes i a les fulles primàries en les quatre condicions experimentals esmentades (*figura R5.6 (c)*). En plàntules senceres, sota un tractament amb PIC hi havia una inducció en els cotilèdons i fulles primàries, tal i com havíem vist anteriorment per als tractaments d'ombra simulada (apartat 5.1.1.). Quan mancaven els cotilèdons, no es detectava activitat de la proteïna GUS a l'hipocòtil, malgrat aquesta era molt marcada als cotilèdons aïllats. En el cas de lesions apicals i laterals podíem observar el mateix comportament que les plàntules senceres, és a dir, hi havia una inducció de l'activitat GUS fortament marcada als cotilèdons, que baixava per l'hipocòtil (*figura R5.6 (c)*). Aquests resultats ens suggereixen que l'hipocòtil té capacitat de resposta a picloram principalment via cotilèdons.

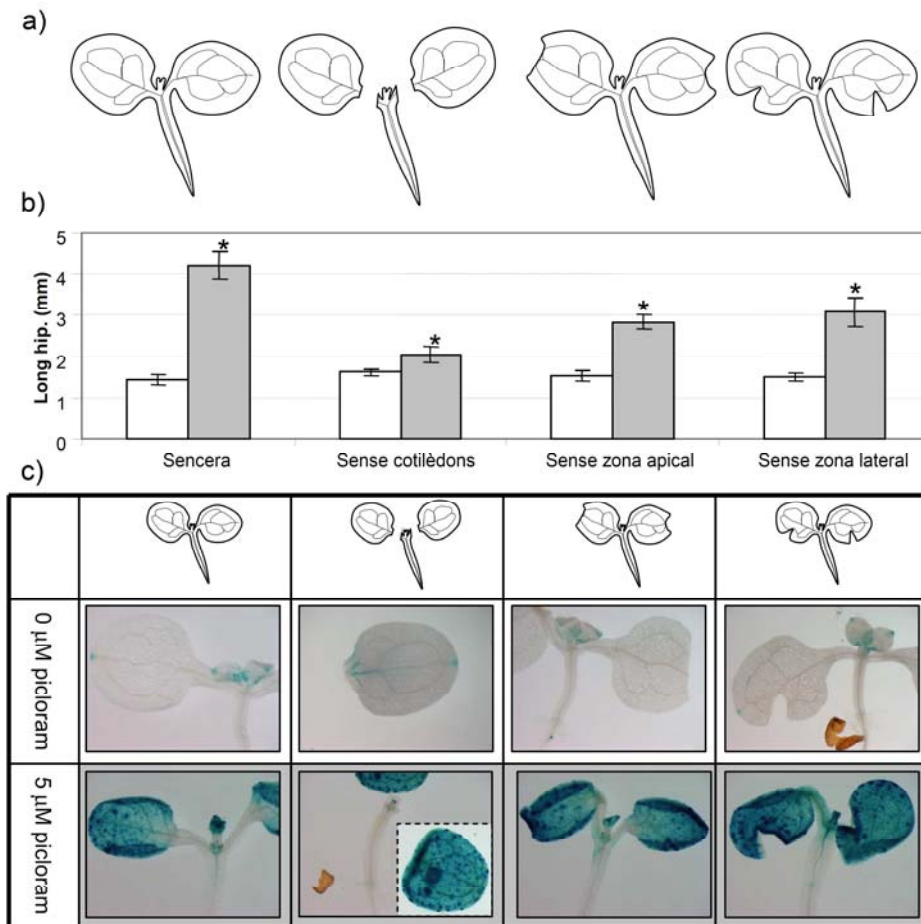


Figura R5.6. Efecte de la presència o lesió dels cotilèdons en l'allargament de l'hipocòtil en resposta a l'aplicació exògena de PIC i efecte en la distribució espacial de l'activitat GUS. Plàntules DR5:GUS van ser crescudes i tractades tal com s'indica a la *figura R5.5 (a)*, transferint-les en un medi 0 μM o 5 μM de PIC. **(a)** Lesions dutes a terme en les plàntules, que es dividiren en tres: plàntules sense cap dels dos cotilèdons, plàntules on es va tallar la zona de l'hidatode dels dos cotilèdons –sense zona apical–, i plàntules on es va lesionar la zona lateral dels cotilèdons, sense arribar a lesionar els feixos vasculars centrals –sense zona lateral–. **(b)** Allargament de l'hipocòtil en resposta a l'aplicació exògena de PIC a partir de dia quatre en plàntules senceres (esquerra) o en plàntules amb els cotilèdons amb diferents lesions (els tres blocs de la dreta). Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa amb el control corresponent creixent en un medi sense hormona (*P<0,05; **P<0,01). **(c)** Tinció GUS de les plàntules tractades a (b).

- **Ombra simulada**

Plàntules Col-0 sotmeses a les tres lesions esmentades mostraven una reducció en la resposta W+FR (*figura R5.7 (a)*), resultats que indiquen que el cotilèdon intacte és necessari per donar una resposta normal a ombra simulada.

- **BRs (EBL)**

L'hipocòtil era capaç d'elongar-se després de l'addició exògena d'hormona quan no hi havia cotilèdons, o quan aquests presentaven lesions apicals o laterals (*figura R5.7 (b)*). Tanmateix, l'allargament de l'hipocòtil en resposta a l'aplicació d'EBL quan mancaven els cotilèdons era menor que en els altres dos casos, suggerint una implicació dels cotilèdons en l'elongació de l'hipocòtil per BRs.

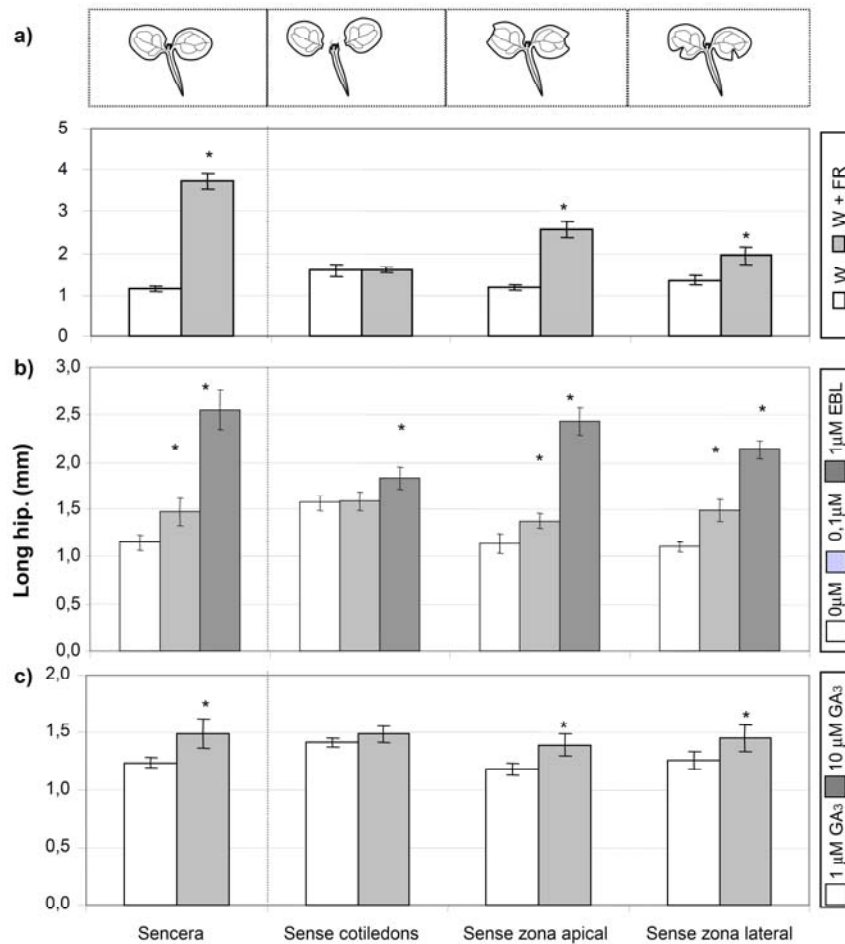


Figura R5.7. Efecte de la presència o lesió dels cotilèdons en l'allargament de l'hipocòtil en resposta al tractament d'ombra simulada i a l'aplicació exògena d'EBL i GA₃. Plàntules Col-0 van ser crescudes i tractades tal com s'indica a la *figura R5.5 (a)*, mantenint-les en W o W+FR (**a**), o transferint-les en un medi 0 µM, 0,1 µM o 1 µM d'EBL (**b**) o en 0 µM o 10 µM de GA₃ (**c**). Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa amb la mateixa situació experimental creixent en W (**a**) o en un medi sense hormona (**b**, **c**) (*P<0.05; **P<0,01).

- **GAs (GA₃)**

El comportament de l'allargament de l'hipocòtil en plàntules Col-0 quan hi havia lesió apical i lateral era el mateix que les plàntules senceres, és a dir, que hi havia un cert creixement. Tal i com havíem vist anteriorment, quan mancaven els cotilèdons la longitud de l'hipocòtil semblava no variar després de l'aplicació exògena de GA₃ (*figura R5.7 (c)*), malgrat el grau de resposta a aquesta hormona en els quatre casos experimentals descrits és petit.

Aquests resultats suggereixen que els cotilèdons tot i estar implicats en l'allargament de l'hipocòtil després d'una aplicació exògena d'hormones (PIC, EBL, GA₃) no són essencials. D'aquesta manera es recolza la hipòtesi de treball basada en que la manca de resposta dels hipocòtils al tractament d'ombra simulada en plàntules a les que se'ls ha eliminats els cotilèdons no és deguda a la pèrdua intrínseca d'aquest òrgan de la capacitat d'allargament.

Les nostres dades també mostren que el dany als cotilèdons (lesió apical o lateral) redueix la capacitat de resposta de l'hipocòtil als diferents estímuls estudiats, i que aquest efecte és menys dràstic que el produït per l'eliminació d'aquests.

5.2. Paper del meristem apical en l'allargament de l'hipocòtil en tractaments d'ombra simulada

Com a aproximació complementària a les lesions, ens vam plantejar el buscar mutants on els manquessin diferents òrgans, i veure com responien ombra simulada. Per això vam utilitzar el mutant *shoot meristemless (stm)* (Grigg et al., 2005) cedit pel grup d'en M. Tsiantis (Dept of Plant Sciences, University of Oxford, Regne Unit). Aquest mutant recessiu es caracteritza per no tenir meristem apical, el que resulta en una fusió parcial de la base dels peciols, l'absència de fulles primàries i posterior producció de flors i llavors (*figura R5.8*); les plantes mutants *stm* moren abans d'arribar a l'estadi adult. Per poder treballar amb *stm* s'ha de mantenir una població segregant de manera que per la descendència segregant se sap quines poblacions són heterozigotes i són aquestes les que s'utilitzen per treballar.

Per tal de procedir a fer un tractament d'ombra simulada, vam créixer plàntules control *Ler* i una població segregant de *stm11-1* segons s'indica a l'apartat 2.1.1. (*figura R2.1*

(a)), mesurant només els individus que els mancaven les fulles primàries en el cas de la línia *stm11-1*.

En condicions de W la llargada de l'hipocòtil dels mutants *stm11-1* era la mateixa que el control (*figura R5.8*), mentre que sota el tractament de W+FR aquests era significativament més curta, suggerint que la pèrdua del meristem apical comporta una reducció de la llargada de l'hipocòtil en resposta a ombra simulada. També vam mesurar la longitud dels cotilèdons de les plàntules *stm11-1*, que era més petita que el control en llum blanca, i no s'observaren diferències entre el tractament W i el W+FR ni en plàntules Ler ni en *stm11-1*..

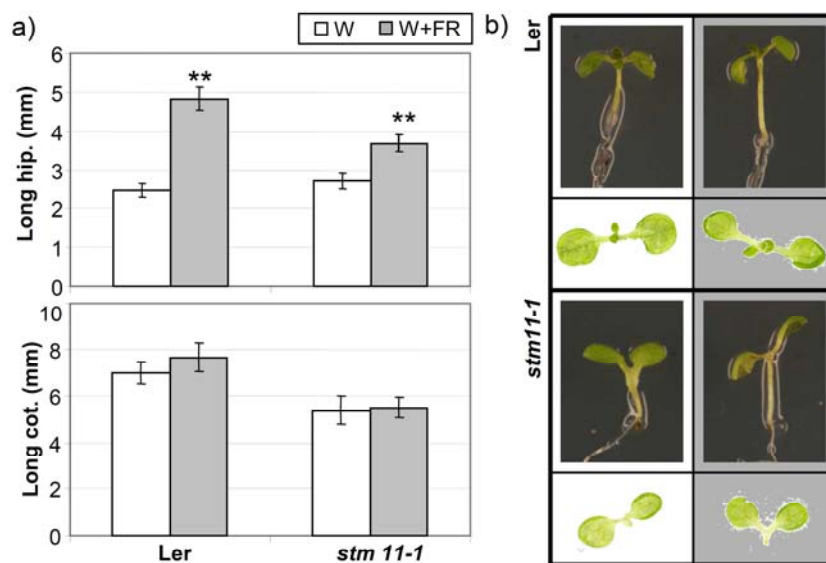


Figura R5.8. Efecte de la presència de meristem apical en l'allargament de l'hipocòtil en resposta al tractament d'ombra simulada. Línies Ler i transgèniques *stm11-1* foren crescudes i tractades tal i com s'indica a la *figura R2.1*. Es va mesurar la longitud dels hipocòtils per cada línia i tractament. Les columnes representen la mitjana i les barres 2xSE. Els asteriscs indiquen una diferència significativa amb el tractament W del mateix genotip (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). (b) Fotografies d'individus representatius sotmesos a cada condició experimental.

Aquests resultats, junt amb l'anàlisi de variància de dues vies, mostren que el meristem apical és un òrgan important per les respostes SAS en quant a l'allargament de l'hipocòtil.

4. DISCUSSIÓ

Tal i com s'ha dit al llarg de la present tesi, les connexions entre les respostes fotomorfogèniques -com la SAS- i les xarxes transcripcionals hormonals són nombroses, regulant ambdues ràpidament els nivells d'expressió de varis moduladors de les respostes a hormones. Aquest treball ens ha permès aproximar-nos al coneixement de les xarxes transcripcionals implicades, combinat amb les anàlisis d'expressió temporals i espaials, per tal de poder estudiar com els canvis en el creixement controlat per hormones donen lloc a les respostes espaials regulades per llum.

4.1. SAUR15, element integrador de les respostes a la SAS i hormonals

Els gens *SAUR* comprenen una gran família de gens de resposta a auxines, la funció dels quals és desconeguda. Aquesta manca d'informació ve donada possiblement per la falta de mutants de pèrdua de funció o de línies sobreexpressores (possiblement a causa d'una elevada redundància funcional) (Park et al., 2007; Spartz et al., 2012). Alguns autors suggereixen que les proteïnes SAUR podrien tenir papers diferents alhora que sobreposats, exercint un paper concret en un procés de desenvolupament específic (Park et al., 2007) Un exemple el trobem en la implicació en el desenvolupament del ganxo apical regulat per *AAM1* (de l'anglès *abolished apical hook maintenance 1*), expressat majoritàriament a la zona interior d'aquest i que en reprimeix el creixement (Park et al., 2007). En aquest treball hem utilitzat el promotor de *SAUR15*, un gen resposta primerenca a Aux i BR ben caracteritzat en *Arabidopsis thaliana*, fusionat al gen reporter *GUS*. De manera similar a altres gens *SAUR*, no conté introns i només hi ha una regió intergènica petita aigües amunt compartida per *At4g38840*. A la seqüència promotora de *SAUR15* hi ha varis elements identificats com a reguladors en cis per Aux i BRs (*figura R1.1*).

Les vies de senyalització d'auxines i BRs convergeixen a nivell de la regulació transcripcional en *SAUR15* (Halliday, 2004), que posseeix al seu promotor elements reguladors específics per la senyalització per auxines (com les AREs), o comuns, com les E-box. Aquestes darreres foren identificades en promotors regulats alhora per ambdues hormones (Nemhauser et al., 2004). La família de factors de transcripció de resposta a auxines (ARF, de l'anglès *Auxin Response Factor*) s'uneixen als elements de resposta a auxines amb la seqüència TGTCTC, anomenada ARE canònica (Ulmasov et al., 1995) o ARFAT (Higo et al., 1999). Un complex repressor que pot ser desacoblat en presència d'auxines modula l'activitat de les ARF (Gray et al., 1999; Gray et al., 2001; Gray et al., 1998; Szemenyei et al., 2008; Tiwari et al., 2001).

L'alta conservació de les E-box en promotors de possibles gens ortòlegs de *SAUR15* en varies espècies de plantes dóna suport de la importància funcional en la coordinació per la unió dels FT (Walcher and Nemhauser, 2012). Les E-box són reconegudes per factors de transcripció pertanyents a les bHLH, com *BIM1* (Yin et al., 2005), a l'hora que són requerides per l'activació de

SAUR15 pel factor *BES1* (Yin et al., 2005). Estudis previs mostren que el factor MYB30 pot interaccionar directament amb la proteïna BES1 i unir-se al DNA a un lloc conservat d'unió de factors MYB (AACAAAC) immediatament adjacent a la E-box IV, incrementant la inducció per BRs de l'expressió de *SAUR15* (Li et al., 2009). Relacionat amb la inducció del promotor de *SAUR15* per BRs, hi ha descrites 5 E-boxes (*figura R1.1*) de les quals la EI, EII, EIII i EV són elements anomenats HUD (de l'anglès *hormone up at dawn*) amb la seqüència CACATG/CATGTG (Michael et al., 2008). La presència d'aquests elements HUD ha estat descrita en promotors de gens cíclics relacionats en diverses vies de regulació hormonal (Michael et al., 2008). Les comparacions de l'activitat GUS quan les E-box estan mutagenitzades en el context del promotor de 700bp (plantes **P_{S15-0,7}:G** i **P_{S15-0,7Em}:G**; *figura R1.3*) i de 470bp (plantes **P_{S15-0,47}:G** i **P_{S15-0,47Em}:G**; *figura R1.4*) indiquen que tant les 3 E-box proximals (I, II, III) com les distals (IV, V) a l'inici de traducció no són necessàries per a la regulació de l'activitat d'aquest promotor després dels tractaments exercits d'auxines, BRs i ombra simulada. Com que el promotor més petit analitzat (470pb, el qual inclou les 3 E-boxes I, II, III) respon als tractaments, podem inferir que aquesta regió del promotor de *SAUR15* conté altres elements implicats en la seva regulació per aquests estímuls.

Tant els 700pb com els 470pb més propers a l'inici de la traducció del promotor presentaven una distribució de la tinció GUS semblant a la línia **P_{S15-2,3}:G**, que conté 2,3 kb del promotor de *SAUR15*, localitzada en cotilèdons, fulles primàries i part de l'hipocòtil. Malgrat que segurament hi ha seqüències importants a nivell funcional fora de la regió mínima definida en aquest treball del promotor de *SAUR15* (Walcher and Nemhauser, 2012), la regió de 470bp és suficient per la correcta localització de l'expressió del gen reporter.

Actualment per auxines hi ha 10 elements TGTC/GACA descrits (Nakamura et al., 2003; Vert et al., 2008; Walcher and Nemhauser, 2012), entre els quals hi ha una regió ARE canònica (GAGACA, ARE II mutagenitzada en aquest treball, anomenada ARE V per altres autors – (Walcher and Nemhauser, 2012)-). D'aquestes 10, nosaltres en vam escollir 3 per comparació amb el que estava descrit per altres gens tals com *IAA5* i *IAA9* com a elements clau en la connexió Aux / BRs (Nakamura et al., 2003). La comparació de l'activitat del gen reporter *GUS* quan les AREs estan mutades (plantes **P_{S15-0,7}:G** i **P_{S15-0,7Am}:G**; *figura R1.2*) indica que les 3 AREs descrites de la regió de 700bp no són necessàries per l'activitat del promotor *SAUR15* en resposta al tractament d'auxines (*figura R1.6*). Publicacions recents indiquen que la inducció per Aux d'un promotor més curt (290bp, on no hi ha ni la Ebox III ni altres possibles elements reguladors d'aquestes respostes) requereix l'Ebox I (Walcher and Nemhauser, 2012). A més, la pèrdua de l'ARE I redueix dràsticament la inducció per auxines del promotor de 290bp (Walcher and Nemhauser, 2012). Aquestes diferències suggereixen que les anàlisis histoquímiques de l'activitat GUS emprades per nosaltres no són suficients per veure diferències que sí es donen a nivell quantitatiu. A més a més, aquest grup ha demostrat que l'ARE II, descrita com a regió canònica, no és important per la

inducció del gen reporter (Walcher and Nemhauser, 2012). Per tant, malgrat l'estudi de la localització histoquímica de l'expressió del gen reporter *GUS* és informatiu, aquest resultat s'haurien de complementar amb estudis quantitius de l'expressió dels gens reporters mitjançant qPCR.

4.2. Implicació en la SAS de mutants hormonalis

La resposta d'elongació de les plàntules d'*Arabidopsis* es pot substituir o mimetitzar en alguns casos per l'aplicació d'Aux, BRs, etilè o GAs (Martinez-Garcia et al., 2010). No és sorprenent que molts estudis relacionin alteracions del metabolisme hormonal i/o respostes en el control d'aquest per llum, en general, i per ombra simulada, en particular. En el cas de l'elongació de l'hipocòtil en resposta a ombra simulada ha estat estudiada la interacció llum-GAs, així com també llum-Aux, llum-BRs i llum-etilè. Per una altra banda s'ha de tenir en compte que també és possible que l'alteració de les respostes hormonalis afecti a la sensibilitat lumínica. Aquesta doble via d'efectes entre la llum i les respostes a hormones ha estat suggerida quan s'ha analitzat l'elongació dels hipocòtils en resposta a la combinació de dosis creixents de brassinòlida al llarg de la desetiolació de la plàntula en resposta a dosis creixents de R o FR (Nemhauser, 2008).

En aquest treball s'ha estudiat la resposta a tractaments d'ombra simulada dels diferents mutants de BRs: *BRI1*, *BES1*, *BZR1*, *MYB30*, *BAS1* i *SOB7*; i d'Aux *MYB77*, els quals han estat relacionats directa o indirectament amb ombra simulada o amb la regulació de l'expressió de *SAUR15*. De tots els components analitzats, ni *BZR1* ni *MYB30* serien integradors de les respostes hormonalis i d'ombra simulada, almenys per sí sols (*figura R2.2* i *R2.4*); alhora que *MYB77* tampoc sembla tenir un paper per sí sol en les respostes de la SAS (*figura R2.5*).

L'expressió del receptor de BR *BRI1* i del gen que codifica l'enzim inactivador de BR *BAS1* està ràpidament induïda per una reducció en R:FR (Devlin et al., 2003; Tao et al., 2008). Els nostres resultats suporten que *BRI1* intervé en les respostes SAS (relacionades amb l'elongació de l'hipocòtil), de manera que és un potencial element integrador de les respostes hormonalis i d'ombra simulada (*figura R2.1*; *taula D1*) com a regulador positiu. *BAS1* i *SOB7* semblen no tenir un paper per si sols en la regulació de les respostes SAS (*figura R2.4*) basat en els estudis de pèrdua de funció. Tanmateix, s'ha descrit una connexió entre *BAS1* i *phyB*, ja que *bas1-D* suprimeix l'al·lel nul de *phyB*, alhora que també s'ha descrit que *BAS1* actua aigües avall de *phyA* i *cry1*, suggerint que la llum FR modula els nivells de BRs a través de l'acció de *BAS1* (Turk et al., 2003). Degut a la redundància gènica, l'aproximació a través del doble mutant de pèrdua de funció, el qual té alts nivells de BRs actius (Turk et al., 2005), ens duu a concloure que ambdós gens actuen com a possibles reguladors positius de les respostes SAS, exercint un paper com a elements integradors (*figura R2.4*; *taula D1*). Dins els elements de senyalització de BR activa, i al contrari de *BRI1* i *BAS1/SOB7*, *BES1* té un paper com a regulador negatiu en la SAS (*figura R2.2*;

taula D1).

La implicació prèvia de *BES1* i *BZR* en les vies de senyalització hormonal, ens va dur a estudiar la resposta dels hipocòtils dels mutants *bes1-D* i *bzr1-D* a l'aplicació exògena d'hormones vegetals per tal de veure si la capacitat de resposta a aquest estímul havia estat afectada, per la qual cosa la diferent resposta als tractaments d'ombra simulada podria venir donada per una alteració en la sensibilitat hormonal. Tal i com estava descrit, tant *BES1* com *BZR1* actuen com a reguladors positius de la senyalització de BRs (figura R2.3; taula D1) (Wang et al., 2002; Yin et al., 2005; Yin et al., 2002). En quant a la senyalització per auxines, ambdós gens hi tenen un paper positiu. En canvi, ambdós gens presenten un comportament diferencial en resposta a l'aplicació exògena de GAs, on només *BES1* té un paper com a regulador positiu (figura R2.3, taula D1). Aquest comportament en el mateix sentit en l'aplicació d'Aux i BRs reitera la connexió entre ambdues rutes de senyalització hormonal per regular una resposta tal com l'allargament de l'hipocòtil. Aquesta connexió es pot donar a través de factors que malgrat estar descrits per una via de senyalització concreta també podrien estar implicats en la senyalització d'altres, incrementant la sensibilitat a altres hormones.

		SAS	EBL	PIC	GA ₃
Senyalització BR activa	<i>BRI1</i>	+	n.a.	n.a.	n.a.
	<i>bes1-Dbc7</i>	-	+	+	+
	<i>bzr1-D</i>	No	+	+	No
Senyalització BR atenuada	<i>bas1sob7</i>	+	n.a.	n.a.	n.a.

Taula D1. Resum de les respostes a ombra simulada i a hormones d'alguns mutants hormonal estudiats en aquesta tesi. +: regulador positiu de les respostes, -: regulador negatiu de les respostes, No: sense implicació en la resposta de l'estímul estudiat, n.a.: no analitzat.

Els resultats d'aquest capítol de la tesi descriuen varis gens integradors de les respostes a la SAS i a hormones, tals com *BRI1*, *BES1*, *BAS1* i *SOB7*. Aquestes xarxes complexes contenen un elevat nombre de components (reguladors transcripcionals i gens reguladors), alguns dels quals poden estar interconnectats degut a interaccions directes de proteïna-proteïna i/o a interaccions transcripcionals entre ells. La interacció entre les diferents xarxes pot tenir lloc, com a mínim, seguint els següents mecanismes: (a) es comparteixen alguns reguladors transcripcionals, (b) l'expressió d'alguns components en una de les xarxes transcripcionals està modulada per reguladors transcripcionals pertanyents a l'altra i/o (c) alguns gens diana poden ser regulats independentment per components pertanyents a dues xarxes diferents (Martinez-Garcia et al., 2010). És el cas d'*ATHB4* i *PAR1*, per exemple, que comparteixen almenys un gen diana directe de *BES1* en la ruta de BRs, *SAUR15*.

4.3. HD-ZipII

La percepció de la proximitat vegetal pels fitocroms desemboca en una ràpida inducció de dotzenes de gens *PAR*, fet que és clau en les respostes SAS. Dins dels gens *PAR* que s'han demostrat que exerceixen una funció en la SAS, hi ha la classe II de la subfamília HD-Zip (HD-Zip II), els quals es caracteritzen per ser ràpidament induïts després d'un tractament d'ombra simulada. Dels 10 membres de la subfamília HD-Zip II, almenys 4 (*ATHB2*, *HAT1*, *HAT2* i *ATHB4*) formen un sistema d'autoregulació negatiu (Sorin et al., 2009). A més a més, l'expressió de 5 gens pertanyents a la mateixa subfamília (*ATHB2*, *ATHB4*, *HAT1*, *HAT2*, *HAT3*, figura R3.11(a)) està ràpidament regulada per ombra simulada (Roig-Villanova et al., 2006) o per ombreig (Carabelli et al., 2007; Sessa et al., 2005), connectant ràpidament la llum percebuda pels fitocroms amb els nivells d'expressió d'aquests gens. D'aquests, s'han estudiat les funcions d'*ATHB2*, *HAT1* i *HAT2*, malgrat que la seva caracterització ha estat principalment fenotípica basada en plantes transgèniques crescudes en W.

En aquesta tesi hem analitzat el paper d'*ATHB4*, l'expressió del qual està directament controlada per l'acció del fitocroms (Roig-Villanova et al., 2006)r. Resultats previs al grup mostraren que la sobreexpressió d'*ATHB4* alterava el desenvolupament, afectant l'expansió de l'hipocòtil i els cotilèdons, l'elongació de l'arrel i el desenvolupament d'arrels laterals (Sorin et al., 2009). A més a més, *ATHB4* és un regulador negatiu de l'expressió d'altres factors de transcripció pertanyents a la subfamília HD-Zip II. Aquest fenotip és similar al descrit en les línies de sobreexpressió constitutiva d'*ATHB2* (Ohgishi et al., 2001; Steindler et al., 1999), *HAT1* (Carabelli et al., 2008) o *HAT2* (Sawa et al., 2002). Malgrat aquestes similaritats, l'increment d'activitat d'*ATHB4* afecta lleugerament l'elongació de l'hipocòtil, i té un efecte més subtil en la resposta a auxines (Sorin et al., 2009). Aquests resultats suggerien que tot i que els membres d'aquesta subclasse tenen funcions coincidents, tal i com es dedueix per la manca de fenotip en els mutants simples, i la seva expressió similar en resposta a ombra simulada, no són completament redundants. Aquest fet és semblant al que ocorre amb els membres de la classe III de la subfamília HD-Zip (HD-Zip III) (Prigge et al., 2005).

Resultats previs, juntament amb publicacions existents, indicaven que alguns dels factors de transcripció pertanyents a la HD-Zip II podrien ser elements senyalitzadors de la SAS, malgrat no s'havia demostrat aquest fet, principalment degut a dos motius no excloents: la manca de bones caracteritzacions de mutants de pèrdua de funció i/o l'absència d'estudis sota tractaments d'ombra simulada de les línies de sobreexpressió; motius que passaren a ser l'objectiu principal d'aquesta tesi.

4.3.1. HD-ZipII i les respostes a ombra simulada

Plantes sobreexpressores d'*ATHB2* tenen hipocòtils més llargs, cotilèdons i fulles més petits i un sistema radicular més prim (*figura R4.4*) (C. Sorin, dades no publicades). Consistentment, plàntules transgèniques sobreexpressants d'*ATHB2* en antisentit mostren un fenotip oposat (Schena et al., 1993; Steindler et al., 1999). Basant-se en aquests fenotips es va suggerir que *ATHB2* podria tenir un paper com a regulador positiu de les respostes a la SAS, almenys en estadi de plàntula (Sessa et al., 2005). Els experiments d'ombra simulada duts a terme en aquesta tesi (*figura R4.4*) mostren que sí té un efecte en aquest tipus de resposta, però que al contrari del que estava proposat *ATHB2* estaria actuant com a regulador negatiu de les respostes de la SAS. En contrast amb les línies anti-*ATHB2*, plàntules mutants de pèrdua de funció d'*ATHB2* no mostraven un fenotip diferencial sota una elevada R:FR ni en condicions d'hivernacle (tesi doctoral d'Irma Roig-Villanova 2007). Aquestes observacions suggerien que l'expressió de gens codificants per varis membres de la subfamília HD-ZipII podia estar reduïda en les línies anti-*ATHB2*, causant una disminució de l'activitat no només d'*ATHB2* sinó també d'altres proteïnes homòlogues. *ATHB2* també ha estat descrit per estar sota el control de *HFR1/SICS1*, un regulador negatiu de la SAS; aquesta relació entre ambdós gens probablement forma part dels mecanismes que asseguren que la planta no tingui una resposta exagerada quan no escapa de l'ombra amb èxit (Ciarbelli et al., 2008; Sessa et al., 2005).

En aquest treball hem vist que plàntules sobreexpressant *HAT1* i *HAT2* tenen un fenotip semblant a les plàntules de sobreexpressió d'*ATHB2*: hipocòtils llargs, cotilèdons i fulles petites i un sistema radicular reduït (*figura R4.1, R4.2, R4.4*), dades consistents amb resultats publicats (Ciarbelli et al., 2008; Sawa et al., 2002). Els experiments d'ombra simulada demostren que ambdós gens participen en la reducció d'aquest tipus de resposta, actuant com a possibles reguladors negatius de la SAS. S'ha vist que, tal i com era esperable, l'hipocòtils més llargs en plantes de sobreexpressió de *HAT2* correspon a una diferent elongació cel·lular (Gendreau et al., 1997; Sawa et al., 2002).

Tal i com ocorre amb *ATHB2*, els mutants simples de pèrdua de funció amb una inserció de T-DNA per *HAT1* i *HAT2* i fins i tot el doble mutant *hat1hat2* no mostren cap tret remarcable distintiu de fenotip quan creixen en condicions d'alta R:FR o en hivernacle, suggerint que *HAT1*, *HAT2* i altres membres de la subfamília HD-ZipII poden tenir funcions redundants (Sawa et al., 2002; Sorin et al., 2009). L'anàlisi de línies sobreexpressores suggereix que *HAT1* i *HAT2*, a l'igual que *ATHB2*, són possibles reguladors negatius de les respostes SAS. L'anàlisi del doble mutant *hat1hat2* permet concloure que mostren una resposta lleugerament reduïda a ombra simulada (Sorin et al., 2009), fet consistent amb el paper de *HAT1* i *HAT2* com a reguladors complexos de la SAS, igual que estava descrit per *ATHB4* (Sorin et al., 2009). Aquesta complexitat rau en el fet que tant la

sobreexpressió com la pèrdua de funció tenen el mateix efecte: una reducció en les respostes de la SAS (figura D1).

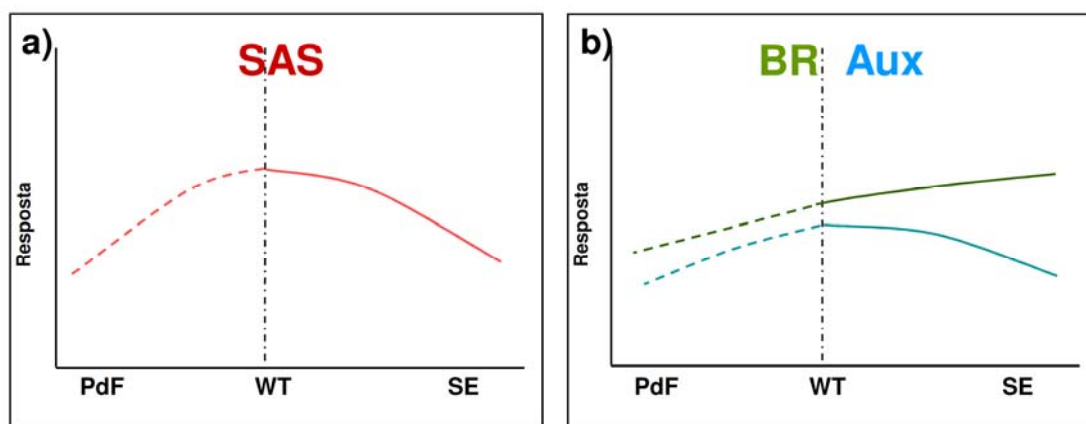


Figura D1. Esquema de les respostes de la SAS i a hormones en membres pertanyents a la subfamília HD-ZipII. (a) Gràfic que esquematitza el grau de resposta a tractaments d'ombra simulada en funció dels nivells d'expressió dels gens *HD-ZIPII*, on l'eix de les Y és el grau d'allargament de l'hipocòtil, i l'eix de les X és el nivell d'expressió, essent el punt central (línia puntejada) el nivell del wt, a la dreta el de la sobreexpressió (SE) i a l'esquerra el de pèrdua de funció (PdF). Les dades són extrapolades a partir de les línies de SE d'*ATHB4*, *HAT2* i *ATHB2*, així com les de PdF *athb4hat3* i *hat1hat2*. (b) Esquema del grau de resposta a tractaments de BRs i Aux; dades extrapolades a partir de les línies de SE d'*ATHB4* i *HAT2*, i de PdF *athb4hat3*.

La sobreexpressió d'*ATHB4* (o l'increment de la seva activitat nuclear) és suficient per alterar el desenvolupament vegetal. A l'estadi de plàntula, l'expansió de l'hipocòtil i dels cotilèdon, l'elongació de l'arrel i el desenvolupament de les arrels laterals està particularment afectat. Estudis previs del nostre grup mostraren que un increment de l'activitat d'*ATHB4* produïa una reducció en la resposta de l'allargament de l'hipocòtil en resposta a ombra simulada, suggerint un paper com a regulador negatiu de les respostes a la SAS (figures 19, 110). En les respostes SAS s'ha descrit el paper de varies hormones (Vandenbussche et al., 2005). L'addició d'un inhibidor del transport d'auxines (NPA), el qual elimina l'elongació de l'hipocòtil (Steindler et al., 1999) i l'expansió longitudinal dels cotilèdons en resposta a ombra simulada (Sorin et al., 2009), pot suprimir l'epinàstia mostrada pels cotilèdons de les plàntules sobreexpressores d'*ATHB4*, suggerint una implicació de les auxines en el fenotip resultant de la sobreexpressió (Sorin et al., 2009). Amb l'aplicació simultània de tractaments d'ombra simulada i hormones es demostrà una interacció entre ambdós tractaments respecte a l'efecte en l'allargament de l'hipocòtil, reafirmant que un increment d'activitat d'*ATHB4* altera específicament el nivell de resposta de l'hipocòtil a Aux, BRs i GAs sota condicions de W+FR (figura R3.1 (b)).

S'ha de tenir en compte que els fenotips observats en les plantes de sobreexpressió d'*ATHB4* siguin en part un efecte de la repressió dels altres membres de la subfamília II dels HD-Zip, tals com *HAT1* i *HAT2*. L'atenuació de la resposta de l'hipocòtil a W+FR que mostren les plàntules

hat1hat2 (figura R4.3(b)) recolza la hipòtesi que el control de la SAS és complex i que hi implica la participació de varis membres de la subfamília HD-Zip II, fent que sigui difícil discernir la contribució individual de cada factor de transcripció. L'obtenció de múltiples mutants en diferents membres de HD-ZipII seria necessari per discernir el paper específic dels membres d'aquesta subfamília de factors de transcripció per modular les respostes SAS, ja que actualment no podem classificar-los com a reguladors positius o negatius d'aquest tipus de resposta.

El mutant simple de pèrdua de funció d'*ATHB4* no mostrava cap fenotip diferencial, tal i com ha estat observat per altres membres de la HD-ZipII, suggerint de nou l'existència de redundància gènica amb altres membres de la subfamília (figura R3.10). Anàlisis filogenètics mostraven a *HAT3* com al seu paràleg (Ariel et al., 2007; Ciarbelli et al., 2008). Mutants de pèrdua de funció de *HAT3* tampoc no mostraven cap fenotip diferencial en cap dels tractaments lumínics mostrats (figura R3.10). Per contra, el doble mutant *athb4hat3* sí mostrava un fenotip molt característic, observable tant a l'estadi de plàntula com en planta adulta (figura R3.11). Malgrat que els adults *athb4hat3* presentaven grans defectes en el desenvolupament, les plàntules d'aquestes línies mostraven arrels i hipocòtils aparentment normals, només mostrant-se alterats els cotilèdons (figura R3.12). Tot alhora, aquests resultats mostren clarament una alta redundància per *ATHB4* i *HAT3* com a reguladors del desenvolupament vegetal. L'obtenció del doble mutant *athb4hat3* ens ha permès estudiar els efectes de la pèrdua de funció, podent veure que l'hipocòtil presentava una reducció en resposta al tractament d'ombra simulada, suggerint que *ATHB4* tenia un paper com a regulador de les respostes SAS (figura R3.12).

Resultats presentats en aquesta tesi mostren que *athb4hat3* suprimeix parcialment el fenotip d'hipocòtil llarg dels mutants *phyB*, corroborant el paper d'aquests gens en la senyalització exercida per *phyB* (figura R3.23(a)). En les nostres condicions, però, els mutants *phyA* no mostraven un fenotip diferencial sota el tractament d'ombra simulada (figura R3.23 (b, c)), de manera que no podem discernir si *ATHB4* estaria actuant en la senyalització desencadenada per aquest darrer fotoreceptor.

El fet que ambdues situacions, el guany i la pèrdua de funció, desemboquin en una reducció de la resposta a ombra simulada (estimada per la mesura de l'allargament de l'hipocòtil) indica que el paper d'*ATHB4* en el control de les respostes SAS és complex, i que implica la participació d'altres factors addicionals (figura D1 (a)). A més a més, tal com s'ha comentat l'expressió dels gens del HD-Zip II està mútuament regulada en el sentit que l'alta activitat d'un dels factors reprimeix l'activitat dels altres (Ohgishi et al., 2001; Sawa et al., 2002; Sorin et al., 2009), formant un sistema de retroalimentació negativa que podria contribuir a la complexitat esmentada. Alhora no podem descartar la possibilitat que les alteracions morfològiques de les plàntules *athb4hat3* podrien afectar a les respostes SAS per mecanismes indirectes, possibilitat que hem de tenir en compte.

4.3.2. HD-Zip1 i les respostes a hormones

Anàlisis funcionals indiquen que gens pertanyents a aquest grup estan relacionats amb l'activitat d'Aux (*ATHB2*, *ATHB4* i *HAT2*) (Sawa et al., 2002; Steindler et al., 1999), de GAs (*ATHB4* i *HAHB-10*) (Rueda et al., 2005) o de BRs (*ATHB4* i *HAT3*) (Sorin et al., 2009) (la present tesi). Aquestes dades indiquen que després de la percepció d'ombra simulada, les xarxes transcripcionals ràpidament connecten amb les xarxes hormonals, tal i com estaria ocorrent en la modulació d'Aux per *PAR1*, *PIF5* i *PIF7* (Hornitschek et al., 2012; Li et al., 2012; Roig-Villanova et al., 2007).

Donat que s'ha descrit un paper d'alguns dels membres d'aquesta subfamília com a integradors d'ombra i auxines, fou temptador estudiar si tenien un paper més ampli com a integradors d'almenys dues vies de senyalització hormonals. Malgrat que els resultats obtinguts amb les línies de sobreexpressió de *HAT2* mostren un cert grau d'hipersensibilitat sota una dosi intermèdia d'aplicació de BRs, quan aquesta dosi és major les línies sobreexpressores es comporten igual que el control, en contrast amb el que s'havia observat a les plantes amb alta activitat d'*ATHB4* (*figura I10*). En quant a l'aplicació d'Aux, aquestes línies presenten una reducció de les respostes, reafirmant un paper com a integrador de l'ombra i les respostes a Aux.

Plàntules *athb4hat3* presenten una reducció de la resposta als diferents tractaments hormonals aplicats (*figura R3.14*), suggerint que *ATHB4* i *HAT3* regularien les respostes hormonals. En aquesta tesi proposem a *ATHB4* com a regulador positiu de la senyalització de BRs, basat en els resultats de l'elongació de l'hipocòtil en resposta a l'aplicació exògena de BRs, que està reduïda en plantes *athb4hat3* (*figura R3.14 (a)*) i incrementada en plantes de sobreexpressió (Sorin et al., 2009) (*figura D1(b)*). La reducció de resposta a GAs i Aux del doble mutant, així com de les línies de sobreexpressió (Sorin et al., 2009), ens dóna a entendre un paper complex dels factors *ATHB4* i *HAT3* en l'allargament de l'hipocòtil en resposta a aquestes hormones, on tenir alts o baixos nivells d'activitat d'aquests desemboca a un allargament subòptim (*figura D1(b)*).

Per tal d'estudiar el grau d'epistàsia existent entre *ATHB4/HAT3* i altres components de senyalització de BRs vam realitzar creuaments amb el doble mutant *athb4hat3*. Els nostres resultats mostren una epistàsia d'*ATHB4/HAT3* sobre *BES1*, ja que el fenotip predominant és el descrit pel doble mutant. Tanmateix, cal remarcar que el major tamany del limbe dels cotilèdons característic del mutant *bes1-Dbc7* es trobava present en alguns dels individus triples mutants, és a dir, en aquells cotilèdons on no predomina el fenotip lanceolar característic del doble mutant hi observem el fenotip característic de *bes1-Dbc7*, suggerint que el grau d'epistàsia també depèn de la diferent penetrabilitat observada en el fenotip de les plàntules *athb4hat3*. Dels creuaments amb *bzr1-D* no podem discernir-ne l'epistàsia ja que no vam arribar a obtenir el triple mutant, però sí podem afirmar que hi ha un efecte en l'allargament dels hipocòtils en els dobles mutants estudiats.

Aquests resultats reforcen de nou la connexió entre ambdues rutes de senyalització: llum i hormones.

4.3.3. HD-ZipII i el desenvolupament

Tractaments de foscor d'*athb4hat3* mostren que el doble mutant no ha perdut ni reduït la capacitat d'elongació de l'hipocòtil (*figura R3.15*). La reducció de resposta a tractaments hormonals i d'ombra simulada d'aquest caràcter fou la que ens plantejà una possible alteració histològica en el doble mutant. A través d'imatges obtingudes amb SEM vam veure que els embrions *athb4hat3* presentaven un eix embrionari més llarg, alhora que dos cotilèdons de secció irregular replegats de forma asimètrica (*figura R3.16(b, c, g)*). Aquestes alteracions dels cotilèdons també es detectaven en moments més tardans del desenvolupament de les plantes dobles mutants, sumant-s'hi l'alteració de les fulles primàries, les quals presentaven simetria radial (*figura R3.17*). La caracterització amb imatges de confocal mostrà l'alteració dels feixos vasculars, mostrant-se discontinus en alguns individus i de simetria radial; alhora que s'observà la manca d'estructuració típica de parènquima en palissada (*figura R3.18*).

Aquests resultats ens portaren a plantejar una hipòtesi d'abaxialització en el doble mutant, i per tant a l'estudi del comportament a les respostes a ombra simulada en mutants en gens que codifiquen HD-ZipIII relacionades amb el control de la polaritat abaxio-adaxial. A nivell molecular, hem observat una certa reducció en l'expressió de dos gens relacionats amb la determinació de la polaritat en el desenvolupament (*PHB*, *PHV*), essent només significativa la reducció en el cas de *PHB* (*figura R3.20(e)*); aquest fet suggereix que *ATHB4* i *HAT3* estarien implicats d'alguna manera en la regulació de l'expressió de *PHB* i que intervindria en la senyalització de la polaritat de la planta. No obstant, no sabem si aquesta reducció en l'expressió de *PHB* és suficient per explicar les alteracions en la polaritat del doble mutant *athb4hat3*, ni si l'efecte d'*ATHB4* i *HAT3* sobre l'expressió d'aquest gens es directe o indirecte.

L'estudi de la resposta a ombra simulada dels mutants de pèrdua de funció pertanyents a HD-Zip III disponibles mostrà que només *phb-13* presentava un comportament diferencial al wt, tenint una major elongació de l'hipocòtil en W (*figura R3.21*). Aquests resultats suggereixen que per sí sols els gens estudiats no semblen tenir un paper en les respostes a ombra simulada. Està descrit que *PHB*, *PHV* i *REV* tenen funcions redundants en embriogènesi (Emery et al., 2003), de manera que possiblement hàgim de contemplar una redundància gènica entre els membres de la subfamília HDZip III en resposta a llum, semblant al que ocorre amb la subfamília HD-ZipII. Dades publicades recentment mostren que la xarxa reguladora formada per membres pertanyents a HD-Zip III i als factors de transcripció KANADI, els quals actuen de forma oposada, està implicada en la regulació de les respostes a ombra en *Arabidopsis* (Brandt et al., 2012). Aquest efecte antagònic és degut a la regulació oposada que exerceixen sobre l'expressió gènica. Sembla coherent basar-nos en el

fet que l'ombra és percebuda pel domini adaxial (zona superior) de les fulles (on hi trobem l'expressió dels gens HD-ZipIII), de manera que quan hi ha una baixa expressió de HD-ZipIII o una expressió ectòpica de *KAN1*, el teixit adaxial es veu limitat i la resposta a ombra simulada es veuria compromesa. El fet que tant *REV* com *KAN1* regulin directament l'expressió de gens de resposta a ombra tals com *HAT2*, remarca la funció de *REV* i *KAN1* tant en un creixement adaptatiu com en una integració de les respostes a ombra en el desenvolupament de les fulles (Brandt et al., 2012). A més a més, experiments de ChIP seguits de PCR quantitativa mostren que *HAT2*, *HAT3*, *ATHB2* i *ATHB4* són gens diana directes de l'acció de *REV*, de forma que *REV* actua aigües amunt regulant l'expressió de HD-ZipII. De manera complementària, l'expressió de *REV* presenta una distribució espacial molt similar a la de *HAT1*, *HAT3* i *ATHB4*, en el domini adaxial de les fulles en desenvolupament (Brandt et al., 2012).

Malgrat tot no està clar com s'activa *REV* en resposta a una baixa raó R:FR. En estudis previs del grup no s'ha detectat cap increment dels nivells de mRNA ni de *REV* ni de cap altre gen pertanyent a HD-ZipIII després d'un tractament d'ombra simulada (dades no publicades). Aquest fet ens duu a plantejar dues possibles explicacions: 1) els membres de HD-ZipIII requereixen co-factors per l'activació depenent de llum per tal d'actuar sobre els seus gens diana i aquests co-factors són els que estan regulats per llum, o bé 2) les proteïnes HD-ZipIII es poden activar directament per llum. Les proteïnes HD-ZipIII tenen un domini a l'extrem Ct MEKHLA-PAS, el qual potencialment pot actuar com a sensor de la llum o en canvis de voltatge o redox induïts per llum (Mukherjee and Burglin, 2006).

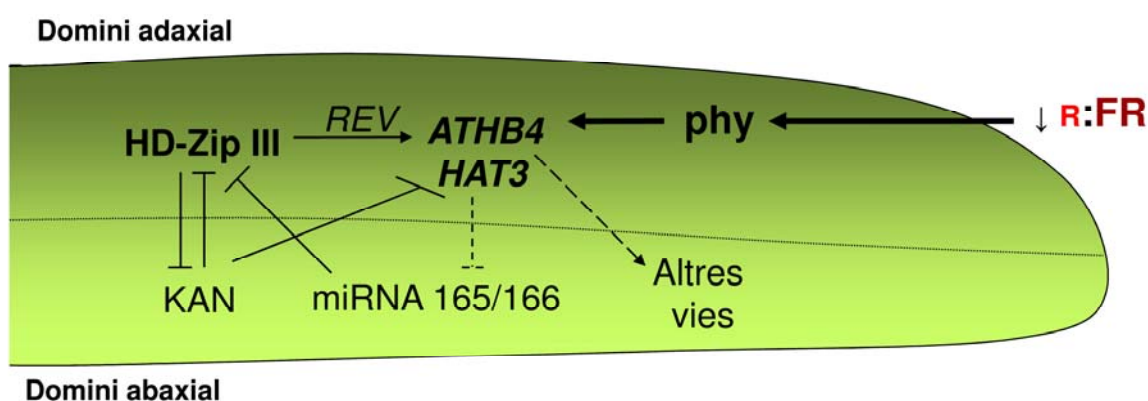


Figura D2. Esquema del model de resposta de la SAS en un cotilèdon per HD-ZipII i HD-ZipIII. Esquema de les possibles vies de senyalització i de connexió entre llum i desenvolupament en un cotilèdon, on es marca la zona adaxial (o superior) i abaxial (o inferior). Quan una planta percep una disminució en la raó R:FR captada pels fitocroms, aquesta senyal incrementa l'expressió d'un grup de gens, entre els quals hi ha *ATHB4* i *HAT3*.

Totes aquestes dades ens porten a plantejar una connexió entre respostes a ombra simulada i polaritat en el desenvolupament, proposant a *ATHB4* com a un element integrador d'ambdues vies (figura D2). El model d'acció seria que membres de HD-ZipIII poden induir HD-ZipII, i ambdós

factors són requerits per una completa resposta a ombra simulada alhora que per un correcte desenvolupament foliar. Al contrari que el mòdul HD-ZIPIII/HD-ZipII, *KAN1* actuaria reprimint l'expressió gènica inhibint el creixement en foscor (Brandt et al., 2012).

4.3.4. Aspectes moleculars de la família HP-ZipII

ATHB4: On i quan

Tal i com s'ha descrit per altres factors de transcripció implicats en la SAS (Galstyan et al., 2012; Galstyan et al., 2011), s'ha demostrat que per tal que sigui actiu, *ATHB4* s'ha de localitzar al nucli (*figura R3.1 (a); R3.4(a)*). Mitjançant experiments de biolística hem vist que com a mínim hi ha un domini implicat en la localització nuclear, que és el HD, ja que només les construccions que el contenen es localitzaven al nucli (*figura R3.4*). Donat que no s'hi troba cap NLS consens, hipotetitzem que la localització nuclear pot ser deguda a un elevat nombre de residus aminoacídics amb càrrega positiva a l'extrem Nt d'aquest domini (Palena et al., 2001).

Mitjançant l'estudi de l'expressió d'1kb del promotor d'*ATHB4* fusionat al gen reporter *GUS* vam estudiar la localització a nivell de plàntula, identificant una expressió diferencial al llarg del temps i de l'espai. *ATHB4* s'ubica principalment en fulles primàries en desenvolupament i, en menor mesura, als cotilèdons (*figura R3.22*). Aquests resultats ens mostren la importància de l'estudi de la senyalització lumínica en l'espai i en el temps (Montgomery, 2008). Estudis anteriors en el grup de l'expressió d'1kb del promotor d'*ATHB2* fusionat al gen reporter *GUS* mostren un patró espacial diferent al descrit per *ATHB4*, expressant-se en cotilèdons, hipocòtil i fulles primàries (Martinez-Garcia et al., 2010). Donat que l'expressió d'ambdós gens està ràpidament induïda per ombra simulada, aquest fet suggereix que després de la percepció d'una baixa raó R:FR les xarxes transcripcionals implicades en la SAS divergeixen ràpidament a nivell cel·lular o d'òrgan, resultant en una resposta diferencial en funció de l'òrgan al mateix estímul d'ombra (Bou-Torrent et al., 2008).

Activitat transcripcional

En aquesta tesi hem demostrat que *athb4hat3* presentava una alteració de l'expressió de gens regulats per Aux, BRs i/o ombra simulada; alhora que hem pogut observar que a nivell molecular el doble mutant respon clarament a ombra simulada (*figura R3.20*). Cal comentar que la inducció de *SAUR15* en resposta a EBL en el doble mutant *athb4hat3* estava incrementada, però no en el cas de *SAUR68* (*figura R3.20*). El diferent efecte de l'increment o la reducció de l'activitat d'*ATHB4* en la inducció per ombra, Aux i/o BRs de l'expressió de *SAUR15*, *SAUR68* i *IAA1* probablement reflecteix la necessitat d'altres factors implicats en la seva regulació. Les vies de senyalització d'Aux i BRs convergeixen a nivell de la regulació transcripcional de gens diana amb elements reguladors en comú, tals com les seqüències E-box (CANNTG, descrites al primer capítol

d'aquesta tesi) i cinc altres tipus de motius que actuen en cis, amb una possible paper regulador (ATAGAA, TGHAARK, ACCGACA, TGACGT i ACGTCA;(Nemhauser et al., 2004)). Donat que no està descrit que ATHB4 s'uneixi a cap d'aquests motius, els nostres resultats suggereixen la participació d'altres elements reguladors en el control de l'expressió gènica regulada per hormones, existint altres factors de transcripció que sí uneixen els elements reguladors en comú i/o que interaccionen de manera diferencial amb ATHB4.

El paper proposat d'*ATHB4* com a regulador positiu de la senyalització de BRs pot semblar contradictori amb el seu paper com a regulador negatiu d'un subgrup de gens de resposta a BRs, tals com *SAUR15* i *SAUR68*. Aquest contrast d'*ATHB4* pot reflectir la diferent regulació de les respostes a BRs analitzades en aquesta tesi: l'elongació només de l'hipocòtil contra l'expressió gènica de la plàntula sencera. A més a més, no hi ha informació de la correlació entre les respostes moleculars i les fisiològiques regulades per BR. Fins al moment actual tots els factors pertanyents a la HD-ZipII analitzats s'han descrit només com a repressors transcripcionals (Ohgishi et al., 2001; Sawa et al., 2002). Tanmateix, *ATHB4* pot actuar com a activador transcripcional a través de les interaccions amb factors específics de tipus cel·lular o sota condicions determinades, ja que s'ha observat activació o repressió de determinats gens tals com *IAA1* o *SAUR68* després de tractaments hormonals i d'ombra simulada (Sorin et al., 2009). Tal i com s'ha indicat a la introducció, els BRs són hormones involucrades en varis processos de desenvolupament. En el cas de proximitat vegetal, anàlisi genètics han mostrat que els mutants deficients de BR *det2-1* i *dwf1* (Luccioni et al., 2002) mostren respostes a la SAS defectives, suggerint que els BRs són necessaris pel correcte desenvolupament d'aquestes respostes. Donat que la regulació dels gens *PAR* no està abolida en plàntules *det2-1*, els BRs poden afectar les respostes SAS actuant aigües avall dels canvis en l'expressió gènica dels *PAR* (Roig-Villanova et al., 2006). En concordança amb aquesta possibilitat, els resultats exposats en aquest treball suporten que *ATHB4* i *HAT3* són reguladors positius de la resposta a BRs dels hipocòtils de plàntules (*figura R3.1 (b)*, *R3.14(a)*, *D1*), suggerint un paper com a integradors de la percepció de l'ombra i l'acció dels BRs.

ATHB4: dianes directes

A nivell molecular, *ATHB4* reprimeix l'expressió d'un subgrup de gens relacionats amb les respostes a la SAS. Resultats previs del grup mostraren que l'expressió d'un grup de gens de resposta a auxines, tals com *SAUR15*, *SAUR68*, *IAA1* i *HAT2* (Devlin et al., 2003; Roig-Villanova et al., 2007; Sawa et al., 2002), estava alterada després de la inducció per 2,4-D i en resposta a ombra simulada en plàntules amb un increment o una reducció de l'activitat d'*ATHB4*, donant suport a la implicació de les auxines en les respostes a la SAS mediades per *ATHB4*. En el cas de l'aplicació d'EBL, l'expressió de *SAUR15* i *SAUR68* estava pràcticament abolida quan incrementava l'activitat d'*ATHB4* (Sorin et al., 2009). Mitjançant tractaments amb CHX i DEX hem

identificat a *SAUR15* com a gen diana directe de l'efecte d'*ATHB4* (*figura R3.8*), exercint un paper de regulador negatiu semblant al descrit per altres factors reguladors de les respostes a la SAS tals com PAR1 i PAR2 (Roig-Villanova et al., 2007); i d'efecte oposat a factors tals com BES1 o BIM1, activadors transcripcionals de *SAUR15* en la ruta de senyalització de BRs (Yin et al., 2005) (*figura R3.8*). Aquest fet estableix una connexió ràpida de la percepció de l'ombra amb la resposta a Aux a través del seu efecte repressor directe en la inducció de l'expressió de *SAUR15* després d'una aplicació exògena d'Aux (*figura R3.20*); establint un punt d'integració (en aquest cas la regulació de *SAUR15*) de respostes a diferents estímuls. Malgrat tot, no hi ha cap seqüència d'unió de factors HD-Zip II òbvia al promotor de *SAUR15* (5'-(C/T)AAT(C/G)ATT(G/A)-3', (Ohgishi et al., 2001)).

4.3.5. Dimerització d'*ATHB4*

El domini LZ està involucrat en les interaccions proteïna-proteïna entre proteïnes de la família HD-Zip, i aquesta dimerització és necessària per a una correcta unió al DNA (Ciabelli et al., 2008). Mitjançant estudis de doble híbrid de llevat hem demostrat que *ATHB4* és capaç d'homodimeritzar (*figura R3.6*), tal i com estava descrit per altres membres de la família tals com *ATHB1* i *ATHB2* (Sessa et al., 1993). Aquesta dimerització és necessària per a la unió al DNA dels FT pertanyents a HD-ZipII (Steindler et al., 1999).

L'estudi de l'heterodimerització amb factors de transcripció implicats en la ruta dels BRs mostra que *ATHB4* és capaç de dimeritzar amb BIM1 però no amb BES1 (*figura R3.9*). Aquest fet ens confirma, una vegada més, una connexió potencial entre la resposta a ombra simulada (desencadenada per l'acció d'*ATHB4*) i la resposta regulada per BRs, suggerint un mecanisme pel que *ATHB4* podria regular les respostes mediatades per aquesta hormona.

4.3.6. HD-ZipII

Els membres de HD-Zip són factors de transcripció únics en les plantes, els quals participen en processos molt diversos, de vegades coincidents, englobant des de respostes a estres fins a morfogèniques i de desenvolupament. Estudiar-ne les dianes d'acció aigües avall serà un element clau que permetrà entendre millor el paper que exerceixen aquests factors de transcripció. En el context de la SAS, la diversitat de factors que la controlen suggereix que la xarxa transcripcional induïda no està regulada per peces clau, sinó més aviat per una xarxa de factors positius i negatius organitzada en mòduls reguladors (*figura D3*) (Alonso et al., 2003; Martínez-García et al., 2002).

D'aquesta manera, quan una planta entra en competència per la llum, el canvi de la raó R:FR és captat pels fitocroms, els quals desencadenen una sèrie de respostes moleculars en diferents mòduls reguladors. Un d'aquests mòduls estaria integrat pels membres de la subfamília HD-ZipII,

on tots els membres estan fortament autoregulats entre ells a nivell transcripcional (Sorin et al., 2009). La integració de la informació de cada mòdul produiria una sortida d'informació, que alhora es veuria contrastada amb altres informacions provinents d'altres mòduls reguladors, per tal d'acabar integrant-se amb una resposta determinada, com per exemple el creixement de l'hipocòtil. Els nostres resultats suggereixen que, juntament amb resultats previs del grup, diferents mòduls reguladors involucrats en la SAS presenten dianes directes comunes, tals com *SAUR15*. Els mòduls reguladors primaris, com el dels HD-ZipII, alhora també estarien intervenint alternat la sensibilitat hormonal de la planta, de manera que estarien actuant com a integradors de senyals exògenes (baixa raó R:FR) i endògenes (nivells hormonals). La complexitat d'aquests mòduls no rau només en integrar senyals per donar una sola sortida, sinó que també modulen diferents respostes: en el cas del mòdul HD-ZipII hem vist que integra senyals lumíniques i senyals de polaritat en el desenvolupament iniciades pel mòdul HD-ZipIII. Per afegir un altre nivell de complexitat a la regulació transcripcional en resposta a llum, es podria especular que els membres de la família HD-Zip podrien heterodimeritzar formant varis grups combinatorials, proporcionant capacitat per actuar en diferents programes de regulació transcriptòmica (Jiao et al., 2007).

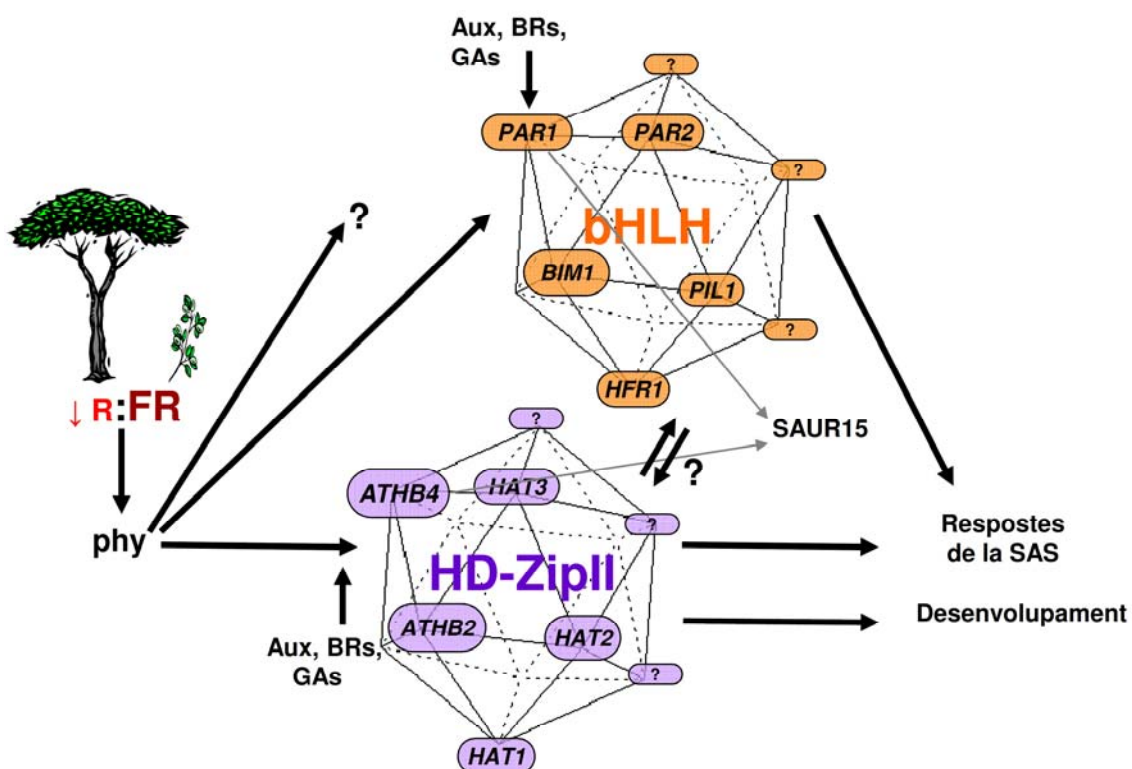


Figura D3. Esquema del model d'acció dels mòduls reguladors de les respostes de la SAS. Quan els fitocroms d'una planta detecta la disminució en la raó R:FR, es desencadenen una sèrie de respostes tant a nivell molecular com a nivell fisiològic.

4.4. Capacitat de resposta de la plàntula: elements *clau*

La presència de plantes veïnes pot afectar les etapes primerenques de l'establiment de la plàntula, i l'elongació de l'hipocòtil és la primera resposta en el temps i la més forta en magnitud desencadenada pels tractaments d'ombra simulada (Martínez-García et al., 2010). A més a més, l'expansió longitudinal dels cotilèdons i de les fulles primàries també està estimulada per ombra simulada, però responen relativament més tard en el temps que els hipocòtils a la senyal de baixa raó R:FR. En el cas de les fulles primàries, això es deu majoritàriament perquè no comencen la seva expansió fins que la plàntula ha assolit cert tamany i/o edat (5-6 dies en les nostres condicions). L'elongació del pecíol és la responsable del major creixement en l'expansió longitudinal tant dels cotilèdons com de les fulles primàries (Lorrain et al., 2008; Martínez-García et al., 2010; Tao et al., 2008).

El paper dels cotilèdons en la resposta d'allargament de l'hipocòtil és clau si ens basem en els resultats obtinguts, ja que l'eliminació d'aquests en *Arabidopsis* abans de l'inici d'un tractament amb W+FR n'aboleix l'allargament (*figura R5.1*), suggerint una separació física entre el lloc de percepció de la llum i el lloc de l'acció. Hem de tenir en compte que aquesta separació, tanmateix, no es conserva al llarg de tot el regne vegetal perquè hi ha exemples en altres espècies de plantes on un tractament localitzat de EOD-FR a les fulles no estimula l'allargament de la tija. En aquest darrer cas, tallar les fulles afecta a la intensitat de la resposta de la tija després d'un tractament EOD-FR, suggerint que aquests òrgans produeixen senyals difusibles que participen en l'allargament de la tija (Garcia-Martinez et al., 1987).

Per tal que es pugui dur a terme una correcta resposta SAS, cal la presència de diferents òrgans de la planta tals com els cotilèdons i el meristem apical. En aquesta tesi hem demostrat que els cotilèdons estan implicats en el correcte allargament de l'hipocòtil, principalment en resposta a W+FR (*figura R5.1*). Aquest fet es corrobora a nivel fisiològic ja que quan deleccionaven un cotilèdon hi havia un major creixement de l'hipocòtil a la zona on encara hi havia la presència de l'altre cotilèdon. Així mateix, són els cotilèdons intactes els que es requereixen per una resposta normal a ombra simulada (*figura R5.7(a)*). La implicació de les auxines en la senyalització des dels cotilèdons cap a l'hipocòtil en resposta a un tractament W+FR queda palesa en els experiments duts a terme amb les tincions GUS (*figura R5.2, R5.3, R5.4*). El meristem apical també és un òrgan important per les respostes SAS en quant a l'allargament de l'hipocòtil (*figura R5.8*), ja que quan no hi és (línies *stm*) no tenim una resposta SAS correcta (*figura D4*).

Diferents lesions en els cotilèdons mostren que el dany en aquest òrgan produeix una reducció tant en les respostes SAS com en les hormonals (*figura R5.6, R5.7*), malgrat que aquesta no és tan gran com quan extraïem els dos cotilèdons. La manipulació de les plàntules *per se* també té un efecte reductor en les diferents respostes estudiades. Cal destacar que aquest comportament no

és extrapolable a tots els casos ja que l'allargament de l'hipocòtil no és igual després de l'aplicació exògena de qualsevol hormona un cop hem eliminat els cotilèdons (en el cas de GAs el grau de resposta és petit, *figura R5.7(c)*).

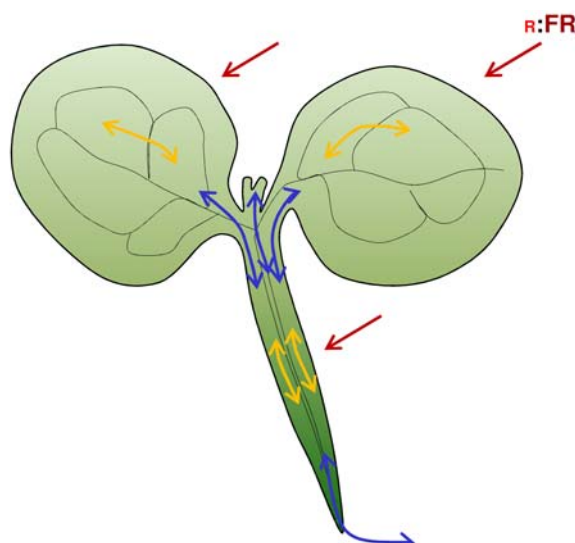


Figura D4. Model representatiu de la connexió entre els diferents òrgans de la plàntula en resposta a ombra simulada. Esquema d'una plàntula d'*Arabidopsis thaliana*, després de la irradiació amb W+FR (fletxes vermelles). Les fletxes blaves representen la senyalització entre òrgans i les taronges la senyalització intercel·lular dins d'un mateix òrgan.

El correcte allargament de l'hipocòtil en resposta a l'aplicació exògena d'hormones no requereix única i exclusivament els cotilèdons, tot i ser necessaris per una correcta elongació (*figura R5.5*). L'absència de cotilèdons no priva a l'hipocòtil a poder respondre a l'aplicació exògena d'hormona, al contrari que ocorre amb els tractaments d'ombra simulada. Aquest fet és important perquè ens diferencia el procés de senyalització entre òrgans que ocorre després de la percepció d'un estímul.

Alguns autors han comparat perfils d'expressió gènica de plàntules crescudes en llum i en foscor de cotilèdons i hipocòtils, i hi podem veure dos trets principals: 1) pràcticament no hi ha gens regulats antagonísticament en hipocòtil *versus* cotilèdon, de manera que es descarta la possibilitat que els gens diana estiguin regulats de manera diferencial en els dos òrgans, i 2) la llum activa diferents grups de gens en ambdós teixits (Bou-Torrent et al., 2008; Josse et al., 2008; Montgomery, 2008). Aquestes dades suggereixen que s'activen vies diferents en els dos teixits en llum, fet que explicaria la divergència de resposta de l'hipocòtil en presència/absència de cotilèdons. La comunicació entre òrgans, doncs, complementaria la informació percebuda pels diferents òrgans de la planta per tal de regular i contrastar la informació provinent de senyals exògenes (canvis en la raó R:FR) o endògenes (canvis en els nivells hormonals).

5. Conclusions

1. El promotor curt (470bp) de *SAUR15* és suficient per la resposta normal a ombra simulada i a hormones, i per la seva localització a nivell de teixit. Les E-box I, II, III, IV i V no són els únics elements del promotor de *SAUR15* involucrats en la inducció per BRs, Aux o ombra simulada. Així mateix, les AREs I, II, III descrites tampoc són imprescindibles per la correcta localització de l'expressió de *SAUR15*.
2. Membres de la subfamília HD-ZipII actuen com a elements integradors de les respostes de la SAS i a hormones. També són elements integradors els gens *BRI1*, *BES1*, *BAS1* i *SOB7*. Alhora membres pertanyents a la subfamília HD-ZipIII semblen tenir un possible paper integrador de les respostes de la SAS i a desenvolupament.
3. *ATHB4*, membre de HD-ZipII, és un regulador complex de les respostes de la SAS, alhora que hormonals. El doble mutant *athb4hat3*, de morfologia abaxialitzada, presenta una reducció de l'allargament de l'hipocòtil en les respostes a la SAS i a hormones,.
4. A nivell molecular *ATHB4* es localitza al nucli cel·lular, i com a mínim hi ha una senyal de localització nuclear al domini HD d'*ATHB4*. Un cop allà, *ATHB4* és capaç d'homodimeritzar i heterodimeritzar amb altres proteïnes, com BIM1, i de reprimir directament l'expressió de *SAUR15*.
5. Per tal que l'hipocòtil s'allargui en resposta a ombra simulada, cal la presència d'altres òrgans de la plàntula, tals com els cotilèdons i el meristem apical.
6. El model dels mòduls reguladors és una proposta que integraria les diferents vies de senyalització per tal de donar una resposta als diferents estímuls que percep una planta.

6

MATERIALS I MÈTODES

6. MATERIALS i MÈTODES

Els protocols i els materials utilitzats per la manipulació d'àcids nucleics, proteïnes, cultius i manipulació de bacteris al llarg de la tesi es descriuen a continuació, seguint els descrits a *Molecular cloning: A laboratory Manual* (Sambrook and Russell, 2001) i a *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, 1989).

L'aigua utilitzada va ser la destil·lada (dH₂O), mentre que pels experiments de bioquímica i biologia molecular fou la bidestil·lada (ddH₂O, amb el destil·lador i desionitzador d'aigua Millipore Milli-Q).

Les solucions utilitzades es van esterilitzar per calor humit amb una autoclau de vapor d'aigua a 120°C i una atmosfera de pressió, durant 20 minuts (o 15 minuts en el cas de protocols de llevats), a no ser que s'indiqui el contrari. El pH de les solucions i els medis s'ajusta abans de sotmetre'ls als cicles d'autoclau.

1. **Material biològic**

1.1. **Soques bacterianes**

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

- **DH5αF'**: soca d'*Escherichia coli* utilitzada per als clonatges de vectors.
- **TOP10**: soca d'*E. coli* utilitzada per als clonatges de vectors.
- **BL21 pGROE**: soca d'*E. coli* utilitzada per a la producció de proteïna.
- **C1C58/GV2260**: soca d'*Agrobacterium tumefaciens* utilitzada per al clonatge de vectors binaris utilitzats per a la transformació de plantes.

1.1.1. **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'*E. coli*. És recomanable partir d'un cultiu fresc de cèl·lules, de manera que primer fem un cultiu en placa i després 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).

Les cèl·lules competents s'han de provar abans d'utilitzar-les transformant 10ng de plasmidi control per determinar-ne l'eficiència.

Solucions emprades:

- **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).

1.1.2. Obtenció de cèl·lules electrocompetents

Igual que en l'apartat anterior, és recomanable partir d'un cultiu fresc de cèl·lules.

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 x 10¹⁰ cèl·lules/mL.
11. Fer alíquotes de 50 µL, congelar en neu carbònica i guardar a -80°C.

1.1.3. Medis de cultiu bacterians

Els medis, tampons i solucions utilitzats foren:

- **Medi LB pH 7.5 (autoclau):** bacto triptona 100 g/L, extracte de llevat 5 g/L, NaCl 10 g/L i aigua destil·lada. 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, MgSO₄ 1 M 2 mL/L i aigua destil·lada. Per al medi sòlid s'afegeix 15 g/L d'agar.

Suplements dels medis de cultiu bacterians

A la **taula M.1** es mostren els diferents antibiòtics utilitzats per suplementar els medis bacterians, les concentracions de les solucions estoc, el dissolvent en el que es preparen i les concentracions de treball.

			Concentració de treball		
Antibiòtic	Concentració estoc	Dissolvent	<i>E.coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>A.thaliana</i>
Ampicil·lina (Amp) Carbenicil·lina (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 µg/mL
Basta (PPT)			-	-	
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	Aigua	-	-	30 µg/mL
Cefotaxima (Cf)	100 mg/mL		-	-	100 µg/mL

Taula M.1. Antibiòtics utilitzats en el treball amb els bacteris *E.coli*, *A.tumefaciens* i amb plantes d'*A. thaliana*.

1.1.4. Condicions de cultiu de bacteris

El cultiu líquid de cèl·lules d'*E.coli* i d'*A.tumefaciens* es realitza en tubs de cultiu a 37°C i 28°C respectivament en agitació a 250 rpm. El cultiu sòlid es realitza en placa a 37°C.

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

1.2. Material vegetal

En aquest treball s'han emprat plantes d'*Arabidopsis thaliana* dels ecotips Columbia-0 (Col-0) i Landsberg *erecta* (Ler). A part d'*A. thaliana* s'han utilitzat les espècies *A. korshinskyi* i *Sinapis alba*.

1.2.1. Línies de guany de funció cedides

Línia	Gen	Descripció
P _{S15-2,3} :G	<i>GUS</i>	Sobreexpressió constitutiva del gen marcador <i>SAUR15</i> que conté 2,3 kb del promotor de <i>SAUR15</i> (Gil, P. & Green, P. J., 1997)
P _{35S} : <i>BRI1</i>	<i>BRI1</i>	Sobreexpressió constitutiva, línia creada per Joanne Chory i cedida per A.Caño.

<i>DS1, DS2, DS3</i>	<i>MYB77</i>	Sobreexpressió constitutiva, línies creades i cedides per Daniel P. Schachtman
<i>P_{35S}:HAT2</i>	<i>HAT2</i>	Sobreexpressió constitutiva, línies creades i cedides per I.Ruberti.
<i>P_{35S}:ATHB2</i>	<i>ATHB2</i>	Sobreexpressió constitutiva, línies creades i cedides per I.Ruberti.
<i>DR5:GUS</i>	<i>GUS</i>	Línia que conté l'element sintètic de resposta a auxines DR5 fusionat al gen reporter <i>GUS</i> (Ulmasov i col., 1997). Cedides per Dr. A. Caño.

Taula M.2. Línies de guany de funció en *A. thaliana* cedides utilitzades en aquesta tesi.

1.2.1. Línies mutants de pèrdua de funció

Línia mutant	Ecotip	Informació complementària
<i>bes1-D</i>	En-2	Mutant dominant. Cedit per A. Caño.
<i>bes1-Dbc7</i>	Col-0	Mutant dominant. Cedit per A. Caño.
<i>bzr1-D</i>	Col-0	Mutant dominant. Cedit per A.Caño.
<i>myb30-1</i>	Col-0	SALK_122884, del NASC.
<i>myb30-2</i>	Col-0	SALK_027644, del NASC.
<i>bas1-2</i>	Col-0	SALK_006781, del NASC.
<i>sob7-1</i>	Col-0	SALK_120416, del NASC.
<i>myb77-1</i>	Col-0	SALK_67655, del NASC.
<i>myb77-2</i>	Col-0	SALK_55373, del NASC.
<i>athb4-1</i>	Col-0	SALK_104843, del NASC.
<i>hat3-1</i>	Col-0	SALK_056541, del NASC.
<i>athb2-1</i>	Col-0	SALK_106790, del NASC.
<i>athb4-1hat3-1</i>	Col-0	Línia obtinguda pel creuament d' <i>athb4-1</i> i <i>hat3-1</i>
<i>hat1-1</i>	Col-0	SALK_059835, del NASC.
<i>hat2-1</i>	Col-0	SALK_0147145, del NASC.
<i>hat1-1hat2-1</i>	Col-0	Línia obtinguda pel creuament d' <i>hat1-1</i> i <i>hat2-1</i>
<i>rev-6</i>	Col- <i>er2</i>	Cedit per Ykä Helariutta (Otsuga et al., 2001).
<i>phb-13</i>	Col- <i>er2</i>	SALK 021684. Cedit per Ykä Helariutta.
<i>phb-13phv-11</i>	Col- <i>er2</i>	Cedit per Ykä Helariutta.
<i>phyB-9</i>	Col-0	Cedit per Dr. P.Quail (Reed et al., 1993)
<i>phyA-301</i>	Col-0	SALK_014575, del NASC.B
<i>athb4hat3phyB</i>	Col-0	Línia obtinguda pel creuament d' <i>athb4-1hat3-1</i> i <i>athb4-1phyB-9</i> .
<i>athb4hat3phyA</i>	Col-0	Línia obtinguda pel creuament d' <i>athb4-1hat3-1</i> i <i>phyA-301</i> .
<i>athb4bzr1-D</i>	Col-0	Línia obtinguda pel creuament d' <i>athb4-1</i> i <i>bzr1-D</i> .
<i>hat3bzr1-D</i>	Col-0	Línia obtinguda pel creuament de <i>hat3-1</i> i <i>bzr1-D</i> .
<i>athb4hat3bes1-Dbc7</i>	Col-0	Línia obtinguda pel creuament d' <i>athb4-1hat3-1</i> i <i>bes1-Dbc7</i> .
<i>stm11-1</i>	Ler	Cedit per M. Tsiantis.

Taula M.3. Línies de pèrdua de funció en *A. thaliana* cedides i utilitzades en aquesta tesi.

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'*A. 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>).

1.2.3. 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 vermicultita. 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 $22-24^\circ\text{C}$, 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.

Solucions emprades:

- **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.

1.2.4. Medis de cultiu de plantes

Per germinar llavors i créixer les plàntules en plaques de Petri en condicions estèrils va ser emprat el medi Murashige i Skoog (comunment anomenat medi MS). En algunes situacions prèviament descrites a la tesi s'ha enriquit el medi amb un 1% (p/v) de sacarosa.

Medi GM-0,5x pH 5.8 (autoclau): medi *Murashige & Skoog* amb vitamines 2.15 g/L, MES 0.25 g/L. Ajustar el pH amb KOH, i per últim s'hi afegeix 8 g/L d'agar.

1.2.5. Suplements dels medis de cultiu de plantes

Als medis s'afegeixen antibiòtics i hormones. A la **taula M.I** es mostren els diferents antibiòtics utilitzats, les concentracions de les solucions estoc, el dissolvent en el que es preparen, i les concentracions de treball.

1.2.6. Condicions de cultiu *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 $22-24^\circ\text{C}$ de Ta, i humitat no controlada.

1.3. Plasmidis

1.3.1. Vectors

1.3.1.1. Vectors de clonatge de productes de PCR

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

- pCR2.1 (Invitrogen): Vector utilitzat pel clonatge de productes de PCR pel sistema *T/A cloning*, Amp^R, Km^R.

1.3.1.2. Vectors binaris de clonatge per transformar en planta

- pCAMBIA1302: Vector binari per a la transformació d'*A. tumefaciens* 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.

- pCAMBIA1304: Vector binari per a la transformació d'*A. tumefaciens* 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.

- pBinAr: Vector binari per a la transformació d'*A. tumefaciens* que permet clonar un gen d'interès sota el promotor constitutiu 35S. Km^R en bacteris i plantes.

1.3.1.3. Vectors del doble híbrid de llevat

- pGADT7: Vector utilitzat pel clonatge amb el domini d'activació GAL4 del gen d'interès al N terminal. Amp^R en bacteris i Leu en llevat.

- pGBKT7: Vector utilitzat pel clonatge amb el domini d'unió al DNA de GAL4 del gen d'interès al N terminal. Km^R en bacteris i Trp en llevat.

- pDT1: Vector com a control positiu en els estudis de Y2H. Conté el Nterminal del SV40 fusionat al domini d'activació GAL4. Amp^R en bacteris i Leu en llevat.

- pVA3: Vector utilitzat com a control positiu en els estudis de Y2H. Conté el Nterminal del p53 fusionat al domini d'unió al DNA de GAL4. Km^R en bacteris i Trp en llevat.

1.3.1.4. Vectors per la producció de proteïna

- pGEX.4T.1: Vector utilitzat pel clonatge del gen d'interès amb la GST. Amp^R en bacteris.

- pRSET.b: Vector utilitzat pel clonatge del gen d'interès amb la His_{6x}. Amp^R en bacteris.

- pJF266: Sobreexpressió constitutiva per produir proteïna GST-His_{6x}. Amp^R en bacteris.

1.3.1.5. Vectors per biolística

- P_{35S}:RFP: Sobreexpressió constitutiva de la proteïna fluorescent vermella (RFP). Cedit per grup de Montse Pages.

1.3.2. Construccions

Plàsmid	Descripció	Vector	Insert	Resistència			Binari
				Bac	Planta	Llevat	
pCM10 P _{S15-0.7} :G	700 bp del promotor de <i>SAUR15</i> fusionats al gen marcador <i>GUS</i> , amb les 3 E-box descrites salvatges	pCAMBIA1304		Km	Hg		Binari
pBM1 P _{S15-0.7Em} :G	700 bp del promotor de <i>SAUR15</i> fusionats al gen marcador <i>GUS</i> , amb les 3 E-box descrites mutades	pCAMBIA1304		Km	Hg		binari
pMS15 P _{S15-0.47Em} :G	Promotor fraccionat de <i>SAUR15</i> (470bp) amb 3 Ebox mutades (I, II, III), GFPUS	pCAMBIA1304	pMR16.1	Km	Hg		binari
pMS16 P _{S15-0.47} :G	Promotor fraccionat de <i>SAUR15</i> (470bp) amb 3 Ebox wt, GFPUS	pCAMBIA1304	pCM9.4	Km	Hg		binari
pMS17	Promotor de <i>SAUR15</i> (700bp) amb l'ARE -161 mutada	pCR2.1	pCM9.4	Km, Amp			

pMS18	Promotor de <i>SAUR15</i> (700bp) amb ARE -161 i -218 mutades	pCR2.1	pMS17.5	Km, Amp			
pMS19	Promotor de <i>SAUR15</i> (700bp) amb l'ARE -161, -218 i -263 mutades	pCR2- TOPO	pMS18.5	Km, Amp			
pMS20 P _{S15-0.7Am:G}	Promotor de <i>SAUR15</i> (700bp) amb l'ARE -161, -218 i -263 mutades; GFP _{GUS}	pCAMBIA1304	pMS19.13	Km	Hg		binari
pMS21	Promotor de <i>SAUR15</i> (700bp) amb l'ARE -161 mutada i les 3 Ebox mutades (I, II, III)	pCR2.1	pMR16.1	Km, Amp			
pMS22	Promotor de <i>SAUR15</i> (700bp) amb l'ARE -161 i -218 mutades, i les 3 Ebox mutades (I, II, III)	pCRII-TOPO	pMS21.6	Km, Amp			
pMS23	Promotor de <i>SAUR15</i> (700bp) amb les 3 AREs mutades (-161, -218 i -263), i les 3 Ebox mutades (I, II, III)	pCRII-TOPO	pMS22B.12	Km, Amp			
pMS24 P _{S15-0.7Am+Em:G}	Promotor de <i>SAUR15</i> (700bp) amb les 3 AREs mutades (-161, -218 i -263), i les 3 Ebox mutades (I, II, III), GFP _{GUS}	pCAMBIA1304	pMS23.13	Km	Hg		binari
pMS29 P _{35S:ATHB4-GR}	Sobreexpressió constitutiva amb activitat induïble.	pBinAr	pCS13	Km	Km		binari
pCS19 P _{35S:ATHB4-GR}	Sobreexpressió constitutiva amb activitat induïble, línia creada per Céline Sorin.	pCAMBIA1300	pCS13	Km	Hg		binari
pJF288 P _{ATHB4:GG}	Sobreexpressió de la fusió dels gens reporters <i>GFP-GUS</i> sota el control de 1 kb del promotor del gen <i>ATHB4</i> .						binari
pMS30 AD-ATHB4	cDNA <i>ATHB4</i> amb l'AD, pel Y2H	pGADT7	pCS12.1	Amp		LEU2	
pMS31 BD-ATHB4	cDNA <i>ATHB4</i> amb el DNA -BD, pel Y2H	pGBKT7	pCS12.1	Km		TRP1	
pMS33	Promotor de <i>SAUR15</i> (700bp) amb el possible lloc d'unió d' <i>ATHB2</i> mutageneïtzat	pCR2- TOPO	pCM9.4	Km, Amp			
pMS34	Promotor de <i>SAUR15</i> (700bp) amb el possible lloc d'unió d' <i>ATHB2</i> mutageneïtzat	pCAMBIA1304	pMS33.2	Km	Hg		binari
pMS35	cDNA de HD-Zip de <i>ATHB4</i> , per seqüenciar	pCRII-TOPO	pCS12.1	Km, Amp			
pMS36	cDNA de HD-Zip-Ct de <i>ATHB4</i> , per seqüenciar	pCRII-TOPO	pCS12.1	Km, Amp			
pMS37 AD-HL	cDNA de HD-Zip de <i>ATHB4</i> fusionat a AD, per Y2H	pGADT7	pMS35.3	Amp		LEU2	
pMS38 AD-HLC	cDNA de HD-Zip-Ct de <i>ATHB4</i> fusionat a AD, per Y2H	pGADT7	pMS36.3	Amp		LEU2	
pMS39 BD-HL	cDNA of HD-Zip of <i>ATHB4</i> fusionat a BD, per Y2H	pGBKT7	pMS35.3	Km		TRP1	
pMS40 BD-HLC	cDNA of HD-Zip-Ct of <i>ATHB4</i> fusionat a BD, per Y2H	pGBKT7	pMS36.3	Km		TRP1	
pAG29 AD-BIM1	<i>AD-BIM1</i> per Y2H	pGADT7	pIR43	Amp		LEU2	
pAG32 AD-BES1	<i>AD-BES1</i> per Y2H	pGADT7	pAG30	Amp		LEU2	
pMS43	<i>ATHB4</i> (FL) en TOPO vector, per seqüenciar i utilitzar en BiFC	pCRII-TOPO	pCS12.1	Km, Amp			
pMS44	<i>ATHB4</i> (FL)::GST ; per utilitzar en purificació de proteïna	pGEX.4T.I	pCS12.1	Amp			
pMS45	<i>ATHB4</i> (FL)::His; per utilitzar en purificació de proteïna	pRSET.b	pCS12.1	Amp			
pMS51	pC1302 amb un MCS modificat	pC1302	dsMSO44-45	Km			
pMS52 NHL-GFP	<i>ATHB4</i> (Nt-HD-LZ) en un pC1302 modificat, per biolística	pMS51	pMG16	Km	Hg		binari
pMS53 HD-GFP	<i>ATHB4</i> (HD-LZ) en un pC1302 modificat , per biolística	pMS51	pMG17	Km	Hg		binari
pMS54 L-GFP	<i>ATHB4</i> (LZ) en un pC1302 modificat , per biolística	pMS51	pMG18	Km	Hg		binari

pMS55 LC-GFP	<i>ATHB4</i> (LZ-Ct) en un pC1302 modificat , per biolística	pMS51	pMG19	Km	Hg		binari
pMS56 HLC-GFP	<i>ATHB4</i> (HD-LZ-Ct) en un pC1302 modificat , per biolística	pMS51	pMG20	Km	Hg		binari
pMS57 NH-GFP	<i>ATHB4</i> (Nt-HD) en un pC1302 modificat , per biolística	pMS51	pMG21	Km	Hg		binari
pMS58 H-GFP	<i>ATHB4</i> (HD) en un pC1302 modificat , per biolística	pMS51	pMG22	Km	Hg		binari
pMS59	<i>ATHB4</i> (Nt) en pCRTOPO	pCRII-TOPO	PCR: JO284+MSO46	Km, Amp			
pMS60 N-GFP	<i>ATHB4</i> (Nt) en un pC1302 modificat , per biolística	pMS51	pMS59	Km	Hg		binari
pCS31 P _{35S} :HAT1	Sobreexpressió constitutiva de <i>HAT1</i> .	pBinAr		Km	Km		binari
pCS18 P _{35S} :HAT2-GR	Sobreexpressió constitutiva amb activitat induïble de <i>HAT2</i> .	pCS14					

Taula M.4. Plasmids utilitzats en aquesta tesi.

1.4. ENCEBADORS

Un llistat dels encebadors es descriu a continuació.

Oligonucleòtid	Seqüència	Ús - gen
MSO1	5'-CTAACTTCTCAGAIACCATTTATTGATTGTTCTTGG-3'	Mutagènesi dirigida ARE -161, Promotor <i>SAUR15</i>
MSO2	5'-CAATAAATGGTATCTGAGAAGTTAGTGCTAATGATGTC-3'	Mutagènesi dirigida ARE -161, Promotor <i>SAUR15</i>
MSO3	5'-GGCATGTGATATCTTTGAGATAAATAAGCCCCAATGAAGTTATC-3'	Mutagènesi dirigida ARE -218, Promotor <i>SAUR15</i>
MSO4	5'-GGGGCTTATTTATCTCAAAGATATCACATGCCAAATCTCTCTATAG-3'	Mutagènesi dirigida ARE -218, Promotor <i>SAUR15</i>
MSO5	5'-ACAACCTTCATATCCCTACATAATCTATAGAGAGATTTG-3'	Mutagènesi dirigida ARE -263, Promotor <i>SAUR15</i>
MSO6	5'-GATTATGTAGGGAATGAAGTTGTACCTAATGAACC-3'	Mutagènesi dirigida ARE -263, Promotor <i>SAUR15</i>
MSO7	5'-GGTCTGAAATATCTTTGAGATAAATAAGCCCCAATGAAGTTATC-3'	Mutagènesi dirigida ARE -218, Promotor <i>SAUR15</i> amb les E-box mutades
MSO8	5'-GGGGCTTATTTATCTCAAAGATATTCAGACCACAAATCTCTCTATAG-3'	Mutagènesi dirigida ARE -218, Promotor <i>SAUR15</i> amb les E-box mutades
MSO9	5'-GATTATGTAGGGAATGAAGTTGTGTACCTAATGAACC-3'	Mutagènesi dirigida ARE -263, Promotor <i>SAUR15</i>
MSO10	5'ca.aaa.ata.ctt.atg.cat.ttc.ttt.cat.acg.ttc.gtt.tat.ata.ac3'	Mutagènesi dirigida de la putative seq d'unió d' <i>ATHB2</i> , Promotor <i>SAUR15</i>
MSO11	5'tg.aaa.gaa.atg.cat.aag.tat.ttt.tga.ggt.ttt.tct.tta.tta.c 3	Mutagènesi dirigida de la putative seq d'unió d' <i>ATHB2</i> , Promotor <i>SAUR15</i>
MSO12	5' gaa.ttc.atg.cgc.gga.ggg.gga.agc 3'	Inserció diana EcoRI pel HD-Zip i HD d' <i>ATHB4</i> , pel Y2H
MSO13	5'-GCCCTCTTAGGAAATAGG-3'	<i>MYB30</i>
MSO14	5'-TGCGTCCTAAGAAACCCG-3'	<i>MYB30</i>
MSO15	5'-tttgaagaagcaagccc-3'	<i>MYB30</i>
MSO16	5'-CCCTTTCTTCACTCCTCC-3'	<i>MYB30</i>
MSO17	5'-CCAAGGACCATGTCGTTAAGC-3'	<i>BAS1</i>
MSO18	5'-TCTCCGGAAGGTGATTGG-3'	<i>BAS1</i>
MSO19	5'-TGGTCCAAGCATCGAAGC-3'	<i>SOB7</i>
MSO20	5'-AGTCATGACAGTAGTCC-3'	<i>SOB7</i>
MSO21	5'-CATTCAAGTATAGTAGCCG-3'	<i>BES1</i>
MSO22	5'-CATTCAAGTATAGTAGCCA-3'	<i>bes1D</i>

MSO23	5'- GAA CAT AGT ACA CTC AAT CCC g -3'	Genotipar HAT3 (amb CSO12)
MSO24	5'- GGT TTC AGA ACC GTA GGG CAA Gg -3'	Genotipar ATHB4 (amb JO285)
MSO25	5'- CTC CTC TCT TCA GTT TCC -3'	Genotipar MYB77 (amb MSO26 or MSO28)
MSO26	5'- CCT GAT CTT CCT CCG TCT CCG -3'	Genotipar MYB77 (amb MSO25)
MSO27	5'- TGC TCC GGT GGA TAC TGG -3'	Genotipar MYB77 (amb MSO28)
MSO28	5'- CCA AAA CTA CTC AAC CTT AGG -3'	Genotipar MYB77 (amb MSO27 or MSO25)
MSO29	5'- CCT GCG TCA ATG TAA TGT TCT G-3'	Amplificar GUS per RT-qPCR
MSO30	5'- TCT CTG CCG TTT CCA AAT CG -3'	Amplificar GUS per RT-qPCR
MSO31	5' -TAGAGCACCGCACAGCTGCC- 3'	Genotipar phyA (SA2)
MSO32	5' - GAA.GCT.ATC.TCC.TGC.AGG.TGG - 3'	Genotipar phyA (SA2)
MSO 33	5'- AAG TCG ACA ATG GGG GAA AGA G -3'	ATHB4 inici gen amb diana Sal I
MSO34	5'- GAT GCA AGC CTT TAC CTG G -3'	BZR1; forward per amplificar tamany més petits quan busquem la mutació puntual
MSO35	5'- CTC TAC CTG GTG ACA TGG C -3'	BES1; forward per amplificar tamany més petits quan busquem la mutació puntual
MSO40	5'- GCT AAC AAC CCA GCA GGA CTC CT -3'	RT-qPCR of PHB (directe)
MSO41	5'- TAA GCT CGA TCG TCC CAC CGT T -3'	RT-qPCR of PHB (revers)
MSO42	5'- GCT AAT CTT CTC TCG ATT GCG GAG GA -3'	RT-qPCR of PHV (directe)
MSO43	5'- GCT CGA TAG TAC CAC CAT TTC CAG TG -3'	RT-qPCR of PHV (revers)
MSO44	5'- c atg gCg tcg acA Aga tct gcc a -3'	mutagenesis de pC1302 per modificarel lloc BgIII (directe)
MSO45	5' - ct agt ggc aga tct tgt cga cgc -3'	mutagenesis de pC1302 per modificar el lloc BgIII (revers)
MSO46	5'- gg. gga.tcc .gcc.gtc.ttc.atc.gtc.gct.acc -3'	Per amplificar el domini Nt d'ATHB4, incloent el lloc BamHI
2x35S	5'-CTT-CGC-AAG-ACC-CTT-CC-3'	
LBb1	5'-CGT-GGA-CCG-CTT-GCT-GCA-ACT-3'	
Directe	5'-GTA-AAA-CGA-CGG-CCA-GT-3'	
Revers	5'-CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-AC-3'	

Taula M.5. Encebadors utilitzats en aquesta tesi. Es mostren tant els encebadors utilitzats en la generació de fragments per clonatge com els comunament utilitzats per comprovar-los.

1.5. Mapes de les línies SALK

Comprovació de la inserció

Per comprovar que la inserció de T-DNA està en el lloc que t'indiquen entrem a la pàgina <http://signal.salk.edu/>, T-DNA Express i busquem el codi del nostre gen a Query. Fem un zoom in amb les fletxes de dalt a la dreta (*figura M.1(a)*), per poder veure millor on està el nostre gen i quines són les línies amb una inserció de T-DNA disponibles. Cliquem sobre la línia interessada, i després a *Seq*. Fem un *copy-paste* de la seqüència i entrem a WU-blast (<http://www.arabidopsis.org/>). Si hi ha varies seqüències, les mirem totes i llavors agafem com a lloc d'inserció el q estigui més a l'origen (després si és T-DNA en directe o revers). Canviem el dataset a: TAIR8 Genes (+introns, +UTRs)(DNA), i correm el blast amb la seqüència del T-DNA. Ens dona la orientació respecte al nostre gen, que en aquest cas és *reverse* (per això la fletxa està en sentit oposat). Si cliquem a sobre ens porta a l'alineació, on ens indica exactament els parells de bases que coincideixen. Copiem la seqüència del gen, i obrim l'arxiu *word* on tenim la seqüència sencera del gen (*figura M.1(b)*).

La busquem, i un cop la trobem ho marcarem de la següent manera: les tres primeres bases de la inserció es marquen en blau; les dues següents es marquen en verd, que NO coincidiran amb la inserció però que ens serviran per veure la orientació del T-DNA (figura M.1(c)).

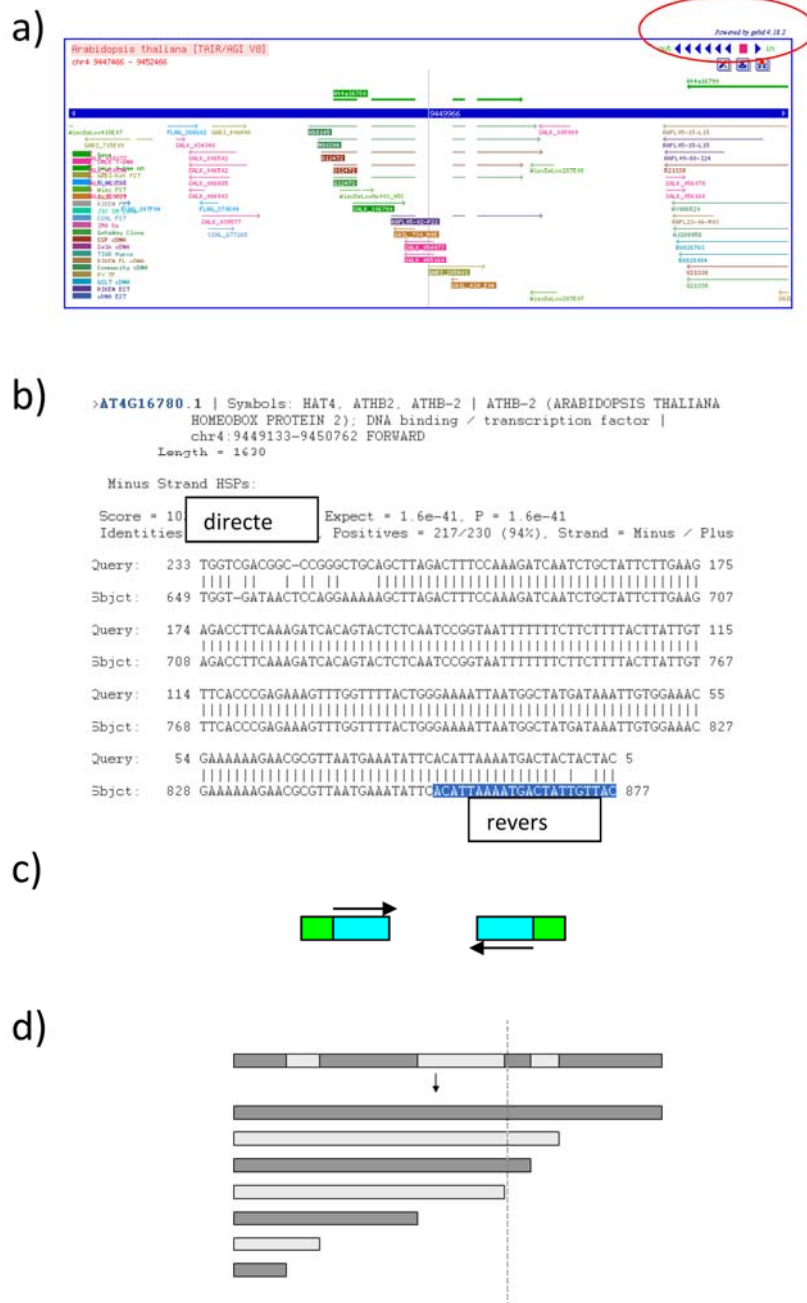


Figura M.1. Com realitzar mapes de les línies d'inserció de T-DNA. (a) Captura de pantalla de <http://signal.salk.edu/>, on es mostren totes les línies mutants disponibles pel gen buscat. En vermell es marca el zoom. (b) Resultats després de córrer la seqüència d'una línia mutant seleccionada anteriorment en un WU-blast a <http://www.arabidopsis.org/>, on es mostra la seqüència coincident. (c) Esquema de com es marca la direcció de la senyalització del T-DNA, on les tres primeres bases de la inserció es marquen en blau i les dues següents en verd. (d) Esquema de powerpoint on es marquen els diferents introns (coloració clara) i els exons (coloració fosca).

Realització del mapa

Obtenim la seqüència des de TAIR (www.arabidopsis.org). Des de MapLinks / Sequence Viewer veiem que en vermell ens indica en quin cromosoma es troba el gen. Ens posem a sobre del gen al final de la finestra, i al final del menú emergent que sortirà cliquem a "Nucleotide Sequence View". La finestra que obtindrem és el genòmic, on es trobarà identificat el gen amb el codi al costat, i amb els introns, exons, regions 5'UTR i 3'UTR marcades, així com el codó d'inici ATG i el codó d'stop. Si el gen està en la orientació contrària, marquem la opció de dalt a la dreta "Choose strand to view" i hi posem "complement strand". Podem copiar la seqüència directament i la portem al *word*. Marquem amb els mateixos colors els introns (que estan en minúscula), els exons i les regions 3' i 5' UTR. Al costat de la informació de la font, hi trobarem una pestanya on també ens indica el tipus de regió on ens trobem, de manera que és més fàcil poder marcar les diferents zones.

Exons	Taronja
Introns	Lila
5' i 3' UTR	Vermell
Codó inici/stop	Subratllat en vermell

Taula M.6. Codi de colors per a la realització de mapes gènics.

Obrim el powerpoint, un dels arxius pre-existents amb un mapa ja fet. Esborrem les dades que hi ha i desagreguem els rectangles. Els posem un a sota de l'altre, tenint en compte que els foscos són els exons i els clars els introns. El tamany dels fragments serà proporcional al de parells de bases; amb el word seleccionem des de l'ATG fins al codó STOP, i el nombre de parells de bases que ens doni serà la longitud del rectangle. Ex: si tenim un gen de 548bp, el rectangle el farem de 5,48cm de llarg (*figura M.1 (d)*). Per modificar-ho seleccionarem el rectangle i a propietats posarem la xifra directament. Procedirem de la mateixa manera amb la resta d'introns i exons, i un cop acabat el gen tornarem a ajuntar tots els fragments, tot agrupant-los. Marquem les distàncies, hi indiquem els oligos principals, i les insercions de T-DNA.

En la seqüència del word, un cop ja contabilitzats tots els parells de bases necessaris, hi podem marcar els encebadors que es demanen. Per dur-ho a terme seleccionem la seqüència de l'oligo i la rotulem groga. Deixem dues línies de separació a dalt si l'oligo és *forward*, o a baix si és *reverse*, i hi escrivim el nom i dues fletxes en el sentit corresponent.

2. Metodologies

2.1. TECNIQUES DE BIOLOGIA MOLECULAR DELS ACIDS 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: mitjançant lisi alcalina o mitjançant un kit.

a) 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 clonatsges 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 2 min. a velocitat màxima (13000 rpm). Descartar el sobrenedant.
3. Afegir 150 µL de tampó P1. Resuspendre bé el sediment de bacteris amb l'ajuda del vòrtex o rasant amb la gradeta.
4. Afegir 150 µL del tampó P2. Agitar suaument el tub per inversió unes 4-5 vegades. Incubar no més de 5 min. a RT.
5. Afegir 150 µL 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 (13000 rpm).
6. Passar el sobrenedant a un nou tub eppendorf, afegint-hi 900 µL d'etanol 100%. Incubar 2 min. a RT. Centrifugar 10 min a velocitat màxima (13000 rpm).
7. Descartar el sobrenedant i afegir 700 µL d'etanol 70%. Centrifugar 5 min. a velocitat màxima (13000 rpm).
8. Decantar l'etanol i deixar assecar el DNA a l'aire 10 min. o fins que s'evapori tot l'etanol.
9. Afegir 50 µL de TE 1x o aigua. Guardar a 4°C.

Solucions emprades:

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

b) 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. Alíquota de cèl·lules competents TOP10 (100 µl). En gel, descongelar 5-10'.
2. Afegim 1-5 µL (10-20 ng) de DNA i barrejar suaument (5 µl de la lligació).
3. Traiem les plaques a RT (dues per cada lligació).
4. Incubem 30' en gel. Engueuem el *termoblock* a 42°C.
5. Posem les mostres 1' a 42°C.
6. Posem les mostres 1' en gel.
7. Afegim 900 µl de LB líquid (Vt 1ml) sense antibiòtics i incubem a 37°C durant 1h agitació a 250 rpm.
8. Centrifuguem 2' a màxima velocitat.
9. Si hem transformat una lligació, traiem 800 µl i amb els 200 restants resuspenem amb cura i deixem la punta dins per plaquejar. Si el que transformem és un plàsmid que ve de miniprep/spinprep, no fem la centrifugació i plaquegem directament 50 i 150 µl; la resta ho deixem a la nevera.
10. A la campana plaquegem 100 µl em cada placa, ho escampem amb la nansa de sembra fins que estigui sec i ho incubem cap per avall a 37°C O/N.
11. L'endemà comprovarem la orientació de l'insert per PCR.

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

Nota:

- Si sembrem em plaques IPTG-XGal, comprovarem que l'insert està correcte perquè les colònies seran blanques (haurem interromput el LacZ).
- Si no volem venir l'endemà a treure les plaques (per exemple, si transformem un divendres i no volem venir el dissabte), podem deixar-les el divendres a 37°C i abans de marxar les deixem a la nevera o sobre la poiana (o fins i tot a la càmera INKOA a 22°C) ben precintades perquè no s'assequi el medi, cap per avall fins el dilluns.

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

Les cèl·lules d'*A.tumefaciens* se transformen primer amb un plasmidi binari, que després s'introduirà a la planta establement mitjançant transformació per infiltració floral (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 (de l'anglès *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. El comercial utilitzat fou *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen), que es caracteritza 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. Les seqüències dels encebadors emprats per les PCR 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, i les anàlisis qPCR de l'expressió gènica posteriors es realitzaren com està descrit a l'apartat 2.1.3.3. En el nostre treball s'han emprat encebadors homòlegs a la seqüència d'interès, descrits a la taula M.5. 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. Es van realitzar tres repliques biològiques per cada mostra.

Procediment:

a) Extracció del RNA total de 40-50 plàntules de dia 7 crescudes en W utilitzant el kit RNAeasy kit de Qiagen, seguint les instruccions del fabricant (sobre uns 40 µg). Les mostres de RNA es van quantificar amb un nanodrop ND-8000.

b) Tractament DNase de 8.5 µg utilitzant el kit DNase free de AMBION.

- X µL mostra RNA (8.5 µg), H₂O fins a 44 µL.
- 5 µL 10x tampó DNase I
- 1 µL rDNase, barrejar suaument.

S'incuba 20-30' a 37°C. I s'afegeix 5 µL DNase Inactivation Reagent, es barreja bé. S'incuba 2' a RT, barrejant de tant en tant i es centrifuga a 10000xg Durant 1,5'. Es transfereix el RNA a un nou tub i s'emmagatzema a -20°C fins que s'hagi d'utilitzar.

c) RT: Utilitzem 10,5 µl (~2µg) del pas anterior per la reacció RT utilitzant M-MLV Reverse Transcriptase d'INVITROGEN.

- 10.5 µL mostra RNA del pas anterior
- 0,5 µL of oligo(dT)15 a 100 µM.
- 1 µL 10mM dNTP cadascu.

Escalfar a 65°C durant 5', i ràpidament ho posem en gel.

- 4 µL 5x tampó First Strand.
- 2 µL 0.1M DTT.
- 1 µL RNA guard.

- 1 µL (200 unitats) de M-MLV RT, barrejar bé.

S'incuba a 37°C durant 50'. S'inactiva la reacció escalfant a 70°C durant 15'. Es manté en gel fins al moment de fer la PCR, o guardar a 4°C.

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:

- desnaturalització inicial 3' a 94°C,
- 30 cicles de PCR que engloben una desnaturalització de 30" a 94°C, una hibridació de 30" a 55°C i una extensió de X" a 72°C (depenent del tamany de l'insert a amplificar),
- finalitzant amb una extensió final de 3' a 72°C.

Els reactius utilitzats per una reacció de PCR foren 104-106 còpies DNA motlle; 1X Tampó PCR; 1.5mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; 200 nM encebador directe; 200 nM encebador complementari; 1-2 unitats DNA polimerasa termoestable i H₂O, a un volum final de 25 µl.

Solucions emprades:

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

Nota:

En el cas de PCR de colònies de bacteris *E.coli*, el DNA motlle de la PCR s'hi afegeix picant amb una punta la colònia i submergint la punta a la barreja de PCR. Per a colònies d'*A.tumefaciens*, es pica amb una punta la colònia i es dilueix en 10 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. PCR quantitativa

Es prepara una dilució 1:10 en H₂O del cDNA de l'apartat 2.1.3.1. (de ~80ng/μl a 15-25ng/μl).

- 2 μL cDNA (15-25 ng/μL).
- 10 μL Light Cycler® 480 SYBR Green I Master Mix.
- 0,6 μL encebador directe (10mM, concentració final: 300nM).
- 0,6 μL encebador revers (10mM, concentració final: 300nM).
- 6,8 μL H₂O.

Es prepara primer la master mix menys el cDNA, llavors s'aliquota en 18 μl en la placa multipous seguint el patró de distribució que volguem utilitzar. Cada mostra s'analitza fent tres replicues tècniques per minimitzar possibles errors de pipeteig.

L'aparell que s'utilitza és *Roche Light Cycler® 480*. Sol ser una desnaturalització inicial de 3' a 94°C, i 40 cicles de desnaturalització 30" a 94°C, hibridació i extensió de 30" a 60°C i la dissociació. Per utilitzar la màquina, l'engeguem i obrim el programa LightCycler®480 (usuari: admin; contrassenya: LightCycler480). A la pantalla principal ens indicarà que està "Stanby: no NWP¹". Creem una carpeta on guardarem els arxius clicant a la finestra  , on hi posem el

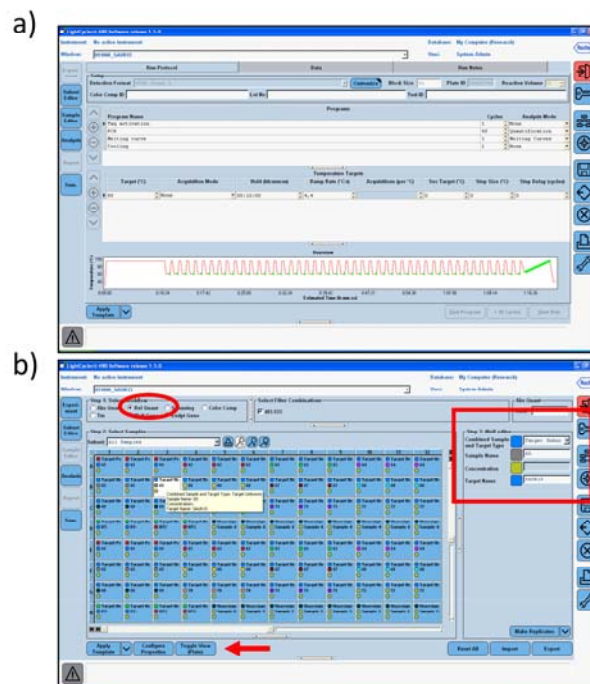


Figura M.2. Com utilitzar el programa LightCycler®480 . (a) Captura de pantalla on es mostra com iniciar la plantilla per un experiment de RT-qPCR. (b) Captura de pantalla de l'editor del programa on es mostren les diferents opcions de cada pou de la placa. La fletxa i els requadres vermells assenyalen el que està indicat a la memòria.

¹ MWP: de l'anglès MultiWell Plate

nostre nom. Creem un nou experiment, i hi apliquem la plantilla (Template/protocolo/Roche SyBr Green) (*figura M.2(a)*). Obrim la safata de la placa i la hi introduïm, de manera que l'aparell la detecta (MWP loaded). Correm l'experiment, i després anomenem el projecte.

Els resultats s'analitzen amb el programari Light Cycler® 480 (versió 1.5.0SP3), i s'exporten al format Excel. Els valors mitjans de cada mostra es van calcular amb tres replics tècniques i es van normalitzar amb els valors mitjans pel gen *housekeeping* UBQ10. Els resultats mostren la mitjana estadística \pm l'error estàndard de tres replics biològiques. El programa ens permet etiquetar els pous anant a *subset editor*, on podem crear grups que ens permetran analitzar les dades posteriorment (*figura M.2(b)*); afegim un grup clicant al símbol "+". A l'editor de mostres (*sample editor*) també hi podem editar informació dels pous, a *toggle view* hi activem *Rel Qaunt* i seleccionant els pous que volem, podem donar la informació del tipus de mostra (control negatiu, desconegut o un control de referència), donar-li el nom (relacionat amb la mostra d'extracció de RNA), la concentració o el nom del gen que estem amplificant.

2.1.3.4. 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 emprades:

- **Tampó de carrega 6X:** glicerol 30% (v/v), xilencianol FF 0.25% (p/v), blau de bromofenol 0.25% (p/v), EDTA 0.5M pH 8.
- **Tampo 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 del CRAG 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, Genedoc i NTI vector (Invitrogen).

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.

a) 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.

b) 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.

c) 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*

Per tal finalitat es van seguir dos mètodes diferents en funció de l'objectiu final. Per a processar les mostres per a una RTqPCR es va utilitzar el kit de Qiagen d'extracció de RNA, mentre que per realitzar Northern es va seguir el protocol descrit a continuació. En l'aïllament de RNA es parteix 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' 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' 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' 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' a 13000 rpm a 4°C.
11. Eliminar el sobrenedant i afegir 500 µL d'etanol 70% (v/v).
12. Centrifugar 10' a 13000 rpm a 4°C.
13. Eliminar el sobrenedant i deixar que el sediment s'assequi totalment a TA.
14. Resuspènere el sediment en 50-100 µL d'aigua estèril. Guardar l'RNA a -20°C o -80°C.

Solucions emprades:

- **Tampó d'extracció:** 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:** 40.8 g d'acetat de liti en 100 mL d'aigua, autoclavat.

2.1.8. Quantificació d'àcids nucleics

La quantitat de DNA o de RNA present en una mostra es va mesurar al nanodrop, llegint la D.O. a una λ de 260 nm. Un valor 1 de D.O. a 260 nm es correspon aproximadament a 50 µg/mL de DNA bicatenari i 40 µg/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 dona 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.

2.2. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR DE PROTEÏNES

2.2.1. Producció i purificació de proteïnes

Per a la producció de proteïnes es van realitzar dos tipus de cultiu que difereixen en el volum utilitzat.

2.2.1.1. Producció a petita escala

Procediment:

1. Es procedí a fer un cultiu en 3ml de LB + Cb + Chf (Cloramfenicol) de tres colònies de cada plasmid en estudi.
2. Agafem 1ml (de les tres rèpliques) a les 0h, i s'hi afegeix IPTG en una concentració final de 1mM.
3. Agafem 1ml a les 2h i 4h després d'haver-hi afegit l'inductor.
4. A les mostres els hi fem una centrifugació a màxima velocitat durant 3 minuts, eliminem el sobrenedant i resuspenem el *pellet* em 50 µl d'aigua amb la pipeta. En campana, hi afegim 50 µl de 2xTM+βmercaptoetanol, i fem un vòrtex (evitem tocar amb la pipeta perquè hi ha el β-mercaptoetanol). Ho emmagatzemem a -80°C.

2.2.1.2. Producció i purificació a gran escala

Procediment:

Producció de proteïna a gran escala

1. Piquem 3 colònies de la placa i fem un cultiu o/n en 3ml LB + Cb + Chf. El deixem al shaker de 28°C. Perquè el cultiu no creixi en excés, piquem les colònies entre 4-5 de la tarda, i és important que les colònies siguin fresques (menys d'1 mes). Fem tres rèpliques (A, B, C) per si de cas no creixés bé.

2. En un Erlenmeyer estèril amb 200 ml de LB + Cb + Chf hi inoculem 1 ml del precultiu, fent una dilució 1:200. En un temps d'unes 4 hores mirem la DO_{600} , i quan estigui entre 0.5-0.7 procedim al següent pas. Abans que arribi a la DO desitjada, podem anar descongelant l'inductor IPTG. (200 ml LB + 200 μ l Cb + 60 μ l Chf)
3. Agafem 1 ml del cultiu i el posem en un Eppendorf en gel. Aquest serà el que anomenarem T0h.
4. A la resta de cultiu hi afegim IPTG en una concentració final de 1mM (stock 100 mM, normalment seran uns 2ml). $200\text{ml cultiu} * (1000 \text{ ml} / 100 \text{ mmols stock}) * (1 \text{ mmol treball} / 1000 \text{ ml}) = 2 \text{ ml IPTG}$
5. Ho incubem 4 hores en el shaker a 28°C. Abans que arribin les 4h, podem manar descongelant els inhibidors de proteases (els posem al gel amb guants, a la caixa N; sinó, al magatzem amb els antibiòtics).
6. Guardem 1 ml en un Eppendorf, aquest serà el nostre T4h. Ho deixem en gel.
7. La resta ho centrifuguem en un tub de 500ml amb el rotor JA10 durant 10 minuts a 7500 rpm.
8. Mentrestant, preparem el tampó de lisi més els inhibidors de proteases. Necessitarem 20 ml de tampó de lisi (a la porta de la nevera), on hi haurem d'afegir: 20 μ l E-64, 20 μ l PMSF, 50 μ l leupeptina (L), 20 μ l pepstatina (P) i 20 μ l d'aprotinina (A).

Inhibidors de proteases	[stock]	Dilució de treball	[treball]	Volum en 20ml tampó de lisi
Leupeptina	21 mM	200x	105 μ M	50 μ l
Pepstatina	1.46 mM	1000x	1.46 mM	20 μ l
Aprotinina	10 mg/ml	1000x	10 μ g/ml	20 μ l
E-64	1 mg/ml	1000x	1 μ g/ml	20 μ l
PMSF	100 mM (0.1M)	1000x	100 μ M	20 μ l

Taula M.7. Inhibidors de proteases i fosfatases utilitzats en la producció i purificació de proteïnes.

9. En paral·lel, podem preparar les postres T0h i T4h per congelar-les a -80°C. Fem una centrifugació a màxima velocitat durant 3 minuts, eliminem el sobrenedant i resuspenem el *pellet* em 50 μ l d'aigua amb la pipeta. En campana, hi afegim 50 μ l de 2xTM+ β mercaptoetanol, i fem un vòrtex (evitem tocar amb la pipeta perquè hi ha el β -mercaptoetanol). Ho emmagatzemem a -80°C.

Volum 100 μ lT0h
Volum 100 μ lT4h

10. Descartem el sobrenedant, i ens quedem amb el *pellet*. Hi afegim els 20 ml, remenem per resuspendre i ho passem a un falcon de 50ml. El congelem a -80°C.

purificació de proteïna a gran escala

11. Descongelar el Falcon en gel, tornar a congelar i descongelar de nou (l'hem de descongelar almenys dues vegades).

12. Sonicar 3x30" mantenint la mostra en gel (en una caixeta de porexpan; paràmetres 10% d'amplitud, i fixem el temps).
13. Centrifuguem 15' a 10.000g a 4°C (centrífuga refrigerada que hi ha a la sisena planta, al costat dels autoclaus).
14. Aquí ja separem dues fases (tot en gel):
- Fase INSOLUBLE** (P de pellet): Ho guardarem resuspenent-lo en 500 µl d'aigua, i afegint 500 µl de 2xTMβ-mercaptoetanol a -80°C (o a -20°C). Volum 1ml P
 - Fase SOLUBLE** (Sol de soluble): Passem el sobrenedant a un nou Falcon, i d'aquí agafem 1ml (al que no afegirem res, només el deixarem en gel, i l'anomenarem Sol) Volum 1ml Sol
15. A la fase soluble hi afegim 200 µl de la resina de 50% *d'slurry* ($V_T = 20.2\text{ml}$), i resuspenem per agitació a l'orbital de la càmera freda com a mínim mitja hora (per assegurar-nos una millor l'adherència a la resina ho deixem 1h30').
16. freda.
- Fase INSOLUBLE**: Compte perquè no és fix (la resina queda al fons del tub i de vegades costa una mica de veure, sobretot si el plàstic està entelat del canvi de temperatura). Rentarem la resina amb 5 volums de *binding buffer* (BB) per cada volum *d'slurry* inicial, és a dir, en el nostre cas serà 1ml de BB. Invertim el tub per remenar bé i amb la pipeta ho passem a l'Eppendorf.
 $200\ \mu\text{l}\ \text{slurry} * (5\ \text{volums}\ \text{BB} / 1\ \text{volum}\ \text{slurry}) = 1\ \text{ml}\ \text{BB}$
 - Fase SOLUBLE**: guardem 1ml de control al que anomenarem SAR (*Soluble After Resin*). Volum 1ml SAR
17. Sedimentem per centrifugació 5' a 500g a la càmera freda.
- Fase INSOLUBLE**: Hi afegim 1ml de BB i procedim amb el punt 18.
 - Fase SOLUBLE**: Agafem 1ml com a control i la resta ho descartem. Quasi tot el volum serà l'1ml que guardarem, la resta serà la resina. Volum 1ml C1
18. Centrifuguem 5' a 500g.
- Fase INSOLUBLE**: Ho resuspenem amb 100 µl del buffer d'elució (EB). Eluïm la proteïna amb 0.5 volums d'EB per cada volum *d'slurry*. Procedim al punt 19.
 $200\ \mu\text{l}\ \text{slurry} * (0.5\ \text{volums}\ \text{EB} / 1\ \text{volum}\ \text{slurry}) = 100\ \mu\text{l}\ \text{EB}$
 - Fase SOLUBLE**: Agafem 1ml com a control i la resta ho descartem. Volum 1ml C2
19. Posem el tub 10' a l'orbital de la càmera freda.
20. Sedimentem per centrifugació 5' a 500g.
- Fase INSOLUBLE**: L'eluïm amb 100 µl d'EB. El posem a l'orbital de la càmera freda 10' i passem al punt 21.
 - Fase SOLUBLE**: Aquest serà l'eluït número 1 (aproximadament 100 µl), el posem en un eppendorf i el deixem en gel. Volum 100µl E1
21. Sedimentem per centrifugació 5' a 500g.
- Fase INSOLUBLE**: L'eluïm amb 100 µl d'EB. El posem a l'orbital de la càmera freda 10' i passem al punt 22.
 - Fase SOLUBLE**: Aquest serà l'eluït número 2 (aproximadament 100 µl), el posem en un eppendorf i el deixem en gel. Volum 100µl E2
22. Sedimentem per centrifugació 5' a 500g.
- Fase INSOLUBLE**: el descartem.
 - Fase SOLUBLE**: Aquest serà l'eluït número 3 (aproximadament 100 µl), el posem en un eppendorf i el deixem en gel. Volum 100µl E3

23. Agafem tots els tubs que tenim en gel i els guardem a -80°C .

2.2.2. Quantificació de proteïnes

Les mostres obtingudes segons el protocol anterior van ser quantificades utilitzant Bradford i es van llegir les absorbàncies a una λ_{595} en un espectrofotòmetre. Es féu una recta patró amb concentracions conegudes de BSA.

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.

2.2.3.1. Preparació del gel de proteïnes

Procediment:

1. S'agafen els suports per fer el gel del *miniprotean* i es col·loquen els vidres ben nets i secs en els suports. Assegurem que els vidres estan ben anivellats per sota i els fixem al suport posant la base amb la goma per tal d'aguantar el gel.
2. Per separar proteïnes d'entre 66 i 14.2 KDa (*low molecular marker*) farem un gel desnaturalitzant amb un percentatge de poliàcrilamida de 12%-PAGE.
3. Primer preparem el *lower* i afegim d'1-1.5 ml d'aigua o d'etanol 70% suaument per tal de no destorbar el gel però suficient per anivellar-lo.
4. Un cop polimeritzat (veiem clarament una interfase amb l'aigua, 30' aproximadament), preparem l'*upper buffer* i just abans de posar-hi l'APS i el temed, posem uns papers de 3MM tallats a la llargada del gel per assecat l'aigua (ho absorbeix per capil·laritat).
5. Hi afegim el buffer i el pinte (l'enfonsem bé, amb les protuberàncies de cara a nosaltres).

LOWER GEL (separador)

6. Preparem 8 ml (Taula M.7) i en carreguem 7ml (amb la P_{1000} posem 1 a 1ml), hi posem l'aigua i ho deixem 30 minuts.

Stocks	12%
40% acrilamida	2.4 ml
4x lower buffer	2.0 ml
H ₂ O	3.6 ml
10% APS ²	50 μ l
Temed	5.5 μ l

Taula M.8. Composició del gel separador SDS-PAGE en una electroforesi de proteïnes.

7. Primer hi posem l'acrilamida, el *lowerbuffer* i l'aigua i ho barregem. Després hi posem l'APS i remenem, i per últim posem el Temed i barregem. El lloc d'emmagatzematge és: l'acrilamida i l'APS estan a 4°C , i el Temed està a la càmera freda.

² L'APS (presulfat d'amoni) permet que tingui lloc la reacció.

UPPER GEL (concentrador)

8. És de 4% acrilamida (Taula M.8), i hi carreguem 3ml per gel (o fins que veiem q està quasi ple). Ho carreguem tot i hi posem el pinte (sobresortirà, però és normal; quan estigui solidificat ja ho netejarem i ho llencem a les escombraries normals). Després de polimeritzar es treu el pinte i es renten els gels amb aigua per netejar els pous.

Stocks	4%
40% acrilamida	0.3 ml
4x upper buffer	0.75 ml
H ₂ O	1.95 ml
10% APS	20 µl
Temed	5 µl

Taula M.9. Composició del gel concentrador SDS-PAGE en una electroforesi de proteïnes.

Quan estigui polimeritzat (ho veurem per les restes que queden al vas de precipitats on hem preparat la solució pels gels), procedirem a marcar amb un retolador petit els pous, per tal de facilitar el carregat de les mostres posterior. En el cas que vulguem guardar els gels per l'endemà, els traiem del suport, els emboliquem amb plàstic i els posem a la nevera.

Treiem el gel del suport, els pintes i hi passem aigua amb el flascó rentador, per treure possibles restes d'acrilamida. Netegem el vidre i l'assequem. Posem els pintes al suport per córrer (en el cas que només haguem de correr un gel, posarem dos pintes buits a l'altre costat). Apretem els gels cap a baix per assegurar-nos que queden ben enganxats a la base, i tanquem els suports apretant les tanques cap a l'interior de la cubeta. Posem l'estructura a la cubeta gran i omplim el centre amb el running buffer 1x fins quasi al final de tot (n'hi ha de l'stock comú 10x al magatzem). Omplim la resta de la cubeta amb el buffer.

Preparació de les mostres

Mentrestant, podem anar preparant les mostres. Les descongelem en gel durant 5-10', i llavors en funció del tipus de mostra que sigui el processarem d'una manera o altra per aconseguir la concentració equiparable entre mostres.

Electroforesi

Important: fixar l'amperatge a 20 mA/gel (per dos gels el posem a 40 mA), i el voltatge a 150 V. Ho deixem de 1h30' a 2h.

Tinció Coomassie

El fem per confirmar la presència de la proteïna de fusió.

Procediment:

- Un cop corregut el gel (veurem el front d'avanç quasi al final del gel) el traiem del motlle, traiem el vidre superior i ens ajudem d'aquest per tallar la zona de concentració (upper gel). El llancem a la paperera i la resta la posem en un taper dels quadrats. Hi afegim el Coomassie (que cobreixi tot el gel) i ho posem en agitació 30' a RT.
- Retornem el blau de Coomassie al pot de la campana (es pot reutilitzar), i farem un primer rentat de 10 minuts amb la solució 30% metanol, 10% àcid acètic que preparem abans d'utilitzar (600ml aigua, 300ml metanol, 100ml àcid acètic glacial; tot en campana). Ho deixem a l'agitador.
- Passats els 10 minuts, en campana i amb cura llancem la solució a l'envàs rotulat amb "Coomassie", i hi afegim de nou la solució de rentat una mitja hora més, tot posant-lo al shaker.
- Fem un altre rentat de mitja hora, i al final el podem deixar tot el cap de setmana en aigua al shaker.

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 emprades:

- **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 RT 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 RT en agitació.
5. Incubar 30 min. amb l'anticòs secundari anti-anticòs primari en tampó TBST 1X amb 5 % de llet en pols a RT en agitació.
6. Rentar 5 x 5 min. amb TBST a RT en agitació.
7. Reacció ECL Plus i revelat segons les instruccions del fabricant.

Per revelar:

Encenem l'aparell (**LAS4000**) 5' abans, perquè s'ha de refredar a -25°C. Quan acabem hem de tenir en compte que si hi ha un usuari darrere no haurem d'apagar l'aparell, sinó deixar-lo encès perquè mantingui la temperatura.

Paràmetres a modificar:

- Tray position:
Marcar chemiluminescence
Tray position number 1 (per una membrana)
- Exposure type: Marquem Precision. Overlap les senyals cada Xt.
- Exposure time: Marquem MANUAL. Podem començar amb 30 segons. Si es veu bé, posem 1 minut. Si no, doncs ho incrementem fins a 5'.
- Sensitivity/Res: Standard
- Image acquire: NO ho marquem.

En un eppendorf hi posem 500 µl A + 500 µl B, fem un vòrtex. Si ha d'estar molta estona el tub "esperant", el tapem amb paper de plata perquè no li toqui la llum. Assequem la membrana en paper per capil·laritat i la posem als vidres. Hi afegim 1ml del mix, agafem la membrana amb les pinces i hi fem un vuelta/vuelta. L'assequem per la base i ho posem dins una funda de plàstic. L'agafem i la posem dins l'aparell. Apretem a *focusing*, posem bé el gel (fer el *focusing* equival al *preview* de la càmera, centrat). I apretem START. Save/Fuji/TIFF.

Per guardar les fotos:

Digitize/Automatic/Start (de 15 a 30 segons).

Per obtenir una foto del marcador en camp clar, desseleccionem la luminiscència i posem l'opció de sota. El temps el posem automàtic.

Solucions emprades:

- **Tampo 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-GST. Anticòs monoclonal produït en conill, (Healthcare AntiGST; 27457701V). Dilució de treball 1:10.000.

Anticossos secundaris:

- α-rabbit HRP, (Pierce antirabbit; 1858415). Dilució de treball 1:5.000.

2.2.6. Doble híbrid de llevat (Y2H)

El sistema de **doble híbrid de llevat** és una bona aproximació per testar interaccions proteïna-proteïna usant un model en llevat i gens reporters d'auxotrofies i colorimètrics.

El manual de Clontech s'utilitza com a guia, i la soca a transformar és la AH109, la qual presenta 3 gens reporters: HIS3, ADE2 i LacZ, per tal de disminuir els falsos positius de la tècnica.

Es treballa sempre en condicions estèrils, degut a l'absència d'antibiòtics en el medi de creixement dels llevats, de manera que són fàcilment contaminables. Totes les solucions han de ser estèrils, sigui per filtració (els *drop outs*) o per autoclavat.

Procediment:

Refrescar el llevat:

Agafem l'stock de glicerol i fem una triple estria de la soca AH109 en un medi YPD, cobrim les plaques amb plàstic per evitar que s'assequin i les deixem 2-3 dies a 28°C. Colònies fresques (1-3 setmanes) donen millor resultat en una inoculació en medi líquid. Es pica una sola colònia de 2-3mm de diàmetre per fer l'inòcul (en el cas que les colònies fossin més petites, en posem varies). Segellem les plaques de nou i les emmagatzemem a 4°C fins a 2 mesos.

Si ens fixem no totes les colònies presenten la mateixa coloració: la soca AH109 té tendència a presentar una coloració vermellosa, malgrat que algunes colònies poden presentar la interrupció en un enzim de síntesi que fa que presentin coloració blanca.

Nota:

Per obtenir una major eficiència de transformació (tal i com es necessita en una llibreria *d'screening*) cal fer servir cèl·lules competents de menys d'una hora de la seva preparació. Si cal, les cèl·lules competents es poden emmagatzemar a temperatura ambient durant varies hores amb una reducció mínima de la competència.

Preparació de cèl·lules competents:

1. Inocular una colònia en un Eppendorf 1.5ml que tingui 0.5ml de YPD, i vortejar vigorosament. Llavors es transfereix la suspensió cel·lular a un cultiu de 25ml de YPD. Es deixa o/n a 30°C en agitació.
2. S'afegeixen 25ml més de YPD (el volum total de medi és 50ml), i es deixa o/n a 30°C en agitació.
3. Agafem un Erlenmeyer autoclavat i hi afegim 200 ml de YPD estèril. Hi afegim 10ml del pre-cultiu i mirem la **OD₆₀₀**. Un cop està entre 0.2-0.3, podem continuar. Si no és el cas, afegim més pre-cultiu i ho mirem de nou.
4. Incubem a 30°C durant 4-5 hores en agitació (230-270 rpm) fins que la OD₆₀₀ sigui **0.5 ± 0.1**.³
5. Posem el cultiu en dos Falcon de 50ml, i ho centrifuguem a 1000xg (2.5 rpm en aquesta centrífuga) durant 5 minuts a temperatura ambient (20-21°C).
6. Descartem el sobrenedant i resuspenem un dels tubs amb 25 ml d'aigua estèril. Ho agitem i ho transferim a l'altre Falcon. Remenem un altre cop. Afegim 25ml d'aigua estèril al Falcon buit, remenem de nou i ho transferim a l'altre Falcon. Ara tenim només un sol tub amb 50ml.
7. Centrifuguem a 1000 x g durant 5 minuts a temperatura ambient. Podem aprofitar l'altre Falcon per equilibrar la centrífuga.
8. Decantem el sobrenedant, fem un short spin i amb una piteta traiem les possibles restes de medi. Deixem el Falcon cap per avall perquè s'assequi, anant amb cura per no perdre el *pellet* de llevat.
9. Mentrestant, preparem 1xTE/LiAc.

³ Comencem mirant la OD a partir de la tercera hora, i llavors cada mitja hora. Sempre caldrà agafar la mostra en campana i sota flama; les cubetes són les de plastic del stock comú. Normalment solen ser unes 5 hores.

10. Resuspenem el *pellet* en 1ml (o 1.5ml, depenent de la quantitat de cèl·lules que necessitarem) amb 1x TE/LiAc.⁴ Es resuspen amb pipeta i suaument (de vegades és complicat de resuspendre).

Transformació de cèl·lules competents (tots els passos en campana):

1. Es prepara la solució PEG/LiAc (600µl per cada combinació ⁵)
2. S'afegeix a cada tub⁶ rotulat amb el número de la combinació els següents reactius i es barreja:
 - a. 0.1 µg del constructe DNA-BD (és millor preparar 10 µl d'una solució 0.1µg /µl, i llavors només agafem 1µl).
 - b. 0.1 µg del constructe DNA-AD⁷
 - c. 0.1 mg de *herring testes carrier* DNA (DNA de salmó)⁸
3. Afegim 100 µl de cèl·lules competents de llevat i barregem bé vortejant a baixa velocitat.
4. Afegim 600 µl de la solució estèril PEG/LiAc i vortegem a alta velocitat (~2000).
5. Incubem a 30°C durant 30 minuts en agitació (200 rpm); i engeguem el termoblock a 42°C.
6. Afegim 70 µl de DMSO. Barregem bé per inversió (NO vortegem).
7. Fem un xoc tèrmic a 42°C amb el termoblock durant 15 minuts.
8. Posem les cèl·lules en gel durant 1-2 minuts.
9. Centrifuguem a temperatura ambient durant 10 segons a màxima velocitat.
10. Traiem el sobrenedant amb la pipeta.
11. Resuspenem les cèl·lules en 500 µl de TE1x amb pipeta i amb molta cura⁹.
12. Plaquegem 100 i 200 µl en plaques SD-LT. D'aquesta manera ens assegurem que les úniques colònies que ens creixeran en el medi seran aquelles que tinguin els dos plasmidis transformats. Les emboliquem amb paper de plàstic i les deixem boca avall a l'estufa de 30°C de dos a cinc dies, controlant el creixement.

Repicat de plaques i comprovació de la interacció:

Quan tinguem varies colònies blanques que hagin crescut al medi SD-LT, procedirem a fer el repicat i comprovar quines d'aquestes també tenen la interacció entre les dues proteïnes que estem provant, de manera que seran capaces de créixer en un medi SD-AHLT.

1. En campana i amb flama, agafem una placa SD-AHLT i al seu costat hi posem una SD-LT.
2. Agafem una punta de pipeta estèril (o escuradents autoclavats) i piquem un colònia, fem una marca a la placa SD-AHLT i després, sense canviar ni tornar a picar la placa inicial, fem una marca a la placa SD-LT que hi ha al costat just a la mateixa posició que acabem de marcar. D'aquesta manera ens assegurem que quan no hi ha creixement a la primera placa però sí a la segona, la manca d'interacció és la responsable del no creixement, i no pas el fet que no hàgim picat bé la colònia inicial.
3. Emboliquem les plaques amb plàstic i les posem a l'estufa 2-5 dies.
4. Quan tinguem les colònies representatives, podem utilitzar dos mètodes de presentació de resultats:

⁴ Per **1.5ml 1x TE/LiAc**: 150 ul TE 10x, 150 ul LiAc 10x, 1200ul aigua

⁵ Per **10ml PEG/LiAc**: 8 ml 50%PEG (concentració final del 40%) + 1ml 10xTE (concentració final 1x) + 1ml 10xLiAc (concentració final 1x).

⁶ S'utilitzen Eppendorf estèrils de 1.5ml.

⁷ Per cotransformacions simultànies, es recomana utilitzar una raó molar 2:1 (DNA-BD:AD) per tenir una òptima eficiència.

⁸ Equival a 10µl de l'stock 10 mg/ml.

⁹ 10 ml **TE1x**: 1ml TE10x + 9 ml aigua

- a. Estria en placa: Seguim la mateixa metodologia que anteriorment, però fem que la colònia adopti forma de triangle estenent el cultiu al llarg de la placa amb una nansa de sembra.
- b. Dilucions: Es tracta de picar una colònia des del medi SD-LT i posar-la a créixer en 3ml de medi líquid SD-LT o/n al shaker de 28°C. L'endemà es llegeix la OD₆₀₀ de cada combinació de plasmidis i es relativitza en un volum final de 1ml de SD-LT per tal que sigui 1 en totes. A partir d'aquests tubs es fan dilucions seriades i se'n sembra 2,5 µl en un medi selectiu SD-AHLT i en un medi de creixement SD-LT. Es deixen 2-3 dies a l'estufa a 28°C i es mira les interaccions de nou, podent veure el nombre i el tamany de les colònies.

Solucions emprades:

- **YPD** líquid i sòlid: Per un volum d'1L farem servir 20g de peptona Difco, 10g d'extracte de llevat, 20g d'agar Difco (només per plaques), 20g de glucosa¹⁰ (és a dir, a una concentració final del 2%) i fins a 1L amb aigua. Ajustem el pH a 5.8 amb HCl, hi afegim l'agar i autoclavem a 121°C durant 15'. Refredem el medi fins a uns 55°C i fem les plaques (~25ml per placa). Les plaques es poden emmagatzemar a 4°C, i ens aniran bé per reestriar i refrescar les colònies cada dues o tres setmanes.
- **Tampó TE 10x**: 0,1M de Tris-HCl, 10 mM EDTA, ajustem el pH a 7.5 i autoclavem.
- **LiAc 1M**: Sigma #L-6883. Preparem 100ml 1M, ajustem el pH a 7.5 i autoclavem.
- **PEG 50%**: MW= 3350, Sigma #P-3640. Per prepara 200ml, agafem 100gr de PEG3350 i afegim aigua fins a 200ml. Autoclavem.
- **SD** (*Synthetic Dropout*) líquid i sòlid: Per un volum d'1L farem servir 6,7g de base nitrogenada de llevat sense aminoàcids (Sigma Y0626), 20g d'agar Difco (M7, només per medi sòlid), 20g de glucosa i fins a 900ml d'aigua. Ajustem el pH a 5.8 amb NaOH i autoclavem a 121°C durant 15'. Refredem a 55°C aproximadament i hi afegim 100ml de la solució *dropout* 10x. Ho emmagatzemem en dues ampolles de 500ml a 4°C fins que les hàgim d'utilitzar.
- Soca reporter de llevat AH109
- DNA plasmídic en solució
- *Herring testes carrier DNA*. Per un ús òptim, bullir el DNA durant 20 minuts i ràpidament refredar en gel per utilitzar a la transformació. Alternativament, ho podem posar al termoblock 5-10 minuts a 95°C, i després en gel.
- Solució PEG/LiAc estèril (preparar immediatament abans de fer server a partir d'stocks 10x); 1x TE/LiAc estèril (es prepara abans de fer server a partir d'stocks 10x)
- 100% DMSO

2.3. MÈTODES DE PLANTES

2.3.1. Esterilització de llavors

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

¹⁰ La glucosa és sensible a altes temperatures i enfosqueix el medi, però no hi ha problema en posar-la abans d'autoclavar.

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 emprades:

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

2.3.2. Sembra de llavors

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

a) 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 *A. tumefaciens*, 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'*A. tumefaciens*, escampar-les per tota la placa i deixar-les assecar sota campana amb les plaques obertes.

b) 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 1,7 llavors per cm² (aproximadament 100 llavors per placa de diàmetre 9 cm).

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.

c) 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 (p.e. tractaments hormonal). 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 (si és per extracció de RNA) o sembrar-les una a una (si és per tractaments hormonal i/o d'ombra simulada). Segellar les plaques tenint en compte que no s'assequin del tot (si cal hi afegim 2-3 ml 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 fosc a 4°C entre 3 i 5 dies. 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. Per sembrar-les, les agafem amb un escuradents mullat per un extrem i donat que s'hi enganxen, les deixem a la terra dels testos.

2.3.3. Obtenció de plantes transgèniques

2.3.3.1. Transformació de plantes d'*Arabidopsis*

Plantes d'*Arabidopsis* de l'ecotip silvestre Col-0 es van transformar per infiltració floral 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 Silwet L-77 al cultiu d'*A. tumefaciens*.
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, impedit 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'*A. tumefaciens* 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'*A. tumefaciens*, 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.3.** s'esquemmatitzen les diferents generacions de plantes transformants, així com la seva selecció mitjançant l'ús d'antibiòtics.

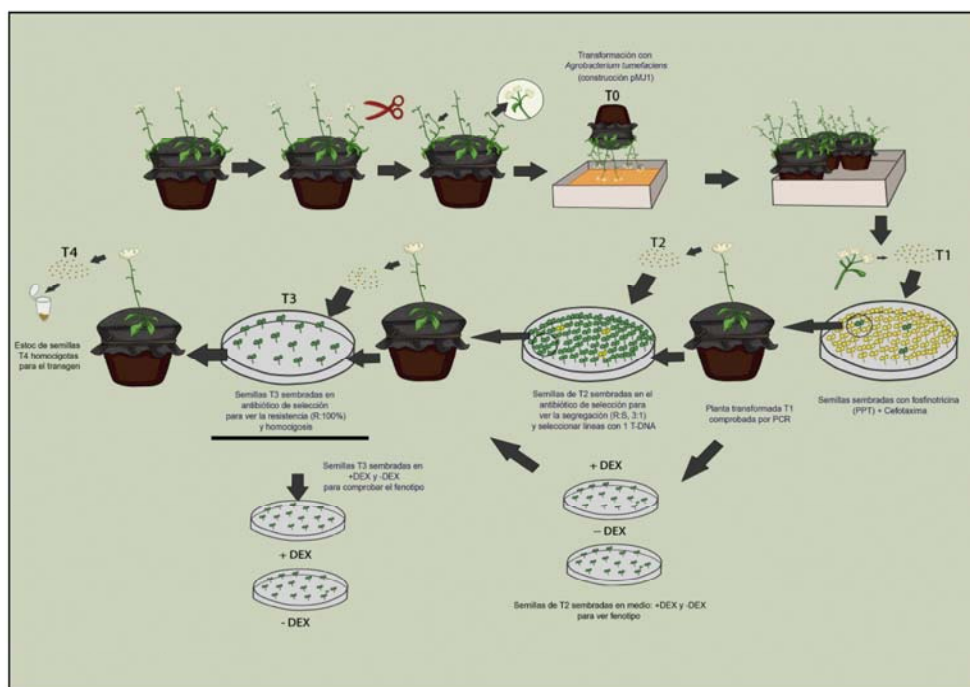


Figura M.3 Esquema de la transformació de plantes d'*Arabidopsis* i selecció de les diferents generacions de transformants. (màster de MJ Molina).

2.3.3.2. 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 rebi 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 dóna lloc a la generació F2, i successivament, l'autofecundació d'individus F2 a la generació F3.

2.3.4. Anàlisi molecular de les plantes mutants

2.3.4.1. 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). En funció del nombre de mostres a procesar s'han seguit dues estratègies, les quals es descriuen a continuació.

a) Baix nombre de mostres ($n \leq 12$)

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 μ L 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 (400 μ L) amb 400 μ L d'isopropanol.
7. Incubar a RT durant 2 min.
8. Centrifugar 5 min. a 13000 rpm.
9. Descartar el sobrenedant.
10. Rentar el sediment amb 700 μ L d'etanol 70%.
11. Centrifugar 5 min. a 13000 rpm.
12. Descartar el sobrenedant.
13. Resuspndre el sediment en 100 μ L d'aigua destil·lada. Guardar a -20°C .

b) Alt nombre de mostres ($n \geq 12$)

1. Agafem les dues gradetes on posar els tubs del *tissue-lyser*.
2. Preparam els tubs rotulats i els posem en gel. Posem dues boletes de vidre per tub (amb les pinces).
3. Tallem les fulles i les posem als tubs corresponents.
4. Agafem una lletera i hi posem una mica de nitrogen líquid, $\frac{3}{4}$ aprox.
5. Una caixa de porexpan, hi posem les gradetes dins (hi caben les dues gradetes).
6. Anem al tissue-lyser. Posem nitrogen líquid a la caixa de porexpan, hi posem les gradetes, després les mostres i finalment aboquem de nou nitrogen.
7. Engeguem el tissue-lyser (darrere té ON/OFF). Posem les gradetes i durant 1'30" fem un *shake* a 30mseg. Ho treiem, posem al porexpan només la gradeta, hi aboquem una mica més nitrogen líquid, canviem la orientació de la tapa i fem de nou un altre *shake*. Quan apretem les claus ens assegurem que el *seguro* quedi ben tancat abans de fer el *shake* i que no estigui posat quan estem apretant.
8. Al treure no tornem a posar nitrogen, portem la gradeta en gel al lab, i hi afegim els 400 μ L de buffer d'extracció. Fem un vòrtex, i si veiem que el teixit encara està congelat –es veu

- una mena de precipitat-, el posem al *termoblock* un moment. A partir d'aquí ja procedim a temperatura ambient.
9. Centrifuguem a 13000rpm durant 5-10', i el sobrenedant el passem o bé pipetejant o per decantació en tubs nous (hem de tenir en compte que tindrem les boletes als tubs!).
 10. Afegim 400µl d'isopropanol. RT 2'.
 11. (Pausa)
 12. Centrifuguem a 13000rpm durant 5-10'. Descartem sobrenedant (el pellet és el DNA).
 13. Afegim 500µl d'EtOH 70%.
 14. (Pausa)
 15. Vòrtex i centrifugació a 13000rpm durant 2'. Descartem el sobrenedant (important que no quedi etanol!).
 16. (Pausa)
 17. Afegim 50µl de TE. Ho guardem a 4°C.

Solucions emprades:

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

2.3.4.2. 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. La reacció de PCR utilitza com a motlle 5 µL de DNA procedent de l'extracció ràpida de DNA genòmic (apartat 2.3.4.1) i una parella d'encebadors adequada.

2.3.5. Tractaments i assajos en planta

Les plàntules destinades als tractament de llum o hormonal 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 *coolwhite* (80 µmol/m²s⁻¹ de radiació fotosintèticament activa). Per als tractaments realitzats en foscor, les plaques s'han mantingut a la foscor dins d'aquesta cambra.

2.3.5.1. 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 (StellarNet 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 (*figura M.4(a)*).

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. 5 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 2.3.5.3; *figura M.4(b)*).

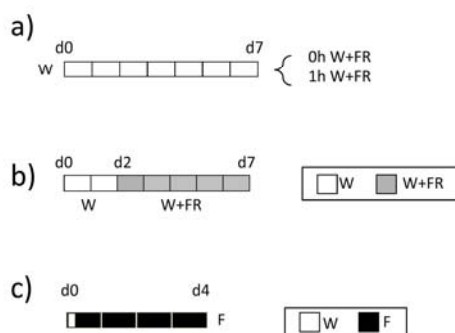


Figura M.4 Esquema dels diferents tractaments de llum als que s'han sotmès plàntules *d'Arabidopsis*. (a) Tractament d'ombra simulada per les anàlisis del fenotip molecular (RNA). (b) Tractament d'ombra simulada per les anàlisis de fenotip fisiològic. (c) Tractaments de foscor per als estudis de fenotip fisiològic.

2.3.5.2. Tractaments de foscor

Tractaments de foscor per als estudis de fenotip fisiològic

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 30' de durada. A continuació les plaques es van transferir a la foscor durant Xh, després de les quals es van prendre imatges per analitzar el seu fenotip. L'esquema del tractament es mostra a la *figura M.4(c)*.

2.3.5.3. 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 dues vegades l'error estàndard de les mitjanes.

2.3.6. 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'un determinat agent, aquest és afegit al medi abans de plaquejar-lo.
- B) De curta durada. Es realitzen col·locant les plàntules creixudes 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 productes utilitzats en aquest treball:

Agent	Descripció
GA3	Àcid gibberèlic (GA)
EBL	Epibrassinòlide. Anàleg sintètic dels BRs
2,4-D	Àcid 2,4 diclorofenòxicàtic. Auxina sintètica
PIC	Picloram. Auxina sintètica.
CHX	Cicloheximida. Inhibidor de la síntesi proteica
DEX	Dexametasona. Corticosteroide químic.

Taula M.10. Reguladors de creixement i altres productes utilitzats en aquest treball.

2.3.7. 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 (1ml) 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 fan 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 emprades:

- **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% (v/v), ferricianida i ferrocianida en concentració variable, X-Gluc 0.5 mg/mL.

Nota:

- 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.

2.3.8. Localització subcel·lular

Per a l'estudi de la localització subcel·lular d'ATHB4 es van bombardejar cèl·lules de ceba mitjançant una pistola gènica.

Procediment:

Preparació de microprojectils

Tot el procediment es duu a terme en campana de flux laminar.

1. Rentar **60mg** de partícules (or, 1µm diàmetre) amb 1ml d'etanol absolut (HPLC)¹¹.
2. Agitar amb el vòrtex múltiple a velocitat màxima durant 10'.
3. Centrifugar 1' a 10.000rpm. eliminar el sobrenedant.
4. Rentar amb 1ml de glicerol estèril 50%. Vòrtex a màxima velocitat 30".
5. Centrifugar 1' a 10.000rpm. Eliminar el sobrenedant.
6. Repetir el rentat amb glicerol dues vegades més; en campana.
7. Aliquotar en Eppendorf 1.5ml un volum de 40µl, que serà el que farem servir pels trets de biolística. Ho emmagatzemem a -20°C, com a màxim 2 mesos.

Preparació de les plaques amb ceba

Tallem la ceba en quarts. Traiem la part central més petita fins que ens quedi una capa on puguem tallar amb un bisturí un quadrat de 1.5x1.5cm aproximadament. Retirem amb unes pinces la capa fina de ceba, i la dipositem sobre el medi al centre de la placa amb medi MS1. Una altra opció és posar-ne dues de petites, perquè després va millor per fer el muntatge per microscopia.

Precipitació del DNA (protocol de Klein et al., 1998 modificat)

Agafem eppendorf de 1.5ml i els numerem amb les diferents combinacions que bombardejarem.

1. Afegir seqüencialment i agitar al vòrtex múltiple 5' després de cada pas.
 - a. 40 µl de partícules d'or prèviament vortejades a velocitat màxima 5'.
 - b. 10 µl de DNA (4 µgr de cada plàsmid i la resta d'aigua)
 - c. 100 µl d'aigua estèril
 - d. 150 µl de Ca₂Cl/espermidina (125 µl Ca₂Cl 2.5M + 25µl espermidina 0.1M¹²)
2. Sedimentar les partícules em gel em posició vertical 15' Aprofitem aquesta incubació en gel per baixar les pinces i dues plaques de petri no estèrils buides. S'aprofita per agafar la caixa de biolística i es prepara el material (tants de cada com trets a fer, tenint en compte que per cada combinació caldrà dos trets).
3. Spin 30" i descartem el sobrenedant amb la pipeta.
4. Afegim 500 µl d'etanol absolut (HPLC) i vortegem 20".
5. Repetir els passos 2-4. A la segona incubació en gel, aprofitem per baixar les plaques amb la ceba. Es traurà el material de l'esterilització i es posarà a assecar de la manera indicada més avall (apartat "preparació PDS1000/He").
6. Resuspendre em 15 µl d'etanol absolut (HPLC), i ho posem en gel.

¹¹ Pot ser etanol 100% normal. El mateix és aplicable a cada pas del protocol on s'esmenti etanol HPLC.

¹² Es prepara un mix abans de fer servir cada vegada, en funció dels trets que s'hagin de fer.

7. Sonicar 10", vortejar 10" dues vegades consecutives amb cada mostra.
8. Mantenim les mostres em gel fins el moment del bombardeig.

Nota: La puresa del DNA ha de ser alta, aprox. la relació Abs 260/280 ha de ser de 1.8-2.0.

Preparació PDS1000/He

1. Encendre la cabina de flux laminar. Esterilitzar l'aparell i les peces amb etanol absolut (amb paper amarant). En plaques de Petri esterilitzar les membranes portadores i les reixetes de parada amb etanol 100%; esterilitzar els discs de ruptura (900 psi¹³ per ceba) en isopropanol¹⁴. Ho deixem assecar (és important que tot estigui ben sec per la seva correcta utilització) sobre paper a la campana, disposant-ho en el mateix ordre que hi ha a la figura adjacent. D'aquesta manera, ens assegurem que a cada tret hem utilitzat tot el que requerim (podem rotular cada fila amb el número de combinació a la que correspon). Els suports d'acer de la membrana ja es troben a la campana de flux laminar, però ens hem d'assegurar que ja estan en etanol (*figura M.5 (a)*).
2. Encendre la bomba de buit. Obrir la clau (2) en sentit antihorari. Obrir la clau de la bombona d'heli (1) en sentit antihorari. El marcador de "A" donarà la pressió, normalment per sobre de 1700 –ens indica si queda o no Heli a l'ampolla-.
3. Tanquem la clau 2 en sentit horari fins que marqui una pressió 200 psi per sobre de la pressió de resistència dels discs de ruptura (en el nostre cas : 1100 psi) (*figura M.5 (b)*).
4. Ajustem correctament la membrana portadora sobre el suport amb l'ajuda de les pinces i una peça de plàstic vermella, encaixant-la en la guia que hi ha a la base dels suports.

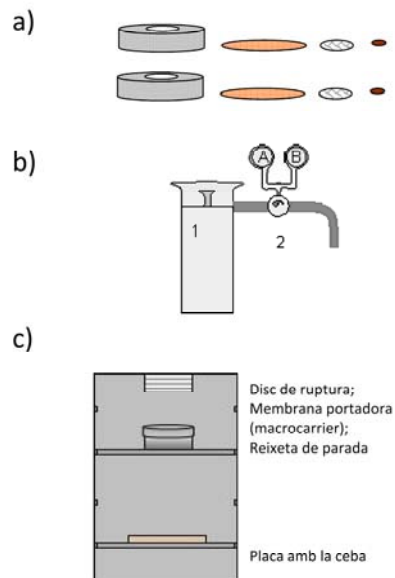


Figura M.5 Esquema del material a utilitzar en experiments de biolística (a) Material necessari per realitzar dos trets amb una construcció: suport, membrana portadora del DNA, dreixeta de parada i disc de ruptura. (b) Esquema de la bombona d'heli. Utilitzada., on 1 i 2 són claus d'obertura/tancament i A i B són manòmetres. (c) Estructura de muntatge per fer els trets de biolística.

¹³ PSI: de l'anglès Pound per Square Inch

¹⁴ De vegades, quan els discs estan vells no es trenquen bé; la manera de solucionar-ho és no esterilitzant-los amb isopropanol. Tenint en compte que es tracta d'una expressió transitòria la contaminació és mínima (ja que no hi ha temps perquè es pugui contaminar).

Bombardeig amb PDS-1000 He System

1. Dipositem 8 µl de mostra (remenant bé amb la pipeta) sobre la membrana portadora sense tocar-la (en excés), i ho deixem assecar uns 5'. Ens assegurem de tenir cada fila rotulada sobre paper amb el nom de la combinació que hi carreguem.
2. Posar la reixeta de parada en el suport disparador, i a continuació el suport amb la membrana portadora, de manera que la superfície amb la mostra miri cap a ala reixeta. La distància entre ambdues ha de ser de 11mm (ja ve donada per l'aparell). Ho tapem amb la tapa de rosca.
3. Posem el disc de ruptura en el seu suport i l'enrosquem en l'extrem del cilindre de gas fins que quedi fix. Ho acabem d'ajustar amb una palanqueta.
4. Coloquem el suport disparador al nivell més proper a la base (*figura M.5 (c)*).
5. Posar la placa MS1 amb la mostra vegetal al nivell 4, i tancar la càmera. Ens hem d'assegurar d'haver tret la tapa de la placa de Petri.
6. Accionar la bomba de buit fins que el manòmetre marqui 27 (0.1 atm), llavors el fixem.
7. Accionar el botó de tret (*fire*) fins a sentir la roptura del disc (hem d'aguantar el botó tota l'estona), i immediatament el deixem de pressionar i treiem el buit posant-lo a la posició mitja. Llavors treiem la mostra.
8. Treiem el suport de ruptura i comprovem que el disc s'hagi trencat. Fem el mateix muntatge per la segona rèplica del tret, i girem la placa 90°.
9. Quan acabem amb totes les plaques, les incubem a fosques (embolicades amb paper de plata) a 22°C de 18 a 48h abans de mirar-les al microscopi (deixar-le a càmeres amb la temperatura controlada).
10. Per tancar l'aparell: Tanquem la clau (1), fem el buit i disparem el gas, veurem com baixen les dues pressions. Tanquem l'aparell i després tanquem la bomba.

Solucions emprades:

- **Etanol 100%**: Aliquotem 10 ml en un Falcon, el segellem amb parafilm i és d'aquí on treurem l'etanol que necessitem.
- **Glicerol 50%**: 125 ml de glicerol i 125 ml d'aigua, ho autoclavem.
- **Espermidina 0.1M** "free base": FR26; FW:145.2 gr/mol. S'aliqota en 14 µl en eppendorf de 1.5ml. Prèviament, es posa 5' a 65°C, i s'hi afegeixen 986 µl d'aigua estèril. És recomanable fer-ne servir de fresca cada vegada. Ja hi ha un stock alíquotat de 14µl al congelador de -20°C.
- **CaCl₂ 2.5M**: S42; FW: 147.02 gr/mol. Es preparen 25ml de solució, s'autoclava i s'aliquoten 1ml en eppendorf d'1.5; són 9.1888 gr en 25ml.

Transcorregudes 16-20h des del bombardeig, les cèl·lules de ceba 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 mostres independents per a cada construcció.

2.3.9. Estudis morfològics mitjançant microscòpia electrònica de rastreig (MES, de l'anglès microscope electronic scanning)

L'observació de la morfologia mitjançant MES es va realitzar en mostres de llavors i de plàntules silvestres i mutants, de dia 0, 1, 3, 5, 7 i 10 cultivades en Wc. Tot el procés de

preparació i observació de les mostres es realitzà en col·laboració amb el Servei de Microscòpia Electrònica i Confocal, situat al INRA de Versailles (París), i el grup del Dr. J.C. Palauqui.

2.3.10. Tinció mPS-PI

La tinció pseudo-Schiff de iodur de propidi modificada (de l'anglès, *modified pseudo-Schiff propidium iodide*, mPS-PI) s'utilitza per visualitzar la planta sencera mitjançant microscopia confocal. Aquesta tècnica produeix imatges d'alta resolució que permeten la reconstrucció tridimensional de l'organització cel·lular dels òrgans de la planta. Un fet destacable és que es pot arribar a estudiar amb una precisió d'una sola cèl·lula.

Procediment:

1. La plàntula sencera es fixa en solució de fixació a 4°C durant almenys 12h. El teixit es pot emmagatzemar en aquesta solució fins a 1 mes.
2. Es transfereix el teixit a etanol 80% i s'incuba a 80°C d'1 a 5 min, depèn del tipus de teixit (per exemple, 1 min. per les fulles i 5 per les flors).
3. Es transfereix el teixit de nou a la solució de fixació i s'hi incuba durant 1h.
4. Es renta el teixit amb aigua i s'incuba amb una solució 1% d'àcid periòdic a temperatura ambient durant 40' .
5. El teixit es renta de nou amb aigua i s'incuba en reactiu de Schiff amb iodur de propidi d'1 a 2h o fins que les plantes estiguin visiblement tenyides.
6. Les mostres es transfereixen a portaobjectes i es cobreixen amb una solució d'hidrat de cloral. Es mantenen tota la nit a temperatura ambient en un ambient tancat per evitar la dessecació.
7. Seguidament es treu l'hidrat de cloral i es munta en solució de Hoyer. Es cobreix amb un cubreobjectes i es deixa un mínim de 3 dies per permetre que la preparació romgui ben muntada.

Solucions emprades:

Solució de fixació: 50% (v/v) metanol i 10% (v/v) àcid acètic

Reactiu de Schiff amb iodur de propidi: 100mM de metabisulfit de sodi i 0,15N HCl, iodur de propidi fins a una concentració final de 100 µg/ml que s'afegeix fresc.

Solució de hidrat de cloral: 4g d'hidrat de cloral, 1ml de glicerol i 2 ml d'aigua.

Solució Hoyer: 30 gr de goma aràbiga, 200 gr d'hidrat de cloral, 20 ml glicerol i 50 ml d'aigua.

Anàlisi estadístic

Les dades foren analitzades utilitzant el test-T i el p-valor utilitzant l'Excel, els quals es representen a les gràfiques per mitjà d'asteriscos. Les anàlisis de varianza de dues vies es van dur a terme amb el programa GraphPad Prism versió 5.00 per Windows (www.graphpad.com).

Per utilitzar el programa, exportem les taules de l'excel a través d'un copiar-enganxar transposable. Ens hem de fixar en el nombre màxim de dades que tenim, ja que l'haurem d'introduir. Obrim GraphPad Prism, i seleccionem Tipus de gràfic/Dues variables agrupades/Anàlisi de variància de dues vies. Al final del menú, hem d'especificar el nombre de dades màxim per situació experimental que tenim (*figura M.6 (a)*). A les files hi escrivim un dels

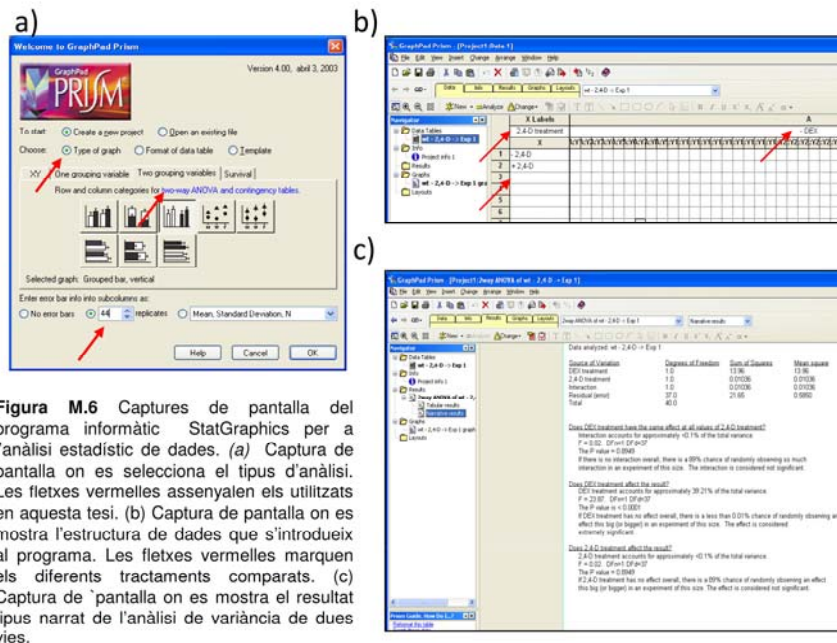


Figura M.6 Captures de pantalla del programa informàtic StatGraphics per a l'anàlisi estadístic de dades. (a) Captura de pantalla on es selecciona el tipus d'anàlisi. Les fletxes vermelles assenyalen els utilitzats en aquesta tesi. (b) Captura de pantalla on es mostra l'estructura de dades que s'introdueix al programa. Les fletxes vermelles marquen els diferents tractaments comparats. (c) Captura de pantalla on es mostra el resultat tipus narrat de l'anàlisi de variància de dues vies.

tractament, per exemple hormonal (presència/absència d'hormona), i a les columnes una altra variable, per exemple la presència/absència de DEX (figura M.6 (b)). Per realitzar l'anàlisi, anem a Inserir/Nou anàlisi/Anàlisi estadístic/Anàlisi de variància de dues vies/crear, i seleccionem el nom de les variables. Per visualitzar els resultats cliquem a "resultats narrats" (figura M.6 (c)). Les dades obtingudes al llarg de la tesi es resumeixen a les taules a continuació, on G.D. Graus de Llibertat; S.Q. Suma de Quadrats; E.H. Elongació de l'Hipocòtil; E.C. Elongació dels Cotilèdons.

Taules M.11. Anàlisi de variància de dues vies del capítol 2

Figura R2.1(b)	E.H. de BRI1 vs Col-0					E.C. de BRI1 vs Col-0				
	Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F
Interacció	1	2,498	2,498	11,38	0,0011	1	0,01398	0,01398	0,0262	0,8719
Genotip	1	7,884	7,884	35,9	P<0.0001	1	0,141	0,141	0,264	0,609
Tractament W+FR	1	254,7	254,7	1160	P<0.0001	1	1,868	1,868	3,497	0,0658
Residu (error)	84	18,45	0,2196			68	36,32	0,5341		

Figura R2.2(a,b)	E.H. de <i>bes1-Dbc7</i> vs Col-0					E.H. de <i>bzr1-D</i> vs Col-0				
	Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F
Interacció	1	12,36	12,36	51,34	< 0,0001	1	3,783	3,783	11,59	0,001
Genotip	1	6,47	6,47	26,87	< 0.0001	1	2,735	2,735	8,38	0,0047
Tractament W+FR	1	338,3	338,3	1405	< 0.0001	1	452	452	1385	< 0.0001
Residu (error)	137	32,98	0,2408			99	32,3	0,3263		

Figura R2.3(a)	E.H. de <i>bes1-Dbc7</i> vs Col-0					E.H. de <i>bzr1-D</i> vs Col-0				
	Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F
Interacció	2	16,11	8,053	18	<0,0001	2	17,04	8,521	22,78	<0,0001
Genotip	2	373,8	186,9	417,7	<0.0001	2	209,6	104,8	280,2	<0.0001
EBL	1	5,672	5,672	12,68	0,0005	1	17,9	17,9	47,87	<0.0001
Residu (error)	205	91,73	0,4474			120	44,88	0,374		

Figura R2.3(b) E.H. de <i>bes1-Dbc7</i> vs Col-0						E.H. de <i>bzr1-D</i> vs Col-0				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	2	171,9	85,93	501,2	P<0.0001	2	28,44	14,22	55,29	P<0.0001
Genotip	2	355,2	177,6	1036	P<0.0001	2	76,8	38,4	149,3	P<0.0001
PIC	1	126	126	734,9	P<0.0001	1	4,338	4,338	16,87	P<0.0001
Residu (error)	136	23,32	0,1714			125	32,14	0,2572		

Figura R2.3(c) E.H. de <i>bes1-Dbc7</i> vs Col-0						E.H. de <i>bzr1-D</i> vs Col-0				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	2	8,515	4,257	42,38	<0.0001	2	0,09645	0,04822	0,7059	0,4958
Genotip	2	98,9	49,45	492,2	<0.0001	2	30,72	15,36	224,8	<0.0001
GA3	1	35,25	35,25	350,9	<0.0001	1	8,372E-06	0,0000	0,0001	0,9912
Residu (error)	186	18,69	0,1005			113	7,72	0,0683		

Figura R2.4(c) E.H. de <i>bas1sob7</i> vs Col-0					
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	3,54	3,54	14,54	0,0002
Genotip	1	0,04062	0,04062	0,1668	0,6837
Tractament W+FR	1	156,7	156,7	643,6	P<0.0001
Residu (error)	116	28,24	0,2434		

Taules M.12 Anàlisi de variances de dues vies del capítol 3

Figura R3.1(b) E.H. de ATHB4:GR vs Col-0 (-DEX)						E.H. de ATHB4:GR vs Col-0 (+DEX)				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	1,119	1,119	2,99	0,0861	1	9,867	9,867	45,35	P<0.0001
Genotip	1	0,05222	0,05222	0,1395	0,7094	1	22,55	22,55	103,7	P<0.0001
2,4-D	1	110,4	110,4	294,9	P<0.0001	1	121,1	121,1	556,7	P<0.0001
Residu (error)	132	49,42	0,3744			136	29,59	0,2176		

Figura R3.1(b) E.H. de ATHB4:GR vs Col-0 (-DEX)						E.H. de ATHB4:GR vs Col-0 (+DEX)				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	2	1,354	0,677	2,115	0,124	2	30,12	15,06	91,89	P<0.0001
Genotip	1	3,227	3,227	10,08	0,0018	1	6,808	6,808	41,54	P<0.0001
EBL	2	56,4	28,2	88,09	P<0.0001	2	28,16	14,08	85,91	P<0.0001
Residu (error)	162	51,86	0,3201			170	27,87	0,1639		

Figura R3.1(b) E.H. de ATHB4:GR vs Col-0 (-DEX)						E.H. de ATHB4:GR vs Col-0 (+DEX)				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	0,3862	0,3862	0,5636	0,454	1	5,525	5,525	10,36	0,0016
Genotip	1	0,7957	0,7957	1,161	0,283	1	27,69	27,69	51,89	P<0.0001
GA3	1	163,4	163,4	238,4	P<0.0001	1	147,9	147,9	277,2	P<0.0001
Residu (error)	145	99,36	0,6852			146	77,9	0,5335		

Figura R3.12(a,b) E.H. de <i>athb4hat3</i> vs Col-0 (a)						E.H. de <i>athb4hat3</i> vs Col-0 (b)				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	14,48	14,48	101,3	P<0.0001	1	28,86	28,86	112,9	P<0.0001
Genotip	1	17,15	17,15	120	P<0.0001	1	33,37	33,37	130,6	P<0.0001
Tractament W+FR	1	15,68	15,68	109,7	P<0.0001	1	64,71	64,7100	253,1	P<0.0001
Residu (error)	78	11,15	0,1429			116	29,65	0,2556		

Figura R3.13(b) E.H. de <i>athb4hat3</i> vs Col-0 (d1)						E.H. de <i>athb4hat3</i> vs Col-0 (d2)				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	58,7	58,7	293,2	P<0.0001	1	83,25	83,25	536,1	P<0.0001
Genotip	1	68,38	68,38	341,5	P<0.0001	1	94,12	94,12	606	P<0.0001
Tractament W+FR	1	96,34	96,34	481,1	P<0.0001	1	120,4	120,4	775,4	P<0.0001
Residu (error)	60	12,02	0,2003			57	8,852	0,1553		

Figura R3.13(b) E.H. de <i>athb4hat3</i> vs Col-0 (d3)						E.H. de <i>athb4hat3</i> vs Col-0 (d5)				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	48,73	48,73	134,8	P<0.0001	1	20,88	20,88	251,8	P<0.0001
Genotip	1	57,4	57,4	158,8	P<0.0001	1	26,97	26,97	325,3	P<0.0001
Tractament W+FR	1	105,9	105,9	293,1	P<0.0001	1	44,54	44,5400	537	P<0.0001
Residu (error)	58	20,97	0,3615			65	5,39	0,0829		

Figura R3.14(a,b) E.H. de <i>athb4hat3</i> vs Col-0 (a)						E.H. de <i>athb4hat3</i> vs Col-0 (b)				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	1,614	1,614	12,65	0,0015	2	1,928	0,9638	12,24	< 0,0001
Genotip	1	1,588	1,588	12,45	0,0016	2	32,63	16,32	207,2	< 0,0001
Hormona (EBL/GA3)	1	6,887	6,887	53,98	P<0.0001	1	12,94	12,94	164,3	< 0,0001
Residu (error)	26	3,317	0,1276			92	7,246	0,07876		

Figura R3.14(c) E.H. de <i>athb4hat3</i> vs Col-0					
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	2	1,46	0,7298	13,19	<0,0001
Genotip	1	2,574	2,574	46,51	<0,0001
PIC	2	16,92	8,459	152,8	<0,0001
Residu (error)	76	4,206	0,05535		

Figura R3.15 E.H. de <i>athb4hat3</i> vs Col-0					
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	15,9	15,9	7,069	0,0116
Genotip	1	4,829	4,829	2,147	0,1515
Medi de creixement	1	149,5	149,5	66,44	P<0.0001
Residu (error)	36	80,97	2,249		

Figura R3.21(a) E.H. de <i>phb-13</i> vs Col-0					
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	0,09854	0,09854	0,5604	0,4564
Genotip	1	0,8158	0,8158	4,639	0,0345
Tractament W+FR	1	88,8	88,8	505	P<0.0001
Residu (error)	75	13,19	0,1758		

Figura R3.23(b) E.H. de <i>athb4hat3</i> vs Col-0						E.H. de <i>athb4hat3phyA</i> vs Col-0				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	24,62	24,62	40,57	P<0.0001	1	52,91	52,91	109,2	P<0.0001
Genotip	1	33,25	33,25	54,8	P<0.0001	1	62,65	62,65	129,2	P<0.0001
Tractament W+FR	1	47	47	77,46	P<0.0001	1	175,9	175,9	362,9	P<0.0001
Residu (error)	62	37,62	0,6067			100	48,47	0,4847		

Figura R3.23(b) E.H. de <i>athb4hat3phyA</i> vs <i>phyA</i>						E.H. de <i>athb4hat3phyA</i> vs <i>athb4hat3</i>				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	43,48	43,48	108,3	P<0.0001	1	0,5858	0,5858	1,998	0,1633
Genotip	1	56,46	56,46	140,6	P<0.0001	1	1,429	1,429	4,872	0,0316
Tractament W+FR	1	154,2	154,2	383,9	P<0.0001	1	6,934	6,934	23,65	P<0.0001
Residu (error)	94	37,75	0,4016			54	15,83	0,2932		

Figura R3.24(a) E.H. de <i>athb4hat3</i> vs Col-0						E.H. de <i>bes1-Dbc7</i> vs Col-0				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	38,73	38,73	82,42	P<0.0001	1	9,368	9,368	23,34	P<0.0001
Genotip	1	49,4	49,4	105,1	P<0.0001	1	8,364	8,364	20,84	P<0.0001
Tractament W+FR	1	104,1	104,1	221,5	P<0.0001	1	276,3	276,3	688,5	P<0.0001
Residu (error)	65	30,55	0,47			88	35,32	0,4014		

Figura R3.24(a) E.H. de <i>athb4hat3bes1-Dbc7</i> vs Col-0						E.H. de <i>athb4hat3bes1-Dbc7</i> vs <i>bes1-Dbc7</i>				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	26,21	26,21	50,17	P<0.0001	1	9,818	9,818	52,04	P<0.0001
Genotip	1	25,68	25,68	49,16	P<0.0001	1	10,2	10,2	54,06	P<0.0001
Tractament W+FR	1	62,12	62,12	118,9	P<0.0001	1	35,13	35,13	186,2	P<0.0001
Residu (error)	54	28,2	0,5223			58	10,94	0,1887		

Figura R3.24(a) E.H. <i>athb4hat3bes1-Dbc7</i> vs <i>athb4hat3</i>					
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	0,0321	0,0321	0,1821	0,6722
Genotip	1	0,2101	0,2101	1,192	0,2825
Tractament W+FR	1	7,483	7,483	42,44	P<0.0001
Residu (error)	35	6,171	0,1763		

Figura R3.24(c) E.H. de <i>athb4bzt1-D</i> vs Col-0						E.H. de <i>hat3bzt1-D</i> vs Col-0				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	7,526	7,526	21,32	P<0.0001	1	10,86	10,86	39,44	P<0.0001
Genotip	1	0,713	0,713	2,019	0,1588	1	1,051	1,051	3,818	0,0535
Tractament W+FR	1	623,6	623,6	1766	P<0.0001	1	729,4	729,4	2650	P<0.0001
Residu (error)	89	31,42	0,3531			99	27,25	0,2753		

Taules M.13 Anàlisi de variances de dues vies del capítol 4

Figura R4.1(a, b) E.H. de <i>HAT1</i> vs Col-0						E.H. de <i>HAT2</i> vs Col-0				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	18,12	18,12	50,13	P<0.0001	1	2,434	2,434	5,048	0,0269
Genotip	1	0,05482	0,05482	0,1517	0,6979	1	13,76	13,76	28,54	P<0.0001
Tractament W+FR	1	171,7	171,7	475	P<0.0001	1	436,2	436,2	904,7	P<0.0001
Residu (error)	84	30,36	0,3615			98	47,25	0,4821		

Figura R4.1(c) E.H. de <i>HAT2:GR</i> vs Col-0 (-DEX)						E.H. de <i>HAT2:GR</i> vs Col-0 (+DEX)				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	1,58	1,58	14,35	0,0003	1	15,42	15,42	285	P<0.0001
Genotip	1	2,502	2,502	22,73	P<0.0001	1	26,96	26,96	498,4	P<0.0001
Tractament W+FR	1	73,95	73,95	671,9	P<0.0001	1	18,33	18,33	338,8	P<0.0001
Residu (error)	81	8,915	0,1101			81	4,382	0,0541		

Figura R4.2(a) E.H. de <i>HAT2:GR</i> vs Col-0 (-DEX)						E.H. de <i>HAT2:GR</i> vs Col-0 (+DEX)				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	2	2,543	1,271	9,452	0,0001	2	2,208	1,104	8,768	0,0003
Genotip	1	0,09235	0,09235	0,6866	0,4086	1	0,3546	0,3546	2,817	0,0958
EBL	2	273,5	136,8	1017	P<0.0001	2	233	116,5	925,2	P<0.0001
Residu (error)	162	21,79	0,1345			126	15,86	0,1259		

Figura R4.2(b) E.H. de <i>HAT2:GR</i> vs Col-0 (-DEX)						E.H. de <i>HAT2:GR</i> vs Col-0 (+DEX)				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	2	0,2684	0,1342	1,35	0,2625	2	1,043	0,5213	5,787	0,0039
Genotip	1	0,2188	0,2188	2,202	0,14	1	4,617	4,617	51,25	P<0.0001
PIC	2	103,7	51,86	521,7	P<0.0001	2	76,3	38,1500	423,5	P<0.0001
Residu (error)	146	14,51	0,0994			138	12,43	0,0901		

Figura R4.3(b) E.H. de <i>hat1hat2</i> vs Col-0 MS1						E.H. de <i>hat1hat2</i> vs Col-0 GM-0.5x				
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	0,5566	0,5566	1,156	0,2847	1	4,824	4,824	22,08	P<0.0001
Genotip	1	3,041	3,041	6,314	0,0134	1	10,28	10,28	47,08	P<0.0001
Tractament W+FR	1	202,6	202,6	420,6	P<0.0001	1	513,7	513,7	2352	P<0.0001
Residu (error)	110	52,98	0,4817			88	19,22	0,2184		

Figura R4.4		E.H. de <i>ATHB2</i> vs Col-0			
Font de la variació	G.L.	S.Q.	Mitjana	F	P valor
Interacció	1	11,15	11,15	26,03	P<0.0001
Genotip	1	20,59	20,59	48,08	P<0.0001
Tractament W+FR	1	278,1	278,1	649,5	P<0.0001
Residu (error)	91	38,96	0,4281		

3. Bioinformàtica

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

Pàgines web generals:

TAIR <http://www.arabidopsis.org/index.jsp>

T-DNA Express <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>

NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

JustBio <http://www.justbio.com/>

EMBL-EBI <http://www.ebi.ac.uk/>

Per l'anàlisi de seqüències de DNA i proteïnes:

BLAST <http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>

MultiAlign <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

Per imatges de microscòpia:

OSIRIX: <http://www.osirix-viewer.com/>, utilitzat en la reconstrucció tridimensional de les imatges obtingudes per microscòpia confocal.

Altres programes utilitzats:

Genevestigator: <https://www.genevestigator.com/gv/> (Hruz et al., 2008).

Vector NTI 10 (Invitrogen): per generar mapes dels plàsmids.

7

ANNEXOS

ATHB4, a regulator of shade avoidance, modulates hormone response in *Arabidopsis* seedlings

Céline Sorin^{1,†,§}, Mercè Salla-Martret^{1,§}, Jordi Bou-Torrent¹, Irma Roig-Villanova^{1,‡} and Jaime F Martínez-García^{1,2,*}

¹Center for Research in Agricultural Genomics (CRAG) CSIC-IRTA-UAB, c. Jordi Girona, 18-26, 08034-Barcelona, Spain, and

²Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Passeig Lluís Companys 23, 08010-Barcelona, Spain

Received 22 January 2009; revised 24 February 2009; accepted 4 March 2009; published online 9 April 2009.

[†]For correspondence (fax + 34 932 045 904; e-mail jmgmgm@cid.csic.es).

[‡]Current address, Institut des sciences du Végétal – CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France.

[§]Current address, UNIMI, I-20133 Milan, Italy.

[§]These authors contributed equally to this paper.

SUMMARY

Plants sense the presence of competing neighboring vegetation as a change in light quality: i.e. they sense the reduced ratio of red light to far-red light. The responses to shade are generally referred to as the shade avoidance syndrome (SAS), and involve various developmental changes intended to outgrow or outcompete the neighboring plants. Here, we analyze the function of *ATHB4*, a gene encoding a homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) class-II transcription factor from *Arabidopsis thaliana*, the expression of which is rapidly and directly upregulated after proximity perception by the phytochrome photoreceptors. *ATHB4* acts redundantly with other members of the HD-Zip class-II transcription factors. The expression of these genes is regulated by other members of the same class, forming a small transcriptional network of factors in which homeostasis is mutually controlled. Our results suggest that some members of this small gene subfamily can modulate SAS responses by controlling auxin, brassinosteroid and gibberellin molecular and/or physiological responsiveness. In particular, we propose *ATHB4* as a new shade signaling component that participates in integrating shade perception and hormone-mediated growth.

Keywords: shade avoidance syndrome, brassinosteroids, auxins, HD-Zip class II, *Arabidopsis*.

INTRODUCTION

As sessile and photosynthetic organisms, plants need to adapt their growth to their light environment. Plants can detect the presence of competing neighboring plants (i.e. proximity perception) by sensing their 'shade' as changes in light quality, i.e. a reduced ratio of red light to far-red light (R:FR). Plant responses to shade, generally referred to as the shade avoidance syndrome (SAS), are characterized by enhanced elongation, reduced leaf expansion, decreased branching and, ultimately, flowering induction. This phenomenon can be detrimental in agriculture, because it downregulates defense responses and induces the reallocation of resources into elongation growth at the expense of harvestable organs, thereby lowering the crop yield (Smith and Whitelam, 1997; Quail, 2002; Izaguirre *et al.*, 2006).

In a signaling pathway, the stimulus is perceived by a receptor, and is transduced by various intermediate molecules to achieve the final responses. In the SAS, the receptors are the phytochrome photoreceptors, which initi-

ate the signaling cascade when they perceive a reduced R:FR (i.e. plant shade or proximity). Phytochromes exist in two photoconvertible forms: an inactive R-absorbing Pr form and an active FR-absorbing Pfr form. In *Arabidopsis thaliana*, the phytochromes are encoded by a small gene family of five members (*PHYA–PHYE*). *PHYB* was shown to play a major role in SAS, whereas *PHYD* and *PHYE* make smaller contributions (Smith and Whitelam, 1997; Devlin *et al.*, 1998, 1999). In etiolated seedlings, phytochromes are cytosolic, inactive proteins. Following light exposure, they rapidly activate and migrate to the nucleus, where they orchestrate a complex transcriptional cascade through their interaction with different PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs) (Martinez-Garcia *et al.*, 2000a; Quail, 2002). In light-grown plants, both the Pr and the Pfr forms are present in the nucleus in a light-dependent balance: (i) under a high R:FR ratio, the photo-equilibrium is displaced towards the active Pfr forms, and SAS is suppressed; (ii) under a low R:FR ratio,

the photo-equilibrium is displaced towards the inactive Pr forms, and probably induce the SAS by affecting the interaction with PIFs (Smith and Whitelam, 1997; Lorrain *et al.*, 2008).

The phytochrome perception of plant proximity initiates rapid and reversible changes in the expression of the *PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED (PAR)* genes (Devlin *et al.*, 2003; Salter *et al.*, 2003; Sessa *et al.*, 2005; Roig-Villanova *et al.*, 2006, 2007; Carabelli *et al.*, 2007), which are proposed to be instrumental for implementing the morphological, metabolic and physiological SAS responses. Indeed, genetic approaches demonstrated that some of these *PAR* genes have a role in regulating different aspects of SAS responses. A positive role for *ATHB2*, encoding a transcription factor of the homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) class-II subfamily, has been proposed based mostly on overexpression studies (Steindler *et al.*, 1999). Of the other members of the HD-Zip class-II subfamily (Ariel *et al.*, 2007; Ciabelli *et al.*, 2008), two members are *PAR* genes: *ATHB4* and *HAT2* (Roig-Villanova *et al.*, 2006). *HAT2* was shown to be a repressor of gene expression (as shown for *ATHB2* and *HAT1*), and to play a role in auxin control of development (Ohgishi *et al.*, 2001; Sawa *et al.*, 2002; Ciabelli *et al.*, 2008), whereas virtually nothing is known of *ATHB4* function. Other *PAR* genes include *LONG HYPOCOTYL IN FAR RED1 (HFR1)*, *PAR1*, *PAR2* and *PIF3-LIKE1 (PIL1)*, all of which encode basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription regulators with a negative role in SAS, mainly deduced from the elongation response of mutant hypocotyls to shade (Sessa *et al.*, 2005; Roig-Villanova *et al.*, 2006, 2007). Transcriptomic analyses have also identified several other SAS-related genes (Devlin *et al.*, 2003), providing dozens of putative players in the SAS transduction pathway. Additional genetic analyses have identified *CONSTITUTIVE SHADE-AVOIDANCE1 (CSA1)* as a negative SAS regulator (Faigon-Soverna *et al.*, 2006), and *PIF4* and *PIF5* as positive players (Lorrain *et al.*, 2008) that participate in the regulation of the expression of a few analyzed *PAR* genes, such as *ATHB2*, *HFR1* and/or *PIL1*. The shade-induced transcriptional network is dynamic, and is affected by both endogenous (e.g., genotype and developmental stage) and exogenous (e.g. temperature and circadian time) factors, providing a molecular basis for the complexity of the reported SAS responses (Salter *et al.*, 2003; Franklin and Whitelam, 2007). These responses take place in the spatial context of a plant, involving the integration of local and distant signals to achieve a coordinated response among organs (Salisbury *et al.*, 2007; Bou-Torrent *et al.*, 2008).

The light-triggered transcriptional cascades intersect with those regulating cell division and expansion, such as the ones controlled by plant hormones (Nemhauser, 2008). Several lines of evidence support the involvement of various hormones in the SAS responses. Ethylene is involved in R:FR-induced stem and petiole elongation in tobacco (Pierik

et al., 2004). Gibberellins (GAs) were implicated in stem elongation in response to end-of-day FR treatments (Martinez-Garcia *et al.*, 2000b), whereas the expression of *GAI* and *GA20ox3* was rapidly modulated by shade (Devlin *et al.*, 2003). Brassinosteroids (BRs) were also implicated in SAS because the hypocotyl of Arabidopsis BR biosynthesis mutant *dwarf1-101* did not elongate in canopy shade (Luccioni *et al.*, 2002), and expression of the BR receptor *BRI1* was rapidly upregulated by a reduction of the R:FR ratio (Devlin *et al.*, 2003). The elongation response to a low R:FR ratio was shown to depend on auxin transport (Steindler *et al.*, 1999), and the expression of various auxin response genes and indole-3-acetic acid (IAA) levels changed rapidly after the perception of simulated shade (Devlin *et al.*, 2003; Tao *et al.*, 2008). Recently, it has been shown that the perception of simulated shade rapidly alters hormone sensitivity (Roig-Villanova *et al.*, 2007). Despite the abundant information implicating hormone action in the regulation of SAS responses, the precise molecular basis linking shade-initiated and hormone-modulated transcriptional networks is mostly unknown.

In this study we provide experimental evidence that *ATHB4*, a *PAR* gene shown to be a direct target of phytochrome action (Roig-Villanova *et al.*, 2006), regulates the responses of seedlings to both simulated shade and BR-mediated development. Our genetic and molecular analyses also indicate that *ATHB4* acts redundantly to other members of the HD-Zip class-II subfamily, and that their expression is interconnected to modulate SAS responses and hormone-mediated plant development.

RESULTS

Overexpression of *ATHB4* impacts seedling development and HD-Zip class-II gene expression

As an initial approach to study the function of *ATHB4*, transgenic lines constitutively overexpressing *ATHB4* ($P_{35S}::ATHB4$) were produced. The most obvious phenotypes of *ATHB4*-overexpressing seedlings grown under continuous white light (W) were long hypocotyls and narrow cotyledons (Figure S1). In the strongest lines, cotyledon longitudinal expansion was also reduced, and in older stages, the plants exhibited dwarf and infertile phenotypes (Figure S1; data not shown).

The difficulty of working with $P_{35S}::ATHB4$ plants led us to generate lines displaying inducible *ATHB4* nuclear activity by constitutively overexpressing the chimeric *ATHB4-GR* construct ($P_{35S}::ATHB4-GR$ lines). The GR domain of the glucocorticoid receptor that was fused to *ATHB4* is capable of retaining any protein to which it is attached in the cytoplasm. Upon addition of a glucocorticoid, such as dexamethasone (DEX), the fusion protein is free to translocate to the nucleus. Three independent $P_{35S}::ATHB4-GR$ homozygous lines with a single T-DNA insertion (based on

their hygromycin-resistant phenotype) were selected, and were shown to express the *ATHB4-GR* transgene, with lines 05 and 14 showing the highest levels of transgene expression (Figure 1a). In the absence of DEX, transgenic and wild-type seedlings were similar. By contrast, DEX treatment induced a phenotype similar to that observed in *P_{35S}:ATHB4* seedlings, i.e. longer hypocotyls and short, narrow cotyledons (Figure 1b,c). The root length and lateral root number was also reduced in the presence of DEX in transgenic seedlings, whereas it was unaffected in wild-type plants (Table S1). *P_{35S}:ATHB4-GR* lines 05 and 14 showed a similarly altered phenotype (compared with the wild type), whereas line 19 had a weaker phenotype (data not shown). A mild phenotype in the absence of DEX was observed in some experiments, an effect that was likely to be attributable to the production of truncated, constitutively active versions of the fusion protein (Sablowski and Meyerowitz, 1998). In these lines, however, DEX treatment enhanced the transgenic phenotype (Figure 1), suggesting that *ATHB4* is only fully active when localized to the nucleus.

Because overexpression of *ATHB2*, *HAT1* or *HAT2* was shown to repress the gene expression of several HD-Zip class-II members (Ohgishi *et al.*, 2001; Sawa *et al.*, 2002; Ciarelli *et al.*, 2008), we next aimed to determine whether increased *ATHB4* activity could also downregulate the expression of other members of this subfamily. As shown in Figure 2, the expression of *ATHB2*, *HAT1*, *HAT2*, *HAT3* and

HAT22 was only reduced in response to DEX application in the *P_{35S}:ATHB4-GR* lines. The downregulation of the analyzed *ATHB/HAT* genes was strongest in lines with the highest levels of *ATHB4-GR* overexpression (Figure 1a). Together, our results indicate that *ATHB4* functions as a repressor of HD-Zip class-II members.

Increased *ATHB4* activity alters responses to shade and hormones

To study whether *ATHB4* has a role as an SAS modulator, the response of transgenic *P_{35S}:ATHB4-GR* and wild-type seedlings to W + FR (i.e. simulated shade) was compared. As expected, wild-type seedlings responded to W + FR by increasing the hypocotyl and cotyledon length relative to growth under W (Roig-Villanova *et al.*, 2007). *P_{35S}:ATHB4-GR* seedlings grown in the absence of DEX responded similarly (Figure 3). By contrast, transgenic seedlings showed no elongation of hypocotyls or cotyledons in response to simulated shade when media was supplemented with DEX (Figure 3), suggesting that *ATHB4* acts as a regulator of these SAS traits.

We also observed that upregulated *ATHB4* activity increased cotyledon epinasty, particularly under W + FR, a phenotype never observed in wild-type or non-treated *P_{35S}:ATHB4-GR* seedlings (Figure S2). Because epinastic cotyledons are typically displayed by auxin-overproducing plants (Boerjan *et al.*, 1995), we next investigated whether

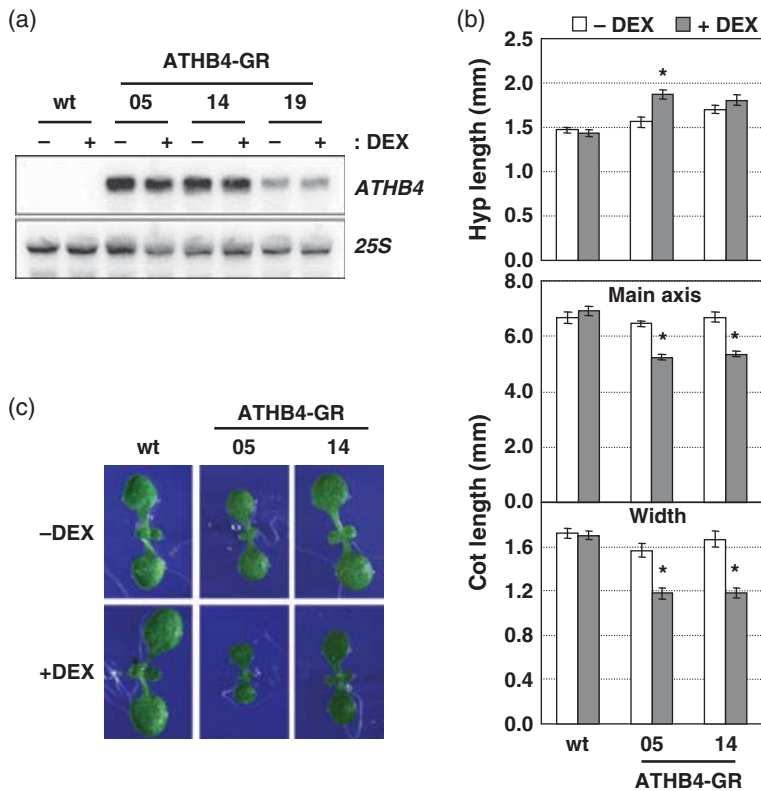


Figure 1. Phenotype of plants overexpressing *ATHB4-GR*.

(a) Molecular characterization of *ATHB4-GR*-overexpressing plants. The RNA extracted from 7-day-old (d7) W-grown seedlings of wild-type (wt) and three transgenic lines was used for the RNA blot analysis of *ATHB4-GR* expression levels. The 25S rRNA levels are shown as a loading control.

(b) Morphological phenotype of seedlings overexpressing *ATHB4-GR*. The 7-day-old W-grown wt and transgenic seedlings overexpressing *ATHB4-GR* (lines 05 and 14) were germinated and grown on medium either supplemented (+) or not (-) with 5 μM DEX. The lengths of hypocotyls (Hyp), and cotyledon (Cot) main axes and widths, were measured for each line and treatment. Columns represent the mean and bars represent the SE. Asterisks indicate significant differences (**P* < 0.01) relative to the corresponding -DEX controls.

(c) Representative phenotypes of wt and transgenic seedlings overexpressing *ATHB4-GR* (lines 05, 14), germinated and grown as indicated in (b).

Figure 2. Effect of ATHB4 activity on homeo-domain-leucine zipper (HD-Zip) class-II gene expression.

(a) Representative RNA blot analysis of *ATHB2*, *HAT1*, *HAT2*, *HAT3* and *HAT22* expression in wt and transgenic lines overexpressing ATHB4-GR. RNA was extracted from 7-day-old W-grown seedlings grown without (-) or with (+) 5 μM DEX for 24 h. The 25S rRNA levels are shown as a loading control.

(b) Normalized expression levels of the genes shown in (a). Data are presented as the ratio of +DEX to -DEX treated seedlings for each line. Values are means ± SD of two independent samples.

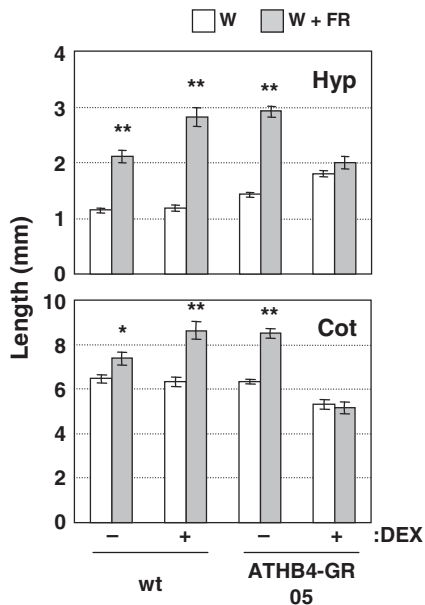
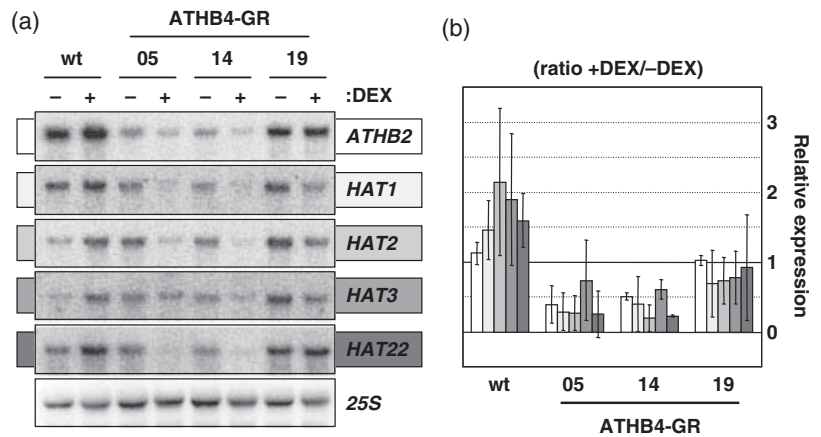


Figure 3. Morphological response of seedlings overexpressing *ATHB4-GR* to simulated shade.

Seedlings were germinated and grown on medium either supplemented (+) or not (-) with 5 μM DEX; wt and transgenic seedlings were grown for 2 days under white light (W), and then either kept in W (white bars) or transferred to white plus far-red light (W + FR) (gray bars) for five more days. The length of hypocotyls (Hyp) and cotyledons (Cot) was measured for each line and treatment. Columns represent the means, and bars represent the SEs. Asterisks indicate significant (**P* < 0.05 and ***P* < 0.01) differences relative to the corresponding W-grown controls.

auxin was involved in the phenotype displayed by seedlings with upregulated ATHB4 activity. Treatment of wild-type seedlings with the auxin transport inhibitor naphthylphthalamic acid (NPA) suppresses the shade response of the hypocotyl (Steindler *et al.*, 1999). In *P*_{35S}:ATHB4-GR seedlings treated with DEX, the addition of NPA suppressed cotyledon epinasty (Figure S2), suggesting that auxins mediate this aspect of ATHB4 activity to modulate development.

We next investigated whether auxins, BRs and GAs, hormones known to be involved in the control of SAS, were also involved in the hypocotyl phenotype displayed by *ATHB4-GR* overexpression lines (Figure 4a). In the absence of DEX, treatment of wild-type and *P*_{35S}:ATHB4-GR seedlings with 1 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D; a synthetic auxin) increased hypocotyl elongation, in agreement with previous data (Boerjan *et al.*, 1995). However, hypocotyls of DEX-treated *P*_{35S}:ATHB4-GR seedlings displayed a reduced response to the same quantity of 2,4-D. An opposite DEX-dependent response was observed upon treatment of *P*_{35S}:ATHB4-GR seedlings with 0.1 and 1 μM epibrassinolide (EBL). Treatment with this BR increased the hypocotyl elongation in both wild-type (Friedrichsen *et al.*, 2002) and transgenic seedlings, but in the presence of DEX, the hypocotyls of *P*_{35S}:ATHB4-GR seedlings displayed an exaggerated response to EBL (Figure 4a). Two-way ANOVA tests indicated an extremely significant interaction between the increased activity of ATHB4 and the application of 2,4-D (*P* = 0.001) or EBL (*P* < 0.0001) in the case of hypocotyl elongation (Table S2). In contrast to 2,4-D and EBL, treatments of wild-type and *P*_{35S}:ATHB4-GR seedlings with 10 μM of GA₃ stimulated hypocotyl elongation almost independently of the presence of DEX (Figure S3a, Table S3).

We also analyzed the hypocotyl response to treatments with these hormones when seedlings were growing under W + FR (Figure 4b). In the absence of DEX, treatment of wild-type and *P*_{35S}:ATHB4-GR seedlings with 1 μM 2,4-D or 0.1–1 μM EBL inhibited or had no effect on inducing hypocotyl elongation, in clear contrast with the known hypocotyl growth effect of these hormones under W. Hypocotyls of the DEX-treated *P*_{35S}:ATHB4-GR seedlings responded to 2,4-D and EBL by displaying either reduced or increased hypocotyl elongation, respectively (Figure 4b), as it was observed under W. A two-way ANOVA test confirmed the observed interactions between increased ATHB4 activity and 2,4-D and EBL application in the case of hypocotyl elongation (Table S2). Treatment of *P*_{35S}:ATHB4-GR seedlings with DEX

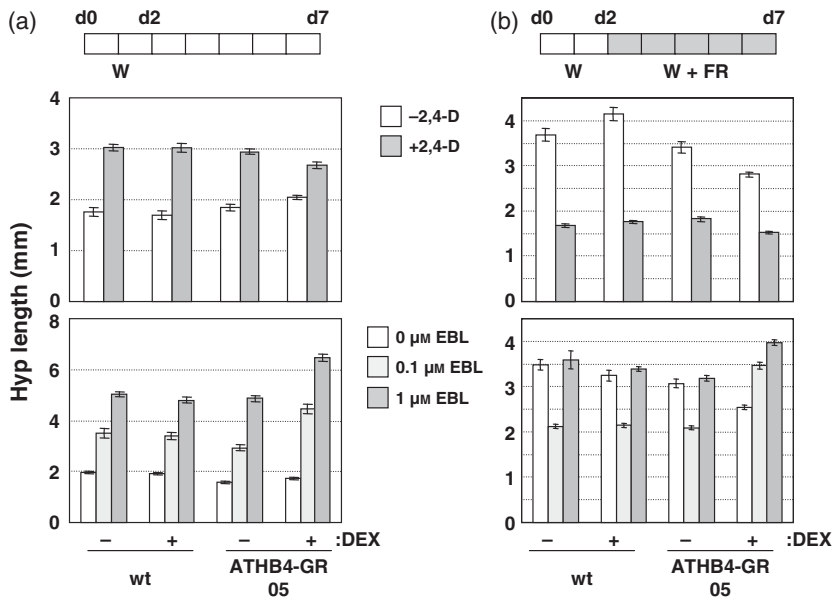


Figure 4. The hypocotyl elongation response of seedlings overexpressing *ATHB4-GR* to hormone application.

Seedlings were germinated and grown on medium either supplemented (+) or not (-) with 5 μM DEX, in the absence (white bars) or presence (gray bars) of 1 μM 2,4-D (upper panels) and 0.1–1 μM EBL (lower panels).

Seedlings were grown under W (a) or W + FR (b), as indicated in Figure 3. The hypocotyl (Hyp) length was measured for each line and treatment. Columns represent the mean and bars represent SEs.

also reduced the hypocotyl response to GA_3 , in contrast to the mild effect observed under W (Figure S3b, Table S3). Together, our results indicate that the increased activity of *ATHB4* specifically alters hypocotyl responsiveness to auxin, BRs and GAs under W and/or W + FR.

Increased *ATHB4* activity alters the expression of genes regulated by BRs, auxins and simulated shade

To more closely examine the molecular function of *ATHB4*, we next focused on how DEX treatment influenced the transcript levels of genes regulated by auxin or BRs in $P_{35S}::ATHB4-GR$ seedlings treated with or without 2,4-D or EBL. *SAUR15* and *SAUR68* were selected because their expression is upregulated by both auxins and BRs (Goda *et al.*, 2004; Nemhauser *et al.*, 2006). As shown in Figure 5a, the 2,4-D-mediated induction of *SAUR15* and *SAUR68* gene expression is attenuated by increased *ATHB4* activity, whereas the induction of *IAA1*, an auxin-responsive gene not regulated by EBL (Goda *et al.*, 2004), is unaffected. The expression of *HAT2*, another auxin-responsive gene not regulated by EBL (Goda *et al.*, 2004; Nemhauser *et al.*, 2006), is clearly affected by increased *ATHB4*, in agreement with previous results (Figure 2). The EBL-triggered induction of *SAUR15* and *SAUR68* gene expression is abolished by enhanced *ATHB4* activity, whereas the expression of *At5g45670*, a specific EBL-responsive gene (Nemhauser *et al.*, 2006), is virtually unaffected (Figure 5b). Together, our results suggest that *ATHB4* can efficiently downregulate the expression of subsets of auxin and/or BR-regulated genes, including *SAUR15*, *SAUR68* and *HAT2*, but not *IAA1* or *At5g45670*.

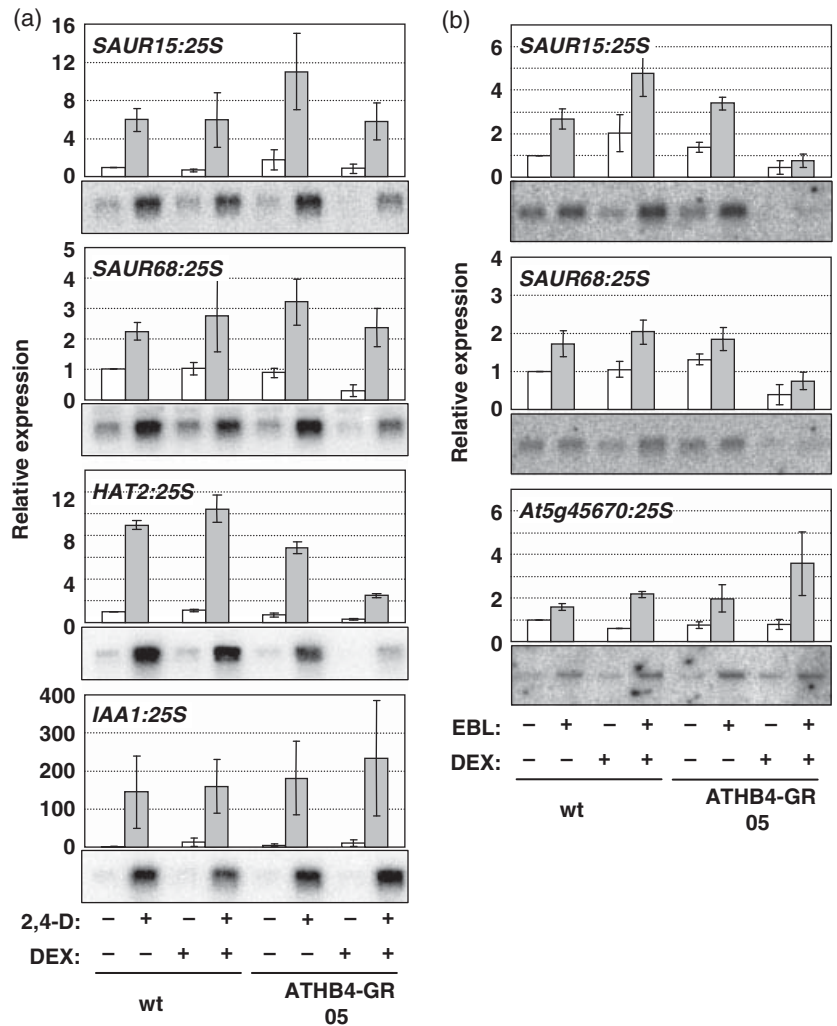
The expression of *IAA1*, *HAT2*, *SAUR15* and *SAUR68* is also rapidly induced by simulated shade (Devlin *et al.*, 2003;

Roig-Villanova *et al.*, 2007), but increased *ATHB4* activity in DEX-treated $P_{35S}::ATHB4-GR$ lines clearly reduced the expression of these genes (Figure 6). This result suggests that the repressor effect of *ATHB4* on the expression of these genes is meaningful for the regulation of SAS responses.

Double mutants in *ATHB/HAT* genes display altered responsiveness to simulated shade and hormones

To investigate *ATHB4* function, two SALK lines named *athb4-1* and *athb4-2* were identified as having T-DNA insertions in the transcribed region of the *ATHB4* locus (Figure S4). Both lines were classified as null mutants based on RNA blot analyses (Figure S4). However, no obvious phenotype was observed in homozygous plants (Figure S5a), which suggests that *ATHB4* is functionally redundant. Published phylogenetic analyses of the whole HD-Zip class-II subfamily pointed to *HAT3* and *ATHB4* as paralogs (Ariel *et al.*, 2007; Ciarbelli *et al.*, 2008). Interestingly, *HAT3* expression is also rapidly induced by simulated shade (Figure S4b). A SALK line with a T-DNA insertion interrupting the HD domain of *HAT3*, named *hat3-1*, was also identified (Figure S4). According to RNA blot analyses, we classified this mutant as being null. Since no distinctive phenotype was observed in these mutant plants either (Figure S5a), double *athb4-1 hat3-1* (*athb4 hat3* hereafter) mutant plants were obtained. Under W, *athb4 hat3* seedlings showed thin and lancet-shaped cotyledons, rather than the oval-shaped cotyledons typical of wild-type seedlings (Figure 7a). Most interestingly, the hypocotyl elongation response to W + FR was completely abolished in double mutant seedlings (Figure 7a), indicating that *ATHB4* and *HAT3* act together as regulators of this SAS trait. Simulated shade treatment caused highly epinastic cotyledons in *athb4 hat3* seedlings

Figure 5. Effect of *ATHB4* activity and hormone treatment on auxin- and brassinosteroid (BR)-responsive gene expression. Wild-type (wt) and transgenic seedlings over-expressing *ATHB4-GR* were germinated and W-grown for 7 days on medium either supplemented (+) or not (-) with 5 μ M DEX. On day 7, seedlings were treated with either 50 μ M 2,4-D (a) or 1 μ M EBL (b) for four additional hours. (a) RNA blot analysis of *SAUR15*, *SAUR68*, *HAT2* and *IAA1* expression. (b) RNA blot analysis of *SAUR15*, *SAUR68* and *At5g45670* expression. Normalized expression levels of the analyzed genes, shown on top of each RNA blot, are presented relative to the expression of untreated (-DEX and -2,4-D or -EBL) wt seedlings. Values are means \pm SD of two (*HAT2*) or three (*SAUR15*, *SAUR68*, *IAA1* and *At5g45670*) independent samples.



(Figure 7a), thereby confirming that mutant seedlings are still capable of responding to simulated shade, in a manner similar to that observed with DEX-treated P_{35S}:*ATHB4-GR* seedlings (Figure S2).

The reduced hypocotyl response to simulated shade displayed by both the *athb4 hat3* mutant and *ATHB4*-overexpressing seedlings (Figures 3 and 7a) might reflect the complex control of hypocotyl length by *ATHB/HAT* factors, in which having too much or too little activity of these factors results in suboptimal elongation. To test this possibility, we analyzed the response to simulated shade in plants deficient in *HAT1*, and its paralog *HAT2* (Ariel *et al.*, 2007; Ciarelli *et al.*, 2008), the expression of which is also rapidly induced by simulated shade (Figure S4b) (Devlin *et al.*, 2003). T-DNA mutants from the SALK collection were identified for both genes, and northern analyses showed that these alleles, named *hat1-1* and *hat2-1*, are likely to be nulls (Figure S4). As described above for other HD-Zip class-II genes, no distinctive phenotype was observed in the single mutants (Figure S5b), and consequently we

obtained the double *hat1-1 hat2-1* (*hat1 hat2* hereafter) mutant plants. In contrast with the *athb4 hat3* double mutant seedlings, *hat1 hat2* seedlings were indistinguishable from wild-type plants under W. However, *hat1 hat2* hypocotyls responded less to W + FR than the hypocotyls of wild-type seedlings (Figure 7b). The two-way ANOVA tests of this hypocotyl response only indicated a significant interaction ($P < 0.0005$) between reduced *HAT1* and *HAT2* expression and simulated shade treatments when seedlings were grown in the absence of sucrose in the medium (GM-) (Table S4). These results support our postulate that a reduction in *ATHB/HAT* activity results in suboptimal growth and elongation.

To further define the role of *ATHB4* in hormone action, we focused on BR responsiveness by analyzing the hypocotyl response of *athb4 hat3* seedlings to 1 μ M EBL. Hypocotyls of *athb4 hat3* seedlings displayed a reduced response to EBL (Figure 7c), indicating that the loss of activity of *ATHB4* (and *HAT3*) significantly reduces responsiveness to BRs ($P < 0.01$), in agreement with the enhanced sensitivity

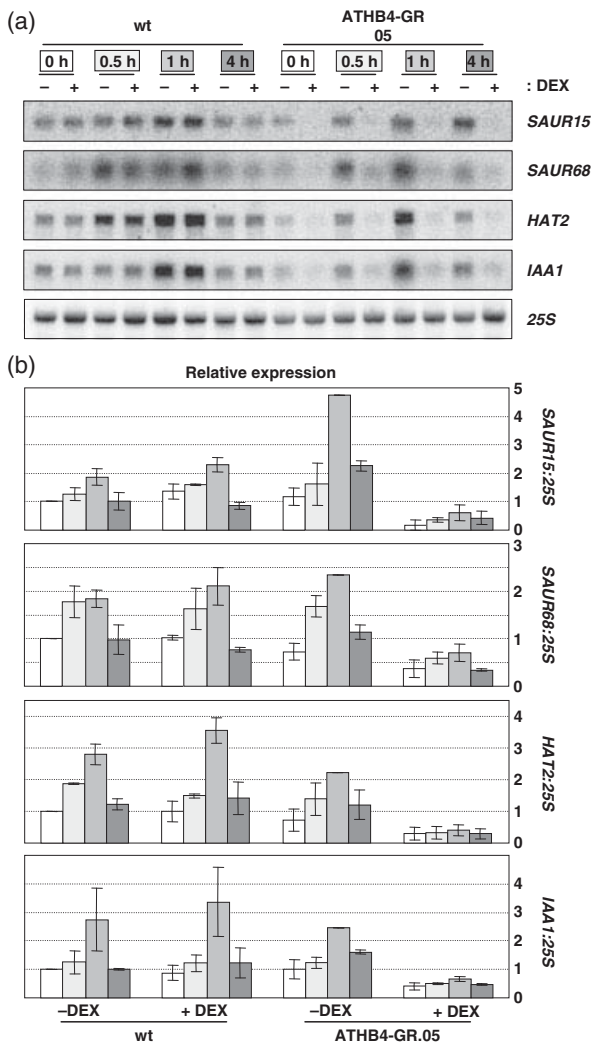


Figure 6. Effect of ATHB4 activity and simulated shade on the expression of auxin-responsive genes. (a) White light (W)-grown 7-day-old wt and transgenic seedlings overexpressing *ATHB4-GR*, germinated and grown as described in Figure 5, were treated with W + FR for the indicated times, and were used for the RNA blot analysis of *SAUR15*, *SAUR68*, *HAT2* and *IAA1* expression. *25S* rRNA levels are shown as a loading control. (b) Normalized expression levels of the genes analyzed in (a) are presented relative to the expression of wt seedlings not treated with DEX at 0 h. Values are the means \pm SD of two independent samples.

observed in plants with increased ATHB4 activity (Figure 4). Together, these observations suggest that ATHB4 has a role as a positive regulator of physiological BR-mediated responses.

Double *athb4 hat3* mutant seedlings displayed altered expression of genes regulated by auxins, BRs and simulated shade

The molecular characterization of *athb4 hat3* mutant seedlings was complemented by analyzing the expression of

SAUR15, *SAUR68*, *HAT2* and/or *IAA1* in response to 2,4-D, EBL or simulated shade. The 2,4-D-mediated induction of *SAUR15*, *HAT2* and *IAA1* expression was affected in the *athb4 hat3* mutant: the expression of *IAA1* was decreased, whereas that of *SAUR15* and *HAT2* was increased. By contrast, the induction of *SAUR68* was unaffected (Figure 8a). The EBL-mediated induction of *SAUR15*, but not that of *SAUR68*, was again increased in the *athb4 hat3* mutant (Figure 8b). When analyzing the effect of simulated shade, the induction of all four genes was affected in the *athb4 hat3* mutant to different degrees relative to wild-type seedlings, with the expression of *IAA1* being the only one that was reduced in the mutant (Figure 9). When pooling together the expression data for each of these genes in the control treatments, *SAUR68* was significantly reduced in *athb4 hat3* mutant seedlings (Figure S6). Together with the expression data from *P_{35S}:ATHB4-GR* lines (Figures 5 and 6), these results support a role for ATHB4 and HAT3 acting as repressors of hormone- and/or shade-mediated *SAUR15* and *HAT2* gene expression. A complex role for these two factors in the regulation of *SAUR68* and *IAA1* under different conditions is also suggested by these observations.

DISCUSSION

The perception of plant proximity by phytochrome photoreceptors results in the rapid upregulation of dozens of *PAR* genes, which is likely to be instrumental in the SAS responses. Among the *PAR* genes with a demonstrated function in the SAS, several encode proteins of the bHLH family of transcription factors, such as *HFR1*, *PIL1*, *PAR1* and *PAR2* (Salter *et al.*, 2003; Sessa *et al.*, 2005; Roig-Villanova *et al.*, 2006, 2007). Another group of genes in which expression is rapidly regulated by simulated shade is the HD-Zip class-II subfamily. Among them, the functions of *ATHB2*, *HAT1* and *HAT2* have been studied, although their characterization has mostly been based on phenotypic analyses of transgenic plants grown under W. In this work we analyzed the role of another HD-Zip class-II member, *ATHB4*, a *PAR* gene the expression of which has been shown to be under direct control of phytochrome action (Roig-Villanova *et al.*, 2006).

***ATHB4* is a novel regulatory component of the SAS transcriptional network**

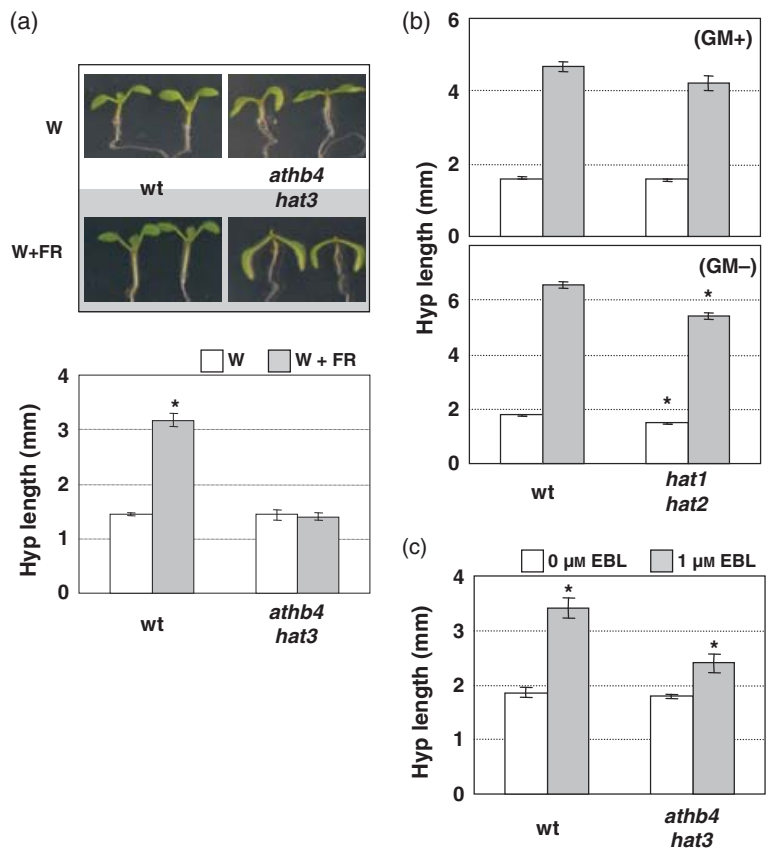
ATHB4 overexpression alters plant development, affecting hypocotyl and cotyledon expansion (Figures 1, 3, S1 and S2), root elongation and lateral root development (Table S1). In addition, *ATHB4* is a negative regulator of the expression of other members of the HD-Zip class-II subfamily of transcription factors (Figure 2). These phenotypes are similar to those described for lines constitutively overexpressing *ATHB2* (Steindler *et al.*, 1999; Ohgishi *et al.*, 2001), *HAT1* (Ciarelli *et al.*, 2008) or *HAT2* (Sawa *et al.*, 2002). Despite these similarities, increased *ATHB4* activity only slightly affected hypocotyl elongation, and had virtually no effect on

Figure 7. The hypocotyl elongation response of *athb4 hat3* and *hat1 hat2* mutant seedlings.

(a) Hypocotyl (Hyp) response of wt and *athb4 hat3* seedlings to simulated shade. The phenotypes of two representative 7-day-old wt and *athb4 hat3* seedlings are shown at the top.

(b) Hyp response of wt and *hat1 hat2* seedlings to simulated shade when grown in the presence (GM+) or absence (GM-) of 1% sucrose.

(c) Hyp response of *athb4 hat3* seedlings to the application of EBL. Seedlings were germinated and grown on medium either supplemented or not with 1 μ M EBL. In (b), seedlings were grown as indicated in Figure 3. In (a) and (c), wt and mutant seedlings were grown for 3 days under W and were then differentially kept under W (white bars) or W plus far-red light (W + FR; gray bars) (a), or under W in the absence (white bars) or presence (gray bars) of EBL (c) for four more days. The Hyp length was measured for each line and treatment. Columns represent the mean and bars represent SE. Asterisks indicate significant differences ($*P < 0.01$) relative to the corresponding W-grown seedlings (a), wt controls grown under the same conditions (b) or untreated seedlings (c).



the root response to auxin (data not shown). These results suggest that although those HD-Zip class-II genes might have overlapping functions, as suggested by the absence of phenotypes in the single mutants, and their similar expression response to simulated shade, they are not completely redundant. This is similar to what was observed for members of the HD-Zip class-III subfamily (Prigge *et al.*, 2005).

As mentioned above, several lines of evidence suggest that some HD-Zip class-II transcription factors might be SAS signaling components, although such a role has not yet been conclusively demonstrated, mostly because of (i) the lack of well characterized loss-of-function lines, and/or (ii) the absence of studies under simulated shade conditions of the generated overexpression lines. Our experiments have shown that the hypocotyls of seedlings with increased ATHB4 activity (Figures 1, 3 and S1), as well as those of ATHB4 loss-of-function seedlings (Figure 7a), do not respond to shade, supporting a role for ATHB4 as a regulator of this SAS response. The fact that both gain and loss of ATHB4 function result in the absence of hypocotyl responses to shade indicates that the role of ATHB4 in controlling the SAS responses is complex, and involves the participation of additional factors. Indeed, the expression of HD-Zip class-II genes is mutually regulated, i.e. the high activity of one of these factors downregulates the expression of the others (Figure 2) (Ohgishi *et al.*, 2001; Sawa *et al.*, 2002), forming a

negative regulatory loop that might contribute to the aforementioned complexity. It is therefore possible that the phenotypes observed in plants with upregulated ATHB4 activity might result, in part, from the downregulation of other members of the HD-Zip class-II subfamily, such as HAT1 and HAT2. The attenuated hypocotyl response to W + FR displayed by the *hat1 hat2* seedlings (Figure 7b) favors our postulate that the control of SAS is complex and involves the participation of several members of the HD-Zip class-II subfamily, making the study of the contributions of the individual factors difficult. The morphological alterations of the *athb4 hat3* seedling cotyledons might also eventually affect SAS responses by indirect mechanisms, a non-exclusive possibility that we are currently investigating.

ATHB4 acts as a regulator of BR-mediated responses

Various hormones have been shown to play a role in SAS responses (Vandenbussche *et al.*, 2005). In particular, the addition of the auxin transport inhibitor NPA abolishes the elongation of the hypocotyl (Steindler *et al.*, 1999), and the longitudinal expansion of the cotyledons in response to simulated shade (Figure S2). The application of NPA can also suppress the epinasty displayed by the cotyledons of seedlings with increased ATHB4 activity (Figure S2), suggesting the involvement of auxins in the phenotype resulting from ATHB4 upregulation. The expression of a subset of

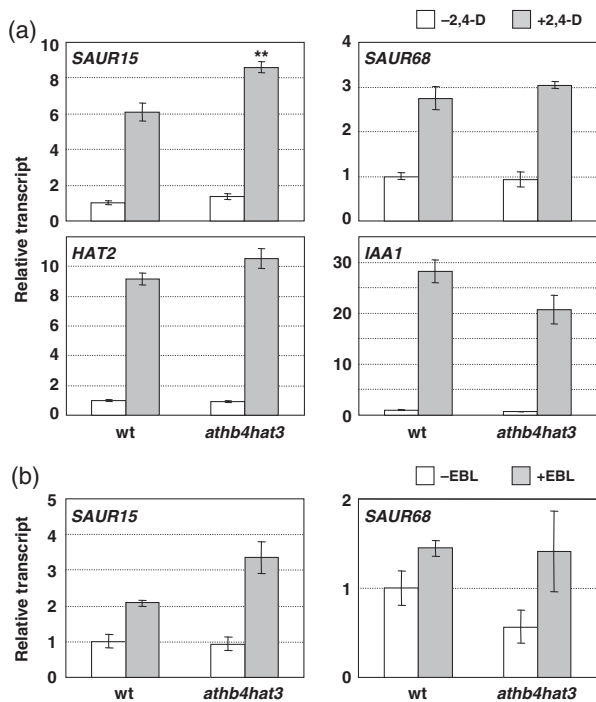


Figure 8. Effect of *athb4 hat3* mutation and hormone treatment on auxin- and brassinosteroid (BR)-responsive gene expression. White light (W)-grown 7-day-old wt and *athb4 hat3* seedlings were treated with either 50 μM 2,4-D (a) or 1 μM EBL (b) for four additional hours. (a) Transcript abundance of *SAUR15*, *SAUR68*, *HAT2* and *IAA1* in wt and *athb4 hat3* mutants in response to 2,4-D, grown as indicated. (b) Transcript abundance of *SAUR15* and *SAUR68* in wt and *athb4 hat3* mutants in response to EBL, grown as indicated. Each value is the mean ± SE of three qPCR replicates normalized to *UBQ10*. The transcript abundance is relative to untreated wt values. Asterisks indicate the statistical differences (** $P < 0.05$) relative to the corresponding wt controls.

auxin-responsive genes, such as *SAUR15*, *SAUR68*, *IAA1* and *HAT2* (Sawa *et al.*, 2002; Devlin *et al.*, 2003; Roig-Villanova *et al.*, 2007), was altered after induction with 2,4-D, and in response to shade, in seedlings with increased or reduced ATHB4 activity (Figures 3, 5a, 6, 8a and 9), further supporting the involvement of auxins in ATHB4-mediated SAS control. In the case of EBL application, the expression of *SAUR15* and *SAUR68* was almost completely abolished by increased ATHB4 activity (Figure 5b). In partial agreement, the EBL-induction of *SAUR15*, but not that of *SAUR68*, was slightly increased in *athb4 hat3* mutant seedlings (Figure 8b). The different effect of increased and reduced ATHB4 activity on the shade, auxin and/or EBL induction of *SAUR15*, *SAUR68* and *IAA1* expression probably reflects the distinct nature of the factors involved in their regulation. Auxin- and BR-signaling pathways have been proposed to converge at the level of the transcriptional regulation of target genes with common regulatory elements, such as E-box sequences (CANNTG) and five other types of plant *cis*-acting motifs, with a putative regulatory role (ATAGAA, TGHAAARK, AC-

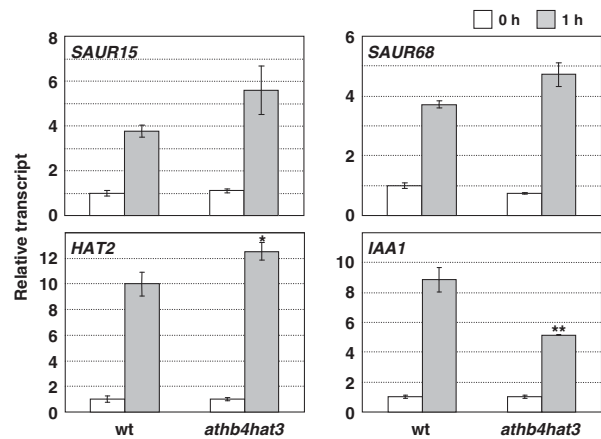


Figure 9. Effect of the *athb4 hat3* mutation and simulated shade on auxin-responsive gene expression. White light (W)-grown 7-day-old wt and *athb4 hat3* seedlings were treated for 0 and 1 h of W plus far-red light (W + FR). Transcript abundance of *SAUR15*, *SAUR68*, *HAT2* and *IAA1* in wt and *athb4 hat3* mutants, grown as indicated. Each value is the mean ± SE of three qPCR replicates, normalized to *UBQ10*. The transcript abundance is measured relative to wt, W-treated values. Asterisks indicate statistical differences (* $P < 0.1$ and ** $P < 0.05$) relative to the corresponding wt controls.

CGACA, TGACGT and ACGTCA; Nemhauser *et al.*, 2004; Table 1). As ATHB4 is not predicted to bind any of these motifs, our results suggest the participation of additional regulatory elements in the control of hormone-regulated gene expression, the existence of distinct factors binding to the common regulatory elements and/or their differential interaction with ATHB4.

The proposed role for ATHB4 as a positive regulator of BR signaling, based on the hypocotyl response in seedlings with increased or reduced ATHB4 activity to exogenous EBL (Figures 4 and 7c), might appear to conflict with its role as a negative regulator of a subset of BR-responsive genes, such as *SAUR15* and *SAUR68* (Figures 5b and 8b). The contrasting effect of ATHB4 might reflect the different BR-regulated responses analyzed here: elongation of just the hypocotyl tissues versus gene expression of the whole seedling. In addition, there is no information on how these molecular and physiological BR-regulated responses are correlated. ATHB4 transcriptional activity is complex, and it could be positive or negative, depending on the target gene. Indeed, whereas ATHB4 consistently acts as a repressor of *SAUR15* expression, it activates or represses *IAA1* or *SAUR68* expression, depending on the conditions analyzed (Figures 5, 6, 8, 9 and S6). To our knowledge, all of the HD-zip class-II factors analyzed are reported to act as transcriptional repressors only (Ohgishi *et al.*, 2001; Sawa *et al.*, 2002). Nevertheless, ATHB4 might act as a transcriptional activator through interaction with cell-type- or condition-specific factors. BRs are hormones involved in various developmental processes, like hypocotyl and stem elongation, leaf development, stress responses, vascular development and

photomorphogenesis (Clouse and Sasse, 1998; Li and Chory, 1999). In the case of proximity perception, genetic analyses indicated that the BR-deficient mutants *det2-1* and *dwarf1* (Luccioni *et al.*, 2002) show defective physiological SAS responses, suggesting that BRs are necessary for the normal development of these responses. Because the regulation of *PAR* gene expression is not abolished in *det2-1* mutant seedlings, BRs might affect SAS responses by acting downstream of the changes in *PAR* gene expression (Roig-Villanova *et al.*, 2006). In agreement with this possibility, our results supporting that *ATHB4* and *HAT3* are positive regulators of BR-responsiveness of the seedling hypocotyls (Figures 4 and 7) point to these factors as putative integrators of shade perception and BR action.

From the 10 members of the HD-Zip class-II subfamily, at least four (*ATHB2*, *HAT1*, *HAT2* and *ATHB4*) form a negative regulatory loop. In addition, the expression of five HD-Zip class-II genes (*ATHB2*, *ATHB4*, *HAT1*, *HAT2* and *HAT3*) is rapidly regulated by simulated shade (Roig-Villanova *et al.*, 2006) (Figure S4) or canopy shade (Sessa *et al.*, 2005; Carabelli *et al.*, 2007), rapidly connecting phytochrome-perceived light conditions with the expression levels of these genes. Functional analyses indicate that HD-Zip class-II genes are linked to auxin (*ATHB2*, *ATHB4* and *HAT2*) (Steindler *et al.*, 1999; Sawa *et al.*, 2002), GA (*ATHB4* and *HAHB-10*) (Rueda *et al.*, 2005) or BR (*ATHB4* and *HAT3*) (Figures 4, 7 and S3) activity. Together, these data indicate that after simulated shade perception, transcriptional networks rapidly intersect with those of plant hormones, such as the ones modulated by BRs via *ATHB4* and/or *HAT3*. Currently, we do not know whether *ATHB2*, *HAT1* or *HAT2* might also act as integrators of shade and BR responses.

Previously, we proposed that *PAR1* and *PAR2*, which encode negative regulators of SAS responses, rapidly connect shade perception with auxin responsiveness (Roig-Villanova *et al.*, 2007). This role was proposed because of their direct repressor effect on the auxin-induced expression of *SAUR15* and *SAUR68*. The expression of these two *SAUR* genes is also regulated by *ATHB4*. We do not know if this is a direct effect, even though no obvious *ATHB4* binding sites are present in the *SAUR15* promoter (data not shown). The connections between photomorphogenic and hormonal responses are numerous. However, a trend in the mechanisms connecting SAS and hormonal transcriptional networks is starting to emerge: phytochrome rapidly regulates the expression levels of several modulators of hormone responsiveness. The use of systems biology approaches to address the architecture of the transcriptional networks involved, combined with temporal and spatial expression analyses, are likely to help elucidate how the changes in the pattern of hormone-controlled growth result in spatially photoregulated responses.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant material and growth conditions

The Arabidopsis (*A. thaliana*) transgenic lines were generated in the Col-0 background. The SALK_104843 (*athb4-1*), SALK_121097 (*athb4-2*), SALK_059835 (*hat1-1*), SALK_006022 (*hat1-2*), SALK_047415 (*hat2-1*), SALK_055288 (*hat2-2*), SALK_091887 (*hat2-3*) and SALK_056541 (*hat3-1*) lines (Alonso *et al.*, 2003) were used to identify the corresponding homozygous plants by genotyping them using specific oligonucleotides. Details of the genotyping of these lines are given in Appendix S1.

For seed production and crosses, plants were grown in the glasshouse, as described by Martinez-Garcia *et al.* (2002). All of the experiments shown were performed with seedlings grown on plates in solid growth medium (GM-) (Roig-Villanova *et al.*, 2006) supplemented with 1% (w/v) sucrose (GM+), unless otherwise stated. Seeds were surface sterilized and sown on Petri dishes with GM. After stratification (3–6 days), plates were transferred to different conditions depending on the analysis performed.

For phenotype characterization, and hormone and shade response analyses, seeds were germinated and grown in a growth chamber (I-36VL, Percival Scientific Inc., <http://www.percival-scientific.com>; or Fitotronic LRmBITH-RS485 Ethernet, Inkoa Sistemas, <http://www.inkoa.com>) at 22°C for 2 days under continuous white light (W, 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation; R:FR ratio of 3.2–4.5). On day 2, seedlings were either maintained in W or transferred to W + FR (simulated shade) for five additional days (Figures 3, 4b, 7b and S4), unless otherwise stated. Because *athb4 hat3* adult plants showed very low fertility (data not shown), we performed experiments with these lines by sowing seeds produced by plants that were *athb4* homozygous and *hat3* heterozygous. Three days after germination under W, *athb4 hat3* mutant seedlings were phenotypically selected, transferred to new GM+ plates and differentially treated for four additional days (Figures 7a, c), or were kept under W for further treatments on day 7 (Figures 8 and 9). Seedlings from Col-0 plants were transferred at the same time and treated as wild-type controls. For lateral root counts, seedlings were grown on vertical plates for 9 days at 22–24°C under long-day conditions (i.e. 16-h light generated by cool-white fluorescent tubes that provide about 80–100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation) and 60% relative humidity.

The simulated shade (W + FR) was generated by enriching W with supplementary FR provided by QB1310CS-670-735 LED hybrid lamps (80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation, with an R:FR ratio of 0.05; Quantum Devices Inc., <http://www.quantumdev.com>) (Roig-Villanova *et al.*, 2007). Fluence rates were measured using an EPP2000 spectrometer (StellarNet, <http://www.stellarnet-inc.com>).

Chemical treatments

DEX, 2,4-D, EBL (Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com>) and NPA (Duchefa, <http://www.duchefa.com>) were dissolved in ethanol (v/v) at 5, 250, 5 and 5 mM, respectively. Stock solutions were kept at –20°C until use. For the analyses shown in Figures 1, 3, 4, 7 and S2, seeds were sown on GM+ plates supplemented or not with DEX and/or growth regulators from the day of sowing, unless otherwise stated. For the analyses shown in Figure 2, seeds were sown on filter paper on top of GM+ medium. On day 6, filter paper was transferred to new plates containing 4 ml of water supplemented or not with DEX for 24 h. For the analyses shown in Figures 5 and 6, seeds were sown on filter papers on top of GM+ medium supplemented or not with DEX. On day 7,

seedlings were transferred to new plates containing 4 ml of water \pm DEX and \pm EBL or \pm 2,4-D for four additional hours (Figure 5), or were differentially treated with W or W + FR for different times (Figure 6).

Hypocotyl, cotyledon, leaf and root measurements

The National Institutes of Health IMAGEJ software (<http://rsb.info.nih.gov>) was used on digital images to measure hypocotyl and root length, and cotyledon longitudinal expansion and width, as described elsewhere (Roig-Villanova *et al.*, 2007). At least 15 (hypocotyl) or 10 (cotyledons) seedlings were used for each data point, and the experiments were repeated between two and five times; a representative experiment is shown in the figures. The lateral root number was estimated under a dissecting microscope. The statistical analyses of the data (Student's *t*-test and two-way ANOVA) were performed using PRISM v4.00 for Windows (GraphPad, <http://www.graphpad.com>).

Generation of constructs to overexpress ATHB4

Details of the generation of the constructs used to obtain the described transgenic lines are provided in Appendix S1. Arabidopsis plants were transformed with the binary vectors obtained (pBF10 and pCS19), as described. The presence of the transgene in the selected T₁ plants was verified by PCR analyses using specific transgene primers on plant genomic DNA isolated from young leaves (Edwards *et al.*, 1991). Only lines with a single T-DNA insertion (as estimated from the segregation of the marker gene in T₂ populations) were eventually selected.

RNA blot analysis and quantitative PCR

Total RNA was isolated from seedlings, electrophoresed (10 μ g) and blotted as described by Roig-Villanova *et al.* (2006). Hybridization probes for *ATHB2*, *ATHB4*, *HAT2*, *SAUR15*, *SAUR68* and *25S* rRNA were prepared as described by Roig-Villanova *et al.* (2006, 2007). Probes for *HAT1*, *HAT3*, *HAT22*, *IAA1* and *At5g45670* were made from the respective full-length fragments cloned in pCS15, pCS20, pCS17, pIR3 and pJB31, by PCR using specific primers (see Appendix S1). Expression levels were normalized with the *25S* rRNA signal. Hybridization, washes, exposure and quantification of radioactive signals were carried out as described by Martínez-García *et al.* (2002). These experiments were conducted at least twice.

For reverse transcriptase and quantitative PCR (qPCR) analyses of gene expression, RNA was extracted from seedlings using the RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, <http://www.qiagen.com>). cDNA was synthesized using the SuperScript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com>) from 2 μ g of RNA previously treated with DNase (DNA-free kit; Ambion, <http://www.ambion.com>). For qPCR, we assayed the transcript abundance of target genes using SYBR green qPCR master mix (Applied Biosystems, <http://www.appliedbiosystems.com>). The *UBQ10* gene was used as a control, as transcript levels remained constant after simulated shade and hormone treatments (Nemhauser *et al.*, 2006; Franklin and Whitelam, 2007; Tao *et al.*, 2008). We assayed three biological replicas for each sample. The primer sequences can be found in Appendix S1.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank: the glasshouse services for plant care; M. Casado for help in qPCR experiments; B. Junqué, T. Bélécard and M. Galiáñez for technical support; and Drs C. Bellini, M. Blázquez, J. Casacuberta, M. Phillips and M. Rodríguez-Concepción for their useful comments on the manuscript. CS and JB-T's financial

support came from the Generalitat de Catalunya (GC) (C-RED Program). JB-T also acknowledges financial support from the CRAG. MS-M and IR-V received pre-doctoral fellowships from the CSIC and the Spanish Ministry of Science and Education (MEC), respectively. Our research is supported by grants from the GC (Xarxa de Referència en Biotecnologia) and MEC-FEDER to JFM-G (BIO2005-00154 and BIO2008-00169).

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Phenotype of plants constitutively overexpressing *ATHB4*.

Figure S2. Effect of naphthylphthalamic acid (NPA) on the response of *ATHB4-GR* seedlings to simulated shade.

Figure S3. The hypocotyl elongation response of seedlings overexpressing *ATHB4-GR* to the application of GA₃.

Figure S4. Loss-of-function mutants for members of the homeo-domain-leucine zipper (HD-Zip) class-II subfamily.

Figure S5. The hypocotyl elongation response of *athb4*, *hat1*, *hat2* and *hat3* single mutant seedlings to simulated shade.

Figure S6. Effect of the *athb4 hat3* mutation on gene expression.

Table S1. Root length and lateral root number in wild-type (wt) and P_{35S}:*ATHB4-GR*, either treated or not with dexamethasone (DEX).

Table S2. ANOVA data for the experiment shown in Figure 4.

Table S3. ANOVA data for the experiment shown in Figure S3.

Table S4. ANOVA data for the experiment shown in Figure 7b.

Appendix S1. Supplementary results and experimental procedures. Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

REFERENCES

- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J. *et al.* (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, 653–657.
- Ariel, F.D., Manavella, P.A., Dezar, C.A. and Chan, R.L. (2007) The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant Sci.* **12**, 419–426.
- Boerjan, W., Cervera, M.T., Delarue, M., Beeckman, T., Dewitte, W., Bellini, C., Caboche, M., Van Onckelen, H., Van Montagu, M. and Inze, D. (1995) Superroot, a recessive mutation in Arabidopsis, confers auxin overproduction. *Plant Cell*, **7**, 1405–1419.
- Bou-Torrent, J., Roig-Villanova, I. and Martínez-García, J.F. (2008) Light signaling: back to space. *Trends Plant Sci.* **13**, 108–114.
- Carabelli, M., Possenti, M., Sessa, G., Ciolfi, A., Sassi, M., Morelli, G. and Ruberti, I. (2007) Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genes Dev.* **21**, 1863–1868.
- Ciarbelli, A.R., Ciolfi, A., Salvucci, S., Ruzza, V., Possenti, M., Carabelli, M., Fruscalzo, A., Sessa, G., Morelli, G. and Ruberti, I. (2008) The Arabidopsis homeo-domain-leucine zipper II gene family: diversity and redundancy. *Plant Mol. Biol.* **68**, 465–478.
- Clouse, S.D. and Sasse, J.M. (1998) BRASSINOSTEROIDS: essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 427–451.
- Devlin, P.F., Patel, S.R. and Whitelam, G.C. (1998) Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell*, **10**, 1479–1487.
- Devlin, P.F., Robson, P.R., Patel, S.R., Goosey, L., Sharrock, R.A. and Whitelam, G.C. (1999) Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in Arabidopsis by controlling elongation growth and flowering time. *Plant Physiol.* **119**, 909–915.
- Devlin, P.F., Yanovsky, M.J. and Kay, S.A. (2003) A genomic analysis of the shade avoidance response in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **133**, 1617–1629.

- Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1349.
- Faigon-Soverna, A., Harmon, F.G., Storani, L., Karayekov, E., Staneloni, R.J., Gassmann, W., Mas, P., Casal, J.J., Kay, S.A. and Yanovsky, M.J. (2006) A constitutive shade-avoidance mutant implicates TIR-NBS-LRR proteins in Arabidopsis photomorphogenic development. *Plant Cell*, **18**, 2919–2928.
- Franklin, K.A. and Whitelam, G.C. (2007) Light-quality regulation of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* **39**, 1410–1413.
- Friedrichsen, D.M., Nemhauser, J., Muramitsu, T., Maloof, J.N., Alonso, J., Ecker, J.R., Furuya, M. and Chory, J. (2002) Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth. *Genetics*, **162**, 1445–1456.
- Goda, H., Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y. and Yoshida, S. (2004) Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **134**, 1555–1573.
- Izaguirre, M.M., Mazza, C.A., Biondini, M., Baldwin, I.T. and Ballare, C.L. (2006) Remote sensing of future competitors: impacts on plant defenses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 7170–7174.
- Li, J. and Chory, J. (1999) Brassinosteroid action in plants. *J. Exp. Bot.* **50**, 275–282.
- Lorrain, S., Allen, T., Duek, P.D., Whitelam, G.C. and Fankhauser, C. (2008) Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *Plant J.* **53**, 312–323.
- Luccioni, L.G., Oliverio, K.A., Yanovsky, M.J., Boccacchio, H.E. and Casal, J.J. (2002) Brassinosteroid mutants uncover fine tuning of phytochrome signaling. *Plant Physiol.* **128**, 173–181.
- Martinez-Garcia, J.F., Huq, E. and Quail, P.H. (2000a) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science*, **288**, 859–863.
- Martinez-Garcia, J.F., Santes, C.M. and Garcia-Martinez, J.L. (2000b) The end-of-day far-red irradiation increases gibberellin A1 content in cowpea (*Vigna sinensis* L.) by reducing its inactivation. *Physiol. Plant.* **108**, 426–434.
- Martinez-Garcia, J.F., Virgos-Soler, A. and Prat, S. (2002) Control of photo-period-regulated tuberization in potato by the Arabidopsis flowering-time gene CONSTANS. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 15211–15216.
- Nemhauser, J.L. (2008) Dawning of a new era: photomorphogenesis as an integrated molecular network. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 4–8.
- Nemhauser, J.L., Mockler, T.C. and Chory, J. (2004) Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis. *PLoS Biol.* **2**, E258.
- Nemhauser, J.L., Hong, F. and Chory, J. (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell*, **126**, 467–475.
- Ohgishi, M., Oka, A., Morelli, G., Ruberti, I. and Aoyama, T. (2001) Negative autoregulation of the Arabidopsis homeobox gene ATHB-2. *Plant J.* **25**, 389–398.
- Pierik, R., Whitelam, G.C., Voesenek, L.A., de Kroon, H. and 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**, 310–319.
- Prigge, M.J., Otsuga, D., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Drews, G.N. and Clark, S.E. (2005) Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in Arabidopsis development. *Plant Cell*, **17**, 61–76.
- Quail, P.H. (2002) Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 180–188.
- 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**, 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**, 4756–4767.
- Rueda, E.C., Dezar, C.A., Gonzalez, D.H. and Chan, R.L. (2005) Hahb-10, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is regulated by light quality and quantity, and promotes early flowering when expressed in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **46**, 1954–1963.
- Sablowski, R.W. and Meyerowitz, E.M. (1998) A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell*, **92**, 93–103.
- Salisbury, F.J., Hall, A., Grierson, C.S. and Halliday, K.J. (2007) Phytochrome coordinates Arabidopsis shoot and root development. *Plant J.* **50**, 429–438.
- Salter, M.G., Franklin, K.A. and Whitelam, G.C. (2003) Gating of the rapid shade-avoidance response by the circadian clock in plants. *Nature*, **426**, 680–683.
- Sawa, S., Ohgishi, M., Goda, H., Higuchi, K., Shimada, Y., Yoshida, S. and Koshida, 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**, 1011–1022.
- Sessa, G., Carabelli, M., Sassi, M., Ciolfi, A., Possenti, M., Mittempergher, F., Becker, J., Morelli, G. and Ruberti, I. (2005) A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in Arabidopsis. *Genes Dev.* **19**, 2811–2815.
- Smith, H. and Whitelam, G. (1997) The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant Cell Environ.* **20**, 840–844.
- Steindler, C., Matteucci, A., Sessa, G., Weimar, T., Ohgishi, M., Aoyama, T., Morelli, G. and Ruberti, I. (1999) Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development*, **126**, 4235–4245.
- Tao, Y., Ferrer, J.L., Ljung, K. et al. (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, **133**, 164–176.
- Vandenbussche, F., Pierik, R., Millenaar, F., Voesenek, L. and Van Der Straeten, D. (2005) Reaching out of the shade. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 462–468.

Genome-wide binding-site analysis of REVOLUTA reveals a link between leaf patterning and light-regulated growth responses

Journal:	<i>The Plant Journal</i>
Manuscript ID:	TPJ-00289-2012
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	02-Apr-2012
Complete List of Authors:	Brandt, Ronny; University of Tuebingen, Salla-Martret, Mercè; CRAG, Bou-Torrent, Jordi; CRAG, Musielak, Thomas; University of Tuebingen, Stahl, Mark; University of Tuebingen, Lanz, Christa; MPI Tuebingen, Ott, Felix; MPI Tuebingen, Schmid, Markus; MPI Tuebingen, Greb, Thomas; GMI, Schwarz, Martina; GMI, Choi, Sang-Bong; Myongji University, Quint, Marcel; IPB, Palauqui, Jean-Christophe; inra, Martinez-Garcia, Jaime; CRAG, Wenkel, Stephan; University of Tuebingen, ZMBP
Key Words:	leaf development, auxin, HD-ZIPIII, shade avoidance, HD-ZIPII, Arabidopsis thaliana

1
2
3 **Genome-wide binding-site analysis of REVOLUTA reveals a link between leaf**
4 **patterning and light-regulated growth responses**
5
6
7
8

9
10 Ronny Brandt¹, Mercè Salla-Martret^{2,9}, Jordi Bou-Torrent^{2,9}, Thomas Musielak¹,
11 Mark Stahl¹, Christa Lanz³, Felix Ott³, Markus Schmid³, Thomas Greb⁴, Martina
12 Schwarz⁴, Sang-Bong Choi⁵, Marcel Quint⁶, Jean-Christophe Palauqui⁷, Jaime F
13 Martínez-García^{2,8} and Stephan Wenkel^{1,10}
14
15
16
17
18
19

20 ¹Center for Plant Molecular Biology (ZMBP), University of Tübingen, 72076
21 Tübingen, Germany
22

23 ²Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG), CSIC-IRTA-UAB-UB,
24 Bellaterra, 08193-Barcelona, Spain
25

26 ³Department of Molecular Biology, Max Planck Institute for Developmental Biology,
27 72076 Tübingen, Germany
28

29 ⁴Gregor Mendel Institute of Molecular Plant Biology, Austrian Academy of Sciences,
30 Dr Bohr-Gasse 3, Vienna, Austria.
31

32 ⁵School of Biotechnology and Environmental Engineering, Myongji University,
33 Yongin, Kyunggi-do 449-728, South Korea
34

35 ⁶Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Independent Junior Research Group, 06120
36 Halle (Saale), Germany.
37

38 ⁷INRA Centre Versailles Grignon, Institut Jean Pierre Bourgin, UMR1318, INRA
39 AgroParisTech, F-78026 Versailles, France
40

41 ⁸Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), 08010-Barcelona, Spain
42

43 ⁹These authors contributed equally
44

45 ¹⁰corresponding author: stephan.wenkel@zmbp.uni-tuebingen.de
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

1
2
3
4
5
6 Unlike the situation in animals, the final morphology of the plant body is highly
7 modulated by the environment. During Arabidopsis development, intrinsic factors
8 provide the framework for basic patterning processes. CLASS III HOMEODOMAIN
9 LEUCINE ZIPPER (HD-ZIPIII) transcription factors are involved in embryo, shoot
10 and root patterning. During vegetative growth HD-ZIPIII proteins regulate several
11 polarity set-up processes such as in leaves and the vascular system. We have
12 identified several direct target genes of the HD-ZIPIII transcription factor
13 REVOLUTA (REV) using a ChIP-Seq approach. This analysis revealed that REV
14 acts upstream of auxin biosynthesis and directly regulates several class II HD-ZIP
15 transcription factors that have been shown to act in the shade avoidance response
16 pathway. We show that besides being involved in basic patterning, HD-ZIPIII
17 transcription factors have a critical role in controlling elongation growth that is
18 induced when plants experience shade. Leaf polarity is established by the opposed
19 actions of HD-ZIPIII and KANADI transcription factors. Finally, our study reveals
20 that the module consisting of HD-ZIPIII/KANADI transcription factors
21 antagonistically controls shade growth and that this antagonism is manifested in the
22 opposed regulation of shared target genes.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Introduction

Plants are sessile organisms and therefore have to cope with changing environmental conditions. In nature, plants usually live in communities with other plants and are thus under a constant struggle for optimal capture of sunlight. More than two centuries ago, Johann Wolfgang von Goethe recognized in his studies on plant morphology and adaptation (“Schriften zur Morphologie” 1790) an ‘inner nature’ providing the information for the body plan and the ‘outside world’ shaping the final morphology of the body plan. Both inner nature and the outside world interact, leading Goethe to propose the theory of the ‘double law’.

In order to avoid living in a suboptimal light environment, angiosperm plants have evolved refined mechanisms to alter their growth behavior. An early warning of the proximity of other plants (“proximity neighbor detection”) is the decrease in the ratio of red (R) to far-red (FR) light (R:FR ratio); this is caused because plant leaves selectively reflect FR light towards neighboring plants almost without affecting the rest of the daylight spectrum (Ballaré *et al.* 1990). By contrast, under the canopy of other plants (“canopy shade detection”), red light is absorbed by the shade-causing plants, letting the photosynthetic inactive far-red light pass, causing a reduction in both the R:FR ratio and the amount of photosynthetic active radiation (Franklin 2008, Martinez-Garcia *et al.* 2010). In either case, the decrease in the R:FR ratio is detected by the plant phytochrome system (Chen *et al.* 2004, Franklin *et al.* 2003). In *Arabidopsis*, a low R:FR ratio stimulates elongation of the hypocotyl in seedlings and the petiole (leaf stalk) in older plants. Prolonged exposure to shade alters the leaf developmental program and reduces the outgrowth of side shoots (Morelli and Ruberti 2002). Furthermore, rapid flowering and thus rapid seed set is induced in order to shorten generation time (Franklin and Whitelam 2005).

1
2
3 Downstream of the phytochrome system, several genes are transcriptionally
4 induced by shade. These genes execute a physiological response termed shade
5 avoidance syndrome (SAS). Genes belonging to the class II homeodomain leucine
6 zipper transcription factor (HD-ZIPII) family are among these rapidly induced genes
7 (Ariel *et al.* 2007, Ciarbelli *et al.* 2008). Ectopic overexpression of these HD-ZIPII
8 genes using the viral 35S promoter, causes hypocotyl elongation in non-shade
9 conditions (Ciarbelli, *et al.* 2008, Schena *et al.* 1993, Sorin *et al.* 2009, Steindler *et al.*
10 1999), supporting a role as positive regulators of hypocotyl growth; however, in
11 shade-conditions they seem to repress hypocotyl elongation (Sorin, *et al.* 2009). Loss
12 of HD-ZIPII function can result in short hypocotyls in shade or non-shade conditions
13 (Sorin, *et al.* 2009).
14
15

16 An intricate, not well understood hormonal signaling network underlies the
17 regulation of SAS. The TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF
18 ARABIDOPSIS1 (TAA1) is a key enzyme in tryptophan-dependent production of
19 auxin via the intermediate indole-3-pyruvic acid (Stepanova *et al.* 2008, Tao *et al.*
20 2008). Plants carrying loss-of-function mutations in *TAA1* are defective in the shade-
21 induced hypocotyl elongation (Tao, *et al.* 2008).
22
23

24 Class III homeodomain leucine-zipper (HD-ZIPIII) transcription factors are
25 key determinants in embryo, shoot and root patterning (Carlsbecker *et al.* 2010,
26 McConnell *et al.* 2001, Smith and Long 2010) and during vegetative growth regulate
27 several polarity set-up processes such as in leaves and the vascular system (Bowman
28 and Floyd 2008, Juarez *et al.* 2004). In Arabidopsis, expression of *HD-ZIPIII* genes is
29 strongly regulated by microRNAs and an additional control at the post-translational
30 level occurs via the formation of non-functional heterodimers with LITTLE ZIPPER
31 (ZPR) proteins (Kim *et al.* 2008, Wenkel *et al.* 2007).
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Here, we show that besides being involved in the regulation of basic
4
5 patterning processes, HD-ZIPIII transcription factors also have an important function
6
7 in the regulation of adaptive development. By directly controlling the expression of
8
9 the genes encoding the auxin biosynthetic enzymes *TAA1* and *YUCCA5 (YUC5)*, REV
10
11 can directly influence the levels of free auxin, a prerequisite for shade-induced
12
13 growth. In addition, four known regulators of shade signaling, the HD-ZIPII
14
15 transcription factors *HAT2*, *HAT3*, *ATHB2/HAT4* and *ATHB4*, are transcriptionally
16
17 regulated by REV. We furthermore show that the identified targets have overlapping
18
19 patterns of expression with REV and their expression is lower in plants with reduced
20
21 HD-ZIPIII activity, implying that they are *bona fide* direct positive targets. Genetic
22
23 analysis supports a role for *HD-ZIPIII*s in the regulation of the shade avoidance
24
25 response as *rev* mutant plants are affected in the promotion of elongation growth in
26
27 response to shade. Finally, we provide evidence that the leaf regulatory module,
28
29 consisting of HD-ZIPIII and KANADI transcription factors, is involved in the
30
31 regulation of adaptive growth by oppositely regulating the expression of key shared
32
33 target genes.
34
35
36
37
38
39
40

41 Results and Discussion

42 Genome-wide identification of REVOLUTA target genes.

43
44 To identify direct targets of REVOLUTA, an HD-ZIPIII protein, we used
45
46 transgenic plants expressing a FLAG-tagged ligand-binding domain of the
47
48 glucocorticoid receptor, fused to a microRNA-resistant version of *REV* under control
49
50 of the *35S*-promoter (*35S::FLAG-GR-REVd*). We then used ChIP-Seq to monitor
51
52 binding sites of the fusion protein in the *A. thaliana* genome. Comparative analysis of
53
54 two biologically independent ChIP-Seq experiments, revealed regions showing
55
56
57
58
59
60

1
2
3 enrichment in both datasets (Fig. 1a/b and supplementary data file). Among the
4
5 identified putative targets is also the *LITTLE ZIPPER (ZPR)* gene *ZPR1*, which was
6
7 known to be regulated by REV (Wenkel, *et al.* 2007), supporting the validity of our
8
9 screen. Using EasyGO (Zhou and Su 2007), we tested in an unbiased fashion for
10
11 enrichments of gene ontologies (GO) for the gene loci surrounding the genomic
12
13 regions bound by REV. Strong enrichment was observed for genes involved in
14
15 biological regulation and regulation of development (Fig. 1c). Surprisingly, the second
16
17 strongest GO enrichment was seen for genes involved in the response to abiotic
18
19 stimuli. This group contained known factors involved in red/far-red (R/FR) signaling.
20
21 A further analysis of lower order GO's is shown in the supplemental table 1 further
22
23 confirming that genes involved in R/FR signaling are enriched in our ChIP-Seq
24
25 dataset (Suppl. Table 1). Several of these regulators of light responses belong to the
26
27 class II homeodomain leucine-zipper (HD-ZIPII) transcription factor family, where
28
29 we find binding sites in the promoter regions in seven out of nine genes.
30
31
32
33

34 To identify a *cis*-regulatory motif required for regulation by REV, we used
35
36 MEME (meme.sdsc.edu) and compared the top 50 immunoprecipitated regions from
37
38 both ChIP-Seq experiments. This analysis yielded the sequence motif AT[G/C]AT
39
40 (Fig. 1d). The AT[G/C]AT sequence represents the inner core of the inverted
41
42 palindromic sequence GTAAT[G/C]ATTAC which was identified as *in vitro* binding
43
44 sequence for HD-ZIPIII proteins (Sessa *et al.* 1998). Of the 286 high confidence
45
46 peaks, identified in both ChIP-Seq experiments, we find about 60% to be located in
47
48 the 5' promoter region of putative target genes and about 30% in the 3' region (Fig.
49
50 1e). Binding in the coding sequence or the UTRs was seldom detected (Fig. 1e).
51
52 Taken together, our data suggest that REV is a DNA-binding protein that regulates the
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 expression of genes involved in basic patterning but also control genes involved in
4
5 adaptive developmental processes.
6
7
8
9

10 **REVOLUTA and its target genes have overlapping patterns of expression.**

11 A prerequisite for *bona fide* positively regulated target genes is that regulator
12 and target are expressed in the same tissue. For this reason, we performed *in situ*
13 hybridizations on transverse shoot apical meristem sections. As expected, a specific
14 signal for *REV* was detected in the vasculature and in the adaxial domain of
15 developing leaves (Fig. 2a/b). Very similar patterns of expression were found for
16 *HAT2*, *HAT3*, *ATHB4* and *TAA1* (Fig. 2c-f). The strong overlap of the spatial
17 expression pattern implies that these genes are *bona fide* *REV* targets. The
18 comparison of a *REV*- β -glucuronidase (GUS) reporter (*rev-9*) with a *TAA1* promoter-
19 GUS reporter line (Yamada *et al.* 2009), revealed that both *REV* and *TAA1* are
20 expressed in the vasculature and the shoot apical meristem region of young seedlings
21 (Fig. 2g-j). These findings support a role for *REV* being a direct upstream regulator of
22 both *HD-ZIPII* and *TAA1* expression.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 **Systematic analysis of REVOLUTA target genes encoding class II HD-ZIP** 42 **transcription factors.**

43 The class II HD-ZIP transcription factor family (*HD-ZIPII*) comprises nine
44 genes in Arabidopsis (Fig. 3a). To determine whether *REV* is involved in the
45 transcriptional regulation of the seven class II HD-ZIP transcription factors identified
46 by ChIP-Seq, we analyzed expression changes executed by induction of GR-*REVd*.
47 Therefore, we grew wild type and *35S::GR-REVd* plants (Wenkel, *et al.* 2007) in
48 liquid culture and induced them for 30 minutes with Dexamethasone. We then tested
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 if the expression of REV target genes is altered in response to GR-REVd induction.
4
5 Our analysis revealed a strong transcriptional up-regulation of *HAT2*, *HAT3*,
6
7 *ATHB2/HAT4* and *ATHB4*, in response to DEX-induction in *35S::GR-REVd*
8
9 transgenic plants (Fig. 3b). Even though identified as putative targets, the expression
10
11 of *HAT1*, *HAT14* and *HAT22* did not change significantly in response to DEX-
12
13 application, at least not in the conditions tested. To verify that the mode of regulation
14
15 of these *HD-ZIPII* genes is of direct nature, we performed the experiment in the
16
17 presence of the protein biosynthesis inhibitor cycloheximide (CHX). Also in the
18
19 presence of cycloheximide (CHX), *HAT2*, *HAT3*, *ATHB2/HAT4* and *ATHB4* show
20
21 significant expression changes in response to DEX-application, implying that they are
22
23 direct REV target genes (Fig. 3c).
24
25
26

27
28 To confirm our ChIP-Seq data, we performed independent ChIP experiments
29
30 followed by quantitative PCR. Three different positions around the investigated
31
32 transcription units were examined. One primer pair was designed to amplify in the
33
34 vicinity of the identified ChIP-Seq peak and two other primer pairs amplify regions
35
36 for which no enrichment was seen in either ChIP-Seq experiment. For all four *HD-*
37
38 *ZIPII* genes, we observed an enrichment of chromatin fragments precipitated from
39
40 DEX-induced *35S::FLAG-GR-REVd* plants compared to non-induced transgenic
41
42 plants (Fig. 3d). Therefore, we can conclude that the *HD-ZIPII* genes *HAT2*, *HAT3*,
43
44 *ATHB2/HAT4* and *ATHB4* represent direct targets that are positively regulated by
45
46 REV.
47
48
49
50
51

52 **REVOLUTA directly regulates genes encoding auxin biosynthetic enzymes.**

53
54 To find out if REV can transcriptionally regulate other genes encoding auxin
55
56 biosynthetic enzymes we systematically analyzed expression changes of all *YUCCA-*
57
58
59
60

1
2
3 type and *TAA1*-related genes in wild type Col-0 and transgenic *35S::GR-REVd* plants
4
5 elicited by DEX-induction (Suppl. Fig. S1). This study revealed that also *YUCCA5*
6
7 expression is regulated by REV (Suppl. Fig. S1). These findings suggest that REV is
8
9 able to induce auxin biosynthesis via the tryptophan-dependent IPA biosynthetic
10
11 pathway (Fig. 4a). To confirm that REV can up-regulate both *TAA1* and *YUC5*
12
13 expression, we performed quantitative RT-PCR reaction on wild type Col-0 and
14
15 transgenic *35S::GR-REVd* seedlings with and without DEX-application. These
16
17 experiments demonstrated that both *TAA1* and *YUC5* are transcriptionally increased in
18
19 response to DEX-application in the transgenic *35S::GR-REVd* plants (Fig. 4b). The
20
21 induction also occurs in seedlings pre-treated with cycloheximide (CHX), supporting
22
23 a direct role for the REV in the regulation of these genes (Fig. 4b). The direct
24
25 regulation was again confirmed by qChIP-PCRs and we detected binding of REV to
26
27 the 5' promoter of both *YUC5* and *TAA1* (Fig. 4c). In summary, these findings
28
29 indicate that REV is a direct regulator of the auxin biosynthetic genes *YUC5* and
30
31 *TAA1*.
32
33
34
35
36
37

38 **HD-ZIPIII transcription factors play a role in shade-induced hypocotyl** 39 **elongation** 40 41

42
43 We have shown that REV regulates the transcription of *TAA1*, *YUC5* and four
44
45 *HD-ZIPII* genes. *TAA1* and the four *HD-ZIPII* genes have all been shown to be
46
47 associated with light-induced growth responses. To understand whether REV and
48
49 other HD-ZIPIII transcription factors play a role in growth promotion in shade
50
51 conditions, we have analyzed various mutants grown in simulated canopy shade
52
53 conditions (for the ease of reading, we refer in the following to these conditions as
54
55 “shade”). As expected, Col-0 wild type plants develop elongated hypocotyls when
56
57
58
59
60

1
2
3 grown in shade conditions (Fig. 5a/b). Conversely, hypocotyls of *taa1* mutant plants
4
5 (*sav3-2*) do not elongate in response to shade (Fig. 5a/b). Plants carrying a mutation
6
7 in *REV* (*rev-5*) have shorter hypocotyls when grown in shade compared to wild type
8
9 plants, indicative of a compromised shade-growth response (Fig. 5a/b). Transgenic
10
11 lines in which the dimerization of HD-ZIPIII proteins is inhibited by overexpression
12
13 of ZPR-type microProteins (Kim, *et al.* 2008, Staudt and Wenkel 2011, Wenkel, *et al.*
14
15 2007) and plants in which the stability of HD-ZIPIII mRNA is affected by
16
17 overexpression of *miR165a* (Kim *et al.* 2010) also display growth defects in response
18
19 to shade (Fig. 5a/b). The analysis of *rev10D* mutant plants and the corresponding
20
21 Landsberg erecta wild type revealed that *rev10D* mutant plants show a slight increase
22
23 in hypocotyl length in response to the shade treatment (Fig. 5a/b). This increase is not
24
25 easy to interpret and might be due to the genetic background. Also in response to
26
27 “neighbor proximity detection” conditions in which only the amount of far-red light is
28
29 increased, *hd-zipIII* mutant plants showed significantly shorter hypocotyls compared
30
31 to wild type plants (Suppl. Fig. S2). These findings demonstrate that HD-ZIPIII
32
33 transcription factors are required for a full shade avoidance response.
34
35
36
37

38
39 We next analyzed, if gene expression changes in response to shade are altered
40
41 in plants, which are depleted of HD-ZIPIII function. Gene expression studies using
42
43 quantitative RT-PCR revealed that the expression of the FR-induced genes *HAT2*,
44
45 *HAT3*, *ATHB2/HAT4*, *ATHB4* but also *YUC5* is markedly induced in wild type plants
46
47 in response to shade treatment (Fig. 5c). The expression of all shade-induced genes is
48
49 significantly lower in *rev-5* and *35S::ZPR3* plants, supporting a role of REV in the
50
51 regulation of these genes. In the *35S::miR165a* transgenic line, expression of
52
53 *ATHB2/HAT4*, *ATHB4* and *YUC5* is lower compared to wild type but the expression
54
55 of *HAT3* is slightly higher than in the wild type controls. The expression of *TAA1*
56
57
58
59
60

1
2
3 does not change in response to shade and expression levels are slightly lower in *rev-5*
4
5 and *35S::ZPR3* plants compared to wild type, implying that REV is involved in the
6
7 regulation of basal *TAA1* expression, most likely with other still unknown factors. In
8
9 summary, we conclude that HD-ZIPIII transcription factors promote growth in
10
11 response to shade, most likely via regulation of shade-induced growth factor
12
13 signaling.
14
15
16
17

18
19 **Promotion of growth in far-red light is regulated by the HD-ZIPIII – HD-ZIPII –**
20
21 **auxin module.**
22

23 To this point we have shown, that REV transcriptionally induces a number of
24
25 target genes involved in light/shade-signaling and is required for a full shade
26
27 avoidance response. To determine whether REV is able to induce auxin levels, we
28
29 have introduced the *35S::GR-REVd* transgene into plants harboring the *DR5::GUS*
30
31 reporter by crossing. Col-0 wild type plants show DR5-GUS expression in the leaf
32
33 margins and hydathodes (Fig. 6a). Induction of GR-REVd by Dexamethasone
34
35 application results in a strong GUS signal throughout the leaf lamina (Fig. 6a). These
36
37 findings suggest that REV can either interfere with auxin signaling or directly induce
38
39 the production of auxin. To verify that auxin levels are up-regulated by REV, we used
40
41 GC-MS to determine the levels of free auxin in DEX-treated Col-0, *35S::GR-REVd*,
42
43 *taa1 (sav3-2)* and *35S::GR-REVd sav3-2* plants transiently exposed to shade. These
44
45 measurements confirmed that free auxin is indeed increased upon REV-induction in
46
47 both wild type and *taa1 (sav3-2)* mutant plants (Fig. 6b). The increased levels of
48
49 auxin mediated by REV in the *taa1 (sav3-2)* mutant background could be YUC5-
50
51 derived. It was shown, that TAA1 is required for shade-induced growth promotion
52
53 (Tao, *et al.* 2008), but mRNA levels of the *TAA1* gene do not change in response to
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 shade, suggesting a post-translational activation. Plants carrying loss-of-function
4
5 mutations in two *YUCCA* genes (*yuc1 yuc4*) also show a compromised shade
6
7 avoidance response (Won *et al.* 2011). Interestingly, overexpression of *YUCCA1* is
8
9 able to rescue the *taa1* mutant phenotype (Stepanova, *et al.* 2011, Won, *et al.* 2011).
10
11 These findings demonstrate that both *YUCCA* enzymes and *TAA1* are required for a
12
13 full shade avoidance response. Here we show, that *REV* is able to directly stimulate
14
15 auxin production, most likely by transcriptional regulation of both *TAA1* and *YUC5*.
16
17

18
19 Because *REV* can up-regulate both *TAA1* and *YUC5*, we investigated whether
20
21 induction of *REV* can complement the *taa1 (sav3-2)* mutant phenotype. To test this
22
23 hypothesis, we grew Col-0, *35S::GR-REVd*, *taa1 (sav3-2)* and *35S::GR-REVd sav3-2*
24
25 plants in white light and shade in the presence of 5 μ M DEX. We first observed that
26
27 hypocotyls of DEX-induced *35S::GR-REVd* transgenic plants are markedly longer in
28
29 white light, a phenotype that was also observed for plants ectopically expressing class
30
31 II HD-ZIP transcription factors (Ciarbelli, *et al.* 2008, Schena, *et al.* 1993, Sorin, *et*
32
33 *al.* 2009, Steindler, *et al.* 1999). In shade conditions, no further elongation of the
34
35 hypocotyl was observed. This finding is consistent with a role of *REV* in shade
36
37 avoidance, as an additional elongation in shade would suggest that *REV* functions in a
38
39 parallel pathway. However, ectopic induction *REV* partially complements the *taa1*
40
41 mutant phenotype (Fig. 6c). These findings suggest that either up-regulation of *HD-*
42
43 *ZIPII* factors can promote growth in the absence of *TAA1*-derived auxin or that
44
45 *YUC5*-induction can cause *TAA1*-independent auxin production resulting in the
46
47 promotion of growth. These results are in line with the auxin measurements, which
48
49 revealed an increase in the levels of free auxin in shade-treated *35S::GR-REVd taa1*
50
51 (*sav3-2*) plants compared to *taa1 (sav3-2)* mutant plants (Fig. 6c).
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5 **The leaf regulatory module consisting of HD-ZIPIII and KANADI transcription**
6 **factors oppositely regulates shade responses**
7
8

9
10 Leaf development is regulated by the concerted action of HD-ZIPIII
11 transcription factors, expressed in the adaxial domain, and KANADI transcription
12 factors, literally mirroring *HD-ZIPIII* expression, in the abaxial domain. Whereas
13 HD-ZIPIIIs act as transcriptional inducers (S. Wenkel unpublished and this study),
14 KANADIs are thought to act mostly by transcriptional repression. To find out if
15 KANADI transcription factors are also involved in the regulation of adaptive growth
16 responses, we tested if ectopic *KANDI1* (*KAN1*) expression affects shade-induced
17 hypocotyl elongation. Therefore we constructed DEX-inducible *KAN1*
18 overexpression lines (*35S::FLAG-GR-KAN1*). Wild type and transgenic *35S::FLAG-*
19 *GR-KAN1* plants were grown on DEX-containing MS plates in white light and shade.
20 Hypocotyls of induced *35S::FLAG-GR-KAN1* plants are strongly affected in
21 elongating in response to shade, almost resembling *taa1* mutant plants (Fig. 7a-c).
22 These findings show that *KAN1* is able to repress shade growth and thus KANADIs
23 act oppositely to HD-ZIPIIIs also in adaptive growth processes.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 We next tested whether the HD-ZIPIII/KANADI antagonism is manifested in
42 opposite regulation of potential target genes. We first checked whether our
43 *35S::FLAG-GR-KAN1* plants function like the published *35S::KAN1-GR* plants (Wu
44 *et al.* 2008). As shown for the published *35S::KAN1-GR* plants, also our *35S::FLAG-*
45 *GR-KAN1* line was able to strongly repress expression of the *ASYMMETRIC*
46 *LEAVES2* gene (Supplementary Fig. S3) and we were also able to detect binding of
47 the chimeric FLAG-GR-KAN1 protein close to the first exon (Supplementary Fig.
48 S3) as described before (Wu, *et al.* 2008). After confirming the functionality of our
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 transgenic plants, we tested whether the identified REV target genes are altered in
4
5 expression by KAN1-induction. We found that, of the investigated REV target genes,
6
7 expression of *HAT2*, *TAA1* and *YUC5* is significantly reduced by DEX-induction of
8
9 *35S::FLAG-GR-KAN1* plants (Fig. 7d-f). Most importantly, this also seems to be a
10
11 direct effect, as these changes occur in the presence of cycloheximide (CHX) (Fig.
12
13 7d-f). Using chromatin-immunoprecipitation, we tried to identify regions of KAN1-
14
15 binding in the promoters of REV/KAN1 targets. Strong binding was observed in the
16
17 *HAT2* promoter, where KAN1 interacts with a region about 1.0kb upstream of the
18
19 transcriptional start site (Fig. 7d). In the *TAA1* promoter, binding of KAN1 is more
20
21 complex and we identified two regions of potential KAN1 binding. The first region is
22
23 about 3.0kb upstream while the second region is located in the second intron (Fig. 7e).
24
25 We also scanned the *YUC5* promoter for KAN1 binding but were unable to identify a
26
27 potential binding region, indicating that the binding site might be located further up-
28
29 or down-stream of the regions tested (Fig. 7f).
30
31
32
33

34 Our data reveal that the leaf regulatory network, consisting of HD-ZIPIII and
35
36 oppositely acting KANADI transcription factors, is also involved in the regulation of
37
38 shade responses in Arabidopsis. We further show, that the antagonistic effect is, at
39
40 least partially, due to opposite regulation of gene expression. Hence it seems
41
42 conceivable that shade is perceived in adaxial (HD-ZIPIII/HD-ZIPII-derived) leaf
43
44 tissue. In situations of low *HD-ZIPIII* expression or ectopic *KAN1*-expression, adaxial
45
46 tissue might be limited, resulting in a compromised shade avoidance response. The
47
48 fact that both REV and KAN1, directly regulate the expression of shade-response
49
50 genes, points towards a function of REV and KAN1 in adaptive development.
51
52 Conversely, it also suggests that shade-response genes might fulfill functions in the
53
54 framework of leaf development.
55
56
57
58
59
60

1
2
3 It remains unclear whether and how REV is activated in response to low R:FR
4
5 conditions. Gene expression studies have shown that mRNA levels of *REV* are
6
7 slightly but significantly up-regulated in response to simulated canopy shade, while
8
9 expression of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* remain unchanged (Suppl. Fig. S4).
10
11 *HD-ZIPIII* gene expression is under strong regulation by microRNAs *miR165/6*
12
13 (Emery *et al.* 2003, Mallory *et al.* 2004). Expression of the *microRNAs* mirrors *HD-*
14
15 *ZIPIII* expression and it is thought that the gradual expression of the *microRNAs*
16
17 establishes a gradient of *HD-ZIPIII* expression from the adaxial domain (high levels)
18
19 to the abaxial domain (no expression) (Juarez, *et al.* 2004, Yao *et al.* 2009). Our
20
21 knowledge of factors directly controlling *HD-ZIPIII* expression is still limited.
22
23 Recently, the DOF-transcription factor *DOF5.1* was identified in an activation tagging
24
25 approach (Kim, *et al.* 2010). Overexpression of *DOF5.1* causes leaf adaxialization
26
27 which is due to ectopic expression of *REV* (Kim, *et al.* 2010). The analysis of publicly
28
29 available microarray data (AtGenexpress light series, data not shown) revealed a
30
31 weak response of *DOF5.1* expression in response to light. From these findings we can
32
33 conclude that *REV* expression and thus downstream developmental processes can be
34
35 altered by other transcription factors independent of microRNA action. It therefore
36
37 seems plausible that other still unknown factors might regulate *REV* expression in
38
39 response to altered environmental conditions. However, we cannot exclude that an
40
41 additional regulation of *REV* activity might occur at the protein level. *HD-ZIPIII*
42
43 proteins possess a carboxy-terminal MEKHLA-type PAS-domain that has the
44
45 potential to act as a sensor for light or light-induced voltage- or redox-changes
46
47 (Mukherjee and Burglin 2006). Recently, it has been shown that the *REV*-type
48
49 MEKHLA domain can negatively auto-regulate *HD-ZIPIII* activity (Magnani and
50
51 Barton 2011). The authors propose a steric masking mechanism relieved in response
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 to a cellular signal. Our finding that HD-ZIPIIIIs are involved in light-dependent
4
5 processes adumbrates that this signal could be light or light-derived.
6
7
8
9

10 **Concluding remarks**

11 More than two centuries ago, Goethe came up with the concept of the “double
12 law”, suggesting that internal factors provide the framework for developmental
13 processes and external factors influencing this internal framework, resulting in
14 modulation of growth and shape. Here, we provide evidence, that factors responding
15 to shade and factors required for normal development are partly the same, providing a
16 mechanistic basis for the “double law”. HD-ZIPIIIIs can induce *HD-ZIPIIs* and both
17 factors are required for a full shade avoidance response but also for correct leaf
18 development (data not shown). Contrary to the HD-ZIPIII/HD-ZIPII module, KAN1
19 represses gene expression and thereby inhibits shade growth. The role of auxin
20 remains elusive. We observe an increase in the levels of free auxin in response to
21 REV-induction and this auxin might be important for both normal development and
22 shade-induced hypocotyl growth.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 **Materials and Methods**

42 **Plant material, growth and phenotypic analysis**

43
44 The *TAA1* mutant allele *sav3-2* (W39Stop) (Tao, *et al.* 2008) was used in this
45 study. In addition, three different *REV* mutant alleles were used, *rev-5* (A260V) a
46 strong EMS allele (Otsuga *et al.* 2001), *rev-9* (Emery, *et al.* 2003) (introgressed into
47 the Col-0 background) and *rev10D* (P190L) rendering *REV* mRNA microRNA-
48 resistant. To affect all HD-ZIPIIIIs, *35S::ZPR3* (Wenkel, *et al.* 2007) and
49 *35S::miR165* (Kim, *et al.* 2010) lines were used to deplete HD-ZIPIII function. REVd
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 induction experiments were carried out using, the *35S::GR-REVd* line (Wenkel, *et al.*
4 2007). *35S::GR-REVd sav3-2* plants were generated by crossing. For more efficient
5 chromatin-immunoprecipitations, we have created transgenic *35S::FLAG-GR-REVd*
6 plants. Therefore, the glucocorticoid receptor was cloned in frame with the FLAG
7 epitope in the *pJAN33* vector (Weigel *et al.* 2003) using the *KpnI* restriction site, in
8 the following termed *pJAN33GR*.
9
10
11
12
13
14
15

16 For hypocotyl measurements of wild type and mutant plants in simulated
17 canopy shade conditions, seedlings were grown on MS plates in long day conditions
18 at 22 degree Celsius for 2 days in a Fi-totron 600H growth chamber (Fisons, UK) in
19 white light (blue light (460-480nm) = 2.34 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, red light (650-670) =
20 1.93 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, far-red (720-755) = 0.65 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, PAR (395-710nm) =89.3). For
21 shade avoidance hypocotyl measurements plants were transferred at day 2 to a shaded
22 compartment (using a combination of LEE-filters (LEEinc.) and far-red light bulbs
23 (Narva)) in the growth chamber and irradiated with far-red enriched light (blue light =
24 0.88 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, red light = 1.65 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, far-red = 2.56 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, PAR=39.8).
25 Seedlings were kept in these conditions for four days. Seedlings were photographed
26 and hypocotyls were measured using ImageJ.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 **In situ hybridizations**

44
45 For RNA *in situ* analyses, plants were grown for 3 weeks under short-day
46 conditions (8 h light (10,000 LUX), 16 h dark, 21°C, 60% humidity). For probe
47 synthesis, PCR products generated using cDNA as a template were cloned into the
48 *pGEMT* vector (Promega, Madison, USA) and used as a template for transcription
49 from the *T7* or *SP6* promoter. Primers employed for generating PCR products for
50 probe synthesis are listed in Supplementary table 2. *REV* sense and antisense probes
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 and subsequent *in situ* hybridizations were carried out according to Greb et al. (Greb
4
5 *et al.* 2003).
6
7
8
9

10 **Quantification of free auxin**

11 For analysis of indole-3-acetic acid approximately 200 mg Arabidopsis
12 seedlings were harvested and homogenized in liquid N₂. Extraction of the free
13 analytes was carried out at 28 °C for 90 min with 1.5 ml ethyl acetate, containing 0.1
14 % (v/v) formic acid and the internal standards 3-hydroxybenzoic acid and indole-5-
15 formic acid. After centrifugation at 10,000 g and 4 °C for 10 min 1.2 ml supernatant
16 was transferred into a new vial. The ethyl acetate was removed, and the sample was
17 dried over phosphorus pentoxide in vacuum (100mbar) over night. Derivatization was
18 performed with 70 µl MSTFA (Sigma) for 60 min at 40° C. 1 µl was injected onto
19 the GC column. Determination of the analytes was done by GC/MS (Agilent 6890 GC
20 and Agilent 5973 single quad mass spectrometer, Agilent Technologies, Santa Clara,
21 CA, USA), using splitted injection mode and an SPB-50 column (30 m, 0.25 mm
22 internal diameter, Supelco, Sigma–Aldrich, Munich, Germany). The GC oven
23 temperature was held at 70° C for 5 min, then ramped at 5° C per min to 280° C and
24 afterwards held for an additional 10 min at 280° C. Helium was used as carrier gas
25 with a flow rate of 1 ml/min. Detection of analytes was performed by electron impact
26 ionization (EI) single quadrupole mass spectrometry operated in selected ion
27 monitoring (SIM) mode.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52 **Gene expression analysis**

53 To analyze gene-expression, RNA was isolated from seedlings using the
54 roboklon GeneMATRIX universal RNA purification kit following manufacturer's
55
56
57
58
59
60

1
2
3 recommendations. One microgram of total RNA was reverse transcribed using the
4
5 Fermentas RevertAid Premium Reverse transcriptase with oligo-dT primers. cDNAs
6
7 were diluted 10-fold and 3.5 microliters were used for RT-PCR reactions.
8
9 Quantitative measurements were performed on a Biorad CFX384 using the Fermentas
10
11 SYBR Green qPCR master mix. Relative quantities were calculated using the delta Ct
12
13 method. Oligonucleotide sequences are listed in the supplemental table 2.
14
15
16
17

18 **ChIP-Seq and Chromatin-immunoprecipitation analysis**

19
20 For the ChIP-Seq study, Col-0 and transgenic *35S::FLAG-GR-REVd* plants
21
22 were grown in liquid MS medium for 10 days and induced with Dexamethasone for
23
24 90 minutes prior harvesting. Chromatin-immunoprecipitation experiments were
25
26 carried out as described by Kwon et al. (Kwon *et al.* 2005), except that anti-FLAG
27
28 M2 magnetic beads (Sigma) were used and immunoprecipitations were only
29
30 performed for two hours. After immunoprecipitation of the chromatin using anti-
31
32 FLAG antibody coupled beads, two ChIP-Seq libraries were generated and
33
34 sequenced. This ChIP-Seq experiment resulted in the identification of 480 positions
35
36 in the Arabidopsis genome at which we found an enrichment of chromatin fragments
37
38 in *35S::FLAG-GR-REVd* plants compared to wild type Columbia (Col-0) plants. To
39
40 confirm the binding of REVOLUTA to these regions, a second, independent ChIP-
41
42 Seq experiment was performed. This time induction with DEX was done for only 45
43
44 minutes and the addition of non-specific herring sperm DNA to avoid non-specific
45
46 binding was omitted. This second ChIP-Seq experiment identified 8819 genomic
47
48 regions that were significantly enriched.
49
50
51
52

53
54 The ChIP-seq libraries, the Illumina sequencing and data analysis was
55
56 performed as described by Yant et al. (Yant *et al.* 2010), with the exception that the
57
58
59
60

1
2
3 number of duplicate sequence reads was heuristically reduced prior to further
4
5 analysis. ChIP-Seq data have been submitted to the Gene Expression Omnibus
6
7 database (GEO accession no. GSE26722).
8
9

10 11 12 **Supplemental Data** 13

14
15 Supplemental data include a supplemental methods section, four figures, two
16
17 tables and a data file containing the ChIP-Seq information.
18
19

20 21 22 **Acknowledgments** 23

24
25 We thank Joanne Chory, José Alonso, Mark Estelle and the European
26
27 Arabidopsis Stock Centre (NASC) for providing seeds and Andreas Hiltbrunner,
28
29 Fabio Fornara, Sascha Laubinger, Kenneth Berendzen, Nabil Elrouby and Detlef
30
31 Weigel for helpful comments on the manuscript. The excellent technical support from
32
33 Gesine Seibold, Ingrid Blumberg, Maria Jose Molina and Karl Wurster is gratefully
34
35 acknowledged. Research in the JFM-G lab is supported by grants from the Generalitat
36
37 de Catalunya (Xarba, 2009-SGR697) and MICINN - FEDER funds (BIO2005-00154,
38
39 CSD2007-00036, BIO2008-00169). Research in the SW laboratory is made possible
40
41 by funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, WE4281/6-1), the
42
43 European Union (FP7 No. 256502), the Robert Bosch Foundation and the Ministry
44
45 for Agriculture (Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung; CHN13-22/12-13)
46
47 to SW.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure legends

Figure 1. Regulation of REVOLUTA target genes identified by ChIP-Seq. (A) Shown are putative target genes involved in organ development (pink) and factors involved in the regulation of adaptive responses (blue). (B) Distribution of the 286 high confidence REV-binding regions along the five Arabidopsis chromosomes. (C) Enrichment of selected gene ontology (GO) categories of loci surrounding REV binding sites. Plotted is the percentage of genes (Y-axis) identified in the ChIP-Seq experiments (green bars) in comparison to the abundance in the whole genome (grey bars) for three significantly enriched GO categories. (D) DNA sequence identified in the top 50 putative REV-target genes. This sequence represents the core of the *in vitro* determined pseudo-palindromic HD-ZIPIII binding site (shown below). (E) Diagram showing the location of binding peaks identified by ChIP-Seq.

Figure 2. Spatial expression pattern of REVOLUTA and its targets. *In situ* hybridizations showing patterns of expression of (A) *REV* sense, (B) *REV* antisense, (C) *TAA1* antisense, (D) *HAT2* antisense, (E) *HAT3* antisense and (F) *ATHB4* antisense in the vasculature and the adaxial domain of developing leaves. Expression pattern analysis using GUS reporter lines in seven day old Arabidopsis seedlings (G) *REV* and (I) *TAA1*, *pTAA1::GUS* (= *pTIR2::GUS*) plants (Yamada, *et al.* 2009). Hypocotyl cross-sections reveal that both *REV* (H) and *TAA1* (J) are primarily expressed in the vascular cylinder.

Figure 3. Identification of class II HD-ZIP transcription factors regulated by REVOLUTA. (A) Phylogenetic tree of Arabidopsis class II HD-ZIP proteins. Black circles indicate an enrichment detected in the first ChIP-Seq experiment, grey circles

1
2
3 indicate that binding was identified in the second ChIP-Seq experiment. Red circles
4
5 indicate that the binding of REV to the binding site located in the respective
6
7 promoters was verified by ChIP-qPCR. **(B)** Real-time quantitative RT-PCR
8
9 experiments showing expression changes of *HAT1*, *HAT2*, *HAT3*, *ATHB2/HAT4*,
10
11 *ATHB4*, *HAT14* and *HAT22* in Col-0 (grey) and *35S::GR-REVd* (green) in response to
12
13 30 min. DEX-induction. Plotted are average expression levels of three biological
14
15 replicates normalized to actin of the ratio +DEX versus -DEX treatments with
16
17 standard error. Asterisk: $p < 0.05$ **(C)** Real-time quantitative RT-PCR experiments
18
19 showing expression changes of *HAT2*, *HAT3*, *ATHB2/HAT4* and *ATHB4* in Col-0
20
21 (grey) and *35S::GR-REVd* (brown) in response to 60 min. DEX-induction in the
22
23 presence of the protein biosynthesis inhibitor cycloheximide (CHX). Asterisk: $p < 0.05$
24
25 **(D)** Chromatin-immunoprecipitation experiments with two biological replicates for
26
27 *35S::FLAG-GR-REVd* without DEX (grey bars) and *35S::FLAG-GR-REVd* with DEX
28
29 (red bars) plants testing the class II HD-ZIP loci *HAT2*, *HAT3*, *ATHB2/HAT4* and
30
31 *ATHB4*. Genomic regions were tested with three primer pairs (I-III) for each locus by
32
33 qPCR. Y-axis shows the fold enrichment normalized to the non-induced IPs. Gene
34
35 maps above the charts show the localization of the REV-binding site identified by
36
37 ChIP-Seq and the regions that were tested. Distance between two marks along the
38
39 chromosomes represents 1.0kb.
40
41
42
43
44
45
46
47

48 **Figure 4. Identification of genes encoding auxin biosynthetic enzymes regulated**
49 **by REV.** **(A)** Schematic diagram depicting the proposed tryptophan-dependent auxin
50
51 biosynthetic pathways (according to (Stepanova, *et al.* 2011, Won, *et al.* 2011)) and
52
53 the role of REV in the regulation of *TAA1* and *YUC5*. **(B)** Real-time quantitative RT-
54
55 PCR experiments showing expression changes of *TAA1* and *YUC5* in response to
56
57
58
59
60

DEX-induction. Plotted are fold changes in response to DEX in Col-0 (grey) and the inducible *35S::GR-REVd* transgenic line (green and brown). Bars on the left show expression changes in the absence of the protein biosynthesis inhibitor cycloheximide, whereas bars on the right show expression changes in plants pre-treated with cycloheximide (+CHX). (C) Chromatin-immunoprecipitation experiments with two biological replicates for *35S::FLAG-GR-REVd* without DEX (grey bars) and *35S::FLAG-GR-REVd* with DEX (red bars) plants testing the *TAA1* and *YUC5* loci. Genomic regions were tested with three primer pairs (I-III) for each locus by qPCR.

Figure 5. *hd-zipIII* mutant plants show altered shade avoidance responses. (A) Shade avoidance measurements by determining hypocotyl length in white light (WL) and white light supplemented with far-red light (WL+FR). Error bars represent the standard error. Asterisks indicate significant differences relative to the wild type controls ($p < 0.01$). Both student's T-Test and bifactorial ANOVA were performed to calculate p-values. (B) Representative seedlings. (C) Gene-expression analysis of *HAT2*, *HAT3*, *ATHB2/HAT4*, *ATHB4*, *TAA1* and *YUC5* in different *hd-zipIII* mutants (*rev-5*: dark green, *35S::ZPR3*: green, *35S::miR165a*: light green) in comparison to Col-0 wild type plants (red). Seedlings were grown in white light for 9 days and then exposed to simulated canopy shade conditions. Samples were harvested before shade treatments and 30 and 60 minutes after. Error bars represent the standard deviation of three biological replicates.

Figure 6. REV can induce the production of auxin. (A) Analysis of the *DR5::GUS* reporter in the presence of the inducible *35S::GR-REVd* transgene. The upper panel shows *DR5::GUS* levels in wild type in white light (control) and in the presence of

1
2
3 DEX. Below the wild type, seedlings are shown harboring the *35S::GR-REVd*
4
5 transgene in combination with *DR5::GUS* DEX-induced translocation of the GR-
6
7 REVd chimeric protein up-regulates GUS-expression. **(B)** Determination of free
8
9 auxin levels in Col-0, *35S::GR-REVd*, *taa1 (sav3-2)* and *35S::GR-REVd sav3-2* plants
10
11 using GC-MS. **(C)** Shade avoidance measurements by determining hypocotyl length
12
13 in white light (WL) and white light supplemented with far-red light (WL+FR). Error
14
15 bars represent the standard error. Asterisks indicate significant differences relative to
16
17 the wild type controls ($p < 0.01$).
18
19
20
21
22

23 **Figure 7. The leaf regulatory module consisting of HD-ZIPIII and KANADI**
24 **transcription factors cross-regulates shade response genes.** **(A)** Hypocotyl length
25
26 of *35S::FLAG::GR-KAN1* and WT Col-0 w/o 5 μ M dexamethasone in white light WL
27
28 and simulated canopy shade (Far-red light FRL enriched white light WL) show
29
30 significant shorter hypocotyls in DEX-induced transgenic line. Asterisk: T-Test, $p <$
31
32 0.005. Error bars represent standard deviation. **(B)** Ratio of the lengths of hypocotyls
33
34 treated with simulated canopy shade compared to white light WL. **(C)** Representative
35
36 samples. **(D-F)** *HAT2*, *TAA1* and *YUC5* are negatively cross-regulated by KAN1, as
37
38 their expression is significantly down-regulated in response to KAN1-induction. A
39
40 clear enrichment of KAN1-binding was only observed for *HAT2*, indicating that
41
42 KAN1 can bind to a region around fragment IIb **(D)**. In the *TAA1* promoter, we found
43
44 to potential binding regions around fragments I and II **(E)**. For *YUC5* we were unable
45
46 to identify a binding region **(F)**.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- Ariel, F.D., Manavella, P.A., Dezar, C.A. and Chan, R.L.** (2007) The true story of the HD-Zip family. *Trends in Plant Science*, **12**, 419-426.
- Ballaré, C.L., Scopel, A.L. and Sánchez, R.A.** (1990) Far-Red Radiation Reflected from Adjacent Leaves: An Early Signal of Competition in Plant Canopies. *Science*, **247**, 329-332.
- Bowman, J.L. and Floyd, S.K.** (2008) Patterning and Polarity in Seed Plant Shoots. *Annual Review of Plant Biology*, **59**, 67-88.
- Carlsbecker, A., Lee, J.Y., Roberts, C.J., Dettmer, J., Lehesranta, S., Zhou, J., Lindgren, O., Moreno-Risueno, M.A., Vaten, A., Thitamadee, S., Campilho, A., Sebastian, J., Bowman, J.L., Helariutta, Y. and Benfey, P.N.** (2010) Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature*, **465**, 316-321.
- Chen, M., Chory, J. and Fankhauser, C.** (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annual Review of Genetics*, **38**, 87-117.
- Ciarbelli, A.R., Ciolfi, A., Salvucci, S., Ruzza, V., Possenti, M., Carabelli, M., Fruscalzo, A., Sessa, G., Morelli, G. and Ruberti, I.** (2008) The Arabidopsis Homeodomain-leucine Zipper II gene family: diversity and redundancy. *Plant Molecular Biology*, **68**, 465-478.
- Emery, J.F., Floyd, S.K., Alvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N.P., Izhaki, A., Baum, S.F. and Bowman, J.L.** (2003) Radial patterning of Arabidopsis shoots by class IIIHD-ZIP and KANADI genes. *Current Biology*, **13**, 1768-1774.
- Franklin, K.A.** (2008) Shade avoidance. *New Phytologist*, **179**, 930-944.
- Franklin, K.A., Praekelt, U., Stoddart, W.M., Billingham, O.E., Halliday, K.J. and Whitelam, G.C.** (2003) Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **131**, 1340-1346.
- Franklin, K.A. and Whitelam, G.C.** (2005) Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. *Annals of Botany*, **96**, 169-175.
- Greb, T., Clarenz, O., Schaefer, E., Mueller, D., Herrero, R., Schmitz, G. and Theres, K.** (2003) Molecular analysis of the LATERAL SUPPRESSOR gene in Arabidopsis reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes & Development*, **17**, 1175-1187.
- Juarez, M.T., Kui, J.S., Thomas, J., Heller, B.A. and Timmermans, M.C.P.** (2004) microRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. *Nature*, **428**, 84-88.
- Kim, H.-S., Kim, S.J., Abbasi, N., Bressan, R.A., Yun, D.-J., Yoo, S.-D., Kwon, S.-Y. and Choi, S.-B.** (2010) The DOF transcription factor Dof5.1 influences leaf axial patterning by promoting Revoluta transcription in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **64**, 524-535.
- Kim, Y.-S., Kim, S.-G., Lee, M., Lee, I., Park, H.-Y., Seo, P.J., Jung, J.-H., Kwon, E.-J., Suh, S.W., Paek, K.-H. and Park, C.-M.** (2008) HD-ZIP III Activity Is Modulated by Competitive Inhibitors via a Feedback Loop in Arabidopsis Shoot Apical Meristem Development. *Plant Cell*, **20**, 920-933.
- Kwon, C.S., Chen, C. and Wagner, D.** (2005) WUSCHEL is a primary target for transcriptional regulation by SPLAYED in dynamic control of stem cell fate in Arabidopsis. *Genes & Development*, **19**, 992-1003.

- 1
2
3 **Magnani, E. and Barton, M.K.** (2011) A Per-ARNT-Sim-Like Sensor Domain
4 Uniquely Regulates the Activity of the Homeodomain Leucine Zipper
5 Transcription Factor REVOLUTA in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **23**, 567-
6 582.
- 7
8 **Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Jones-Rhoades, M.W., Tang, G., Zamore, P.D.,**
9 **Barton, M.K. and Bartel, D.P.** (2004) MicroRNA control of PHABULOSA
10 in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5[prime] region.
11 *EMBO J*, **23**, 3356-3364.
- 12 **Martinez-Garcia, J.F., Galstyan, A., Salla-Martret, M., Cifuentes-Esquivel, N.,**
13 **Gallemi, M. and Bou-Torrent, J.** (2010) Regulatory Components of Shade
14 Avoidance Syndrome. *Advances in Botanical Research, Vol 53*, **53**, 65-116.
- 15 **McConnell, J.R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J. and Barton, M.K.**
16 (2001) Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial
17 patterning in shoots. *Nature*, **411**, 709-713.
- 18 **Morelli, G. and Ruberti, I.** (2002) Light and shade in the photocontrol of
19 Arabidopsis growth. *Trends in Plant Science*, **7**, 399-404.
- 20 **Mukherjee, K. and Burglin, T.R.** (2006) MEKHLA, a Novel Domain with
21 Similarity to PAS Domains, Is Fused to Plant Homeodomain-Leucine Zipper
22 III Proteins. *Plant Physiol.*, **140**, 1142-1150.
- 23 **Otsuga, D., DeGuzman, B., Prigge, M.J., Drews, G.N. and Clark, S.E.** (2001)
24 REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. *The Plant*
25 *Journal*, **25**, 223-236.
- 26
27 **Schena, M., Lloyd, A.M. and Davis, R.W.** (1993) The HAT4 gene of Arabidopsis
28 encodes a developmental regulator. *Genes & Development*, **7**, 367-379.
- 29 **Sessa, G., Steindler, C., Morelli, G. and Ruberti, I.** (1998) The Arabidopsis Athb-8,
30 -9 and -14 genes are members of a small gene family coding for highly related
31 HD-ZIP proteins. *Plant Molecular Biology*, **38**, 609-622.
- 32 **Smith, Z.R. and Long, J.A.** (2010) Control of Arabidopsis apical-basal embryo
33 polarity by antagonistic transcription factors. *Nature*, **464**, 423-U121.
- 34 **Sorin, C., Salla-Martret, M., Bou-Torrent, J., Roig-Villanova, I. and Martinez-**
35 **Garcia, J.F.** (2009) ATHB4, a regulator of shade avoidance, modulates
36 hormone response in Arabidopsis seedlings. *The Plant Journal*, **59**, 266-277.
- 37 **Staudt, A.-C. and Wenkel, S.** (2011) Regulation of protein function by
38 microProteins. *EMBO Rep*, **12**, 35-42.
- 39 **Steindler, C., Matteucci, A., Sessa, G., Weimar, T., Ohgishi, M., Aoyama, T.,**
40 **Morelli, G. and Ruberti, I.** (1999) Shade avoidance responses are mediated
41 by the ATHB-2 HD-Zip protein, a negative regulator of gene expression.
42 *Development*, **126**, 4235-4245.
- 43 **Stepanova, A.N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L.M., Xie, D.-Y.,**
44 **Dolezal, K., Schlereth, A., Jürgens, G. and Alonso, J.M.** (2008) TAA1-
45 Mediated Auxin Biosynthesis Is Essential for Hormone Crosstalk and Plant
46 Development. *Cell*, **133**, 177-191.
- 47 **Stepanova, A.N., Yun, J., Robles, L.M., Novak, O., He, W., Guo, H., Ljung, K.**
48 **and Alonso, J.M.** (2011) The Arabidopsis YUCCA1 Flavin Monooxygenase
49 Functions in the Indole-3-Pyruvic Acid Branch of Auxin Biosynthesis. *The*
50 *Plant Cell Online*, **23**, 3961-3973.
- 51 **Tao, Y., Ferrer, J.L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F.X., Long, J.A., Li, L., Moreno,**
52 **J.E., Bowman, M.E., Ivans, L.J., Cheng, Y.F., Lim, J., Zhao, Y.D.,**
53 **Ballare, C.L., Sandberg, G., Noel, J.P. and Chory, J.** (2008) Rapid
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for
4 shade avoidance in plants. *Cell*, **133**, 164-176.
- 5 **Weigel, M., Varotto, C., Pesaresi, P., Finazzi, G., Rappaport, F., Salamini, F. and**
6 **Leister, D.** (2003) Plastocyanin Is Indispensable for Photosynthetic Electron
7 Flow in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 31286-
8 31289.
- 9
10 **Wenkel, S., Emery, J., Hou, B.-H., Evans, M.M.S. and Barton, M.K.** (2007) A
11 Feedback Regulatory Module Formed by LITTLE ZIPPER and HD-ZIPIII
12 Genes. *Plant Cell*, **19**, 3379-3390.
- 13 **Won, C., Shen, X., Mashiguchi, K., Zheng, Z., Dai, X., Cheng, Y., Kasahara, H.,**
14 **Kamiya, Y., Chory, J. and Zhao, Y.** (2011) Conversion of tryptophan to
15 indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF
16 ARABIDOPSIS and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National*
17 *Academy of Sciences*, **108**, 18518-18523.
- 18 **Wu, G., Lin, W.C., Huang, T.B., Poethig, R.S., Springer, P.S. and Kerstetter,**
19 **R.A.** (2008) KANADI1 regulates adaxial-abaxial polarity in *Arabidopsis* by
20 directly repressing the transcription of ASYMMETRIC LEAVES2.
21 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*
22 *America*, **105**, 16392-16397.
- 23 **Yamada, M., Greenham, K., Prigge, M.J., Jensen, P.J. and Estelle, M.** (2009) The
24 TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2 Gene Is Required for Auxin
25 Synthesis and Diverse Aspects of Plant Development. *Plant Physiol.*, **151**,
26 168-179.
- 27
28 **Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T.T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., Chen, X. and**
29 **Schmid, M.** (2010) Orchestration of the Floral Transition and Floral
30 Development in *Arabidopsis* by the Bifunctional Transcription Factor
31 APETALA2. *The Plant Cell*, **22**, 2156-2170.
- 32 **Yao, X., Wang, H., Li, H., Yuan, Z., Li, F., Yang, L. and Huang, H.** (2009) Two
33 types of cis-acting elements control the abaxial epidermis-specific
34 transcription of the MIR165a and MIR166a genes. *FEBS Letters*, **583**, 3711-
35 3717.
- 36
37 **Zhou, X. and Su, Z.** (2007) EasyGO: Gene Ontology-based annotation and
38 functional enrichment analysis tool for agronomical species. *BMC Genomics*,
39 **8**, 246.
- 40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

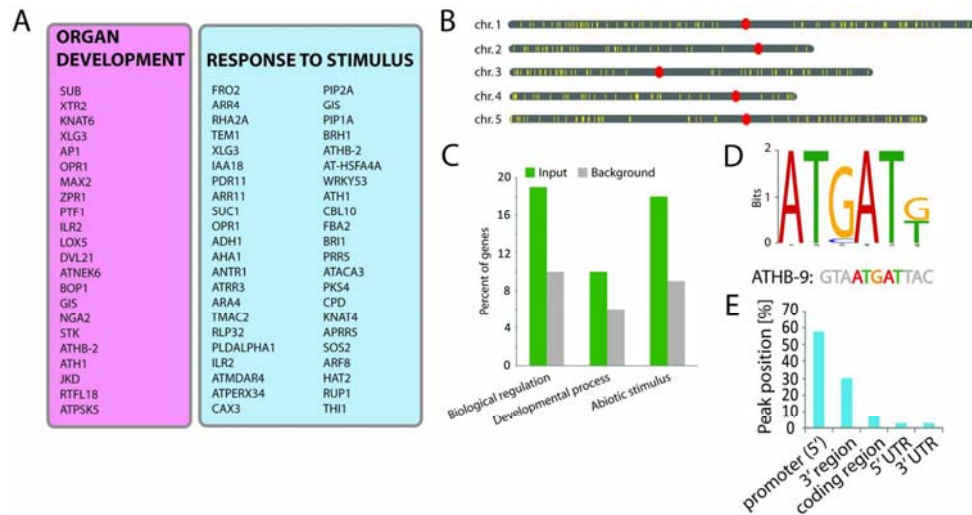


Figure 1. Regulation of REVOLUTA target genes identified by ChIP-Seq. (A) Shown are putative target genes involved in organ development (pink) and factors involved in the regulation of adaptive responses (blue). (B) Distribution of the 286 high confidence REV-binding regions along the five Arabidopsis chromosomes. (C) Enrichment of selected gene ontology (GO) categories of loci surrounding REV binding sites. Plotted is the percentage of genes (Y-axis) identified in the ChIP-Seq experiments (green bars) in comparison to the abundance in the whole genome (grey bars) for three significantly enriched GO categories. (D) DNA sequence identified in the top 50 putative REV-target genes. This sequence represents the core of the in vitro determined pseudo-palindromic HD-ZIPIII binding site (shown below). (E) Diagram showing the location of binding peaks identified by ChIP-Seq.

167x88mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

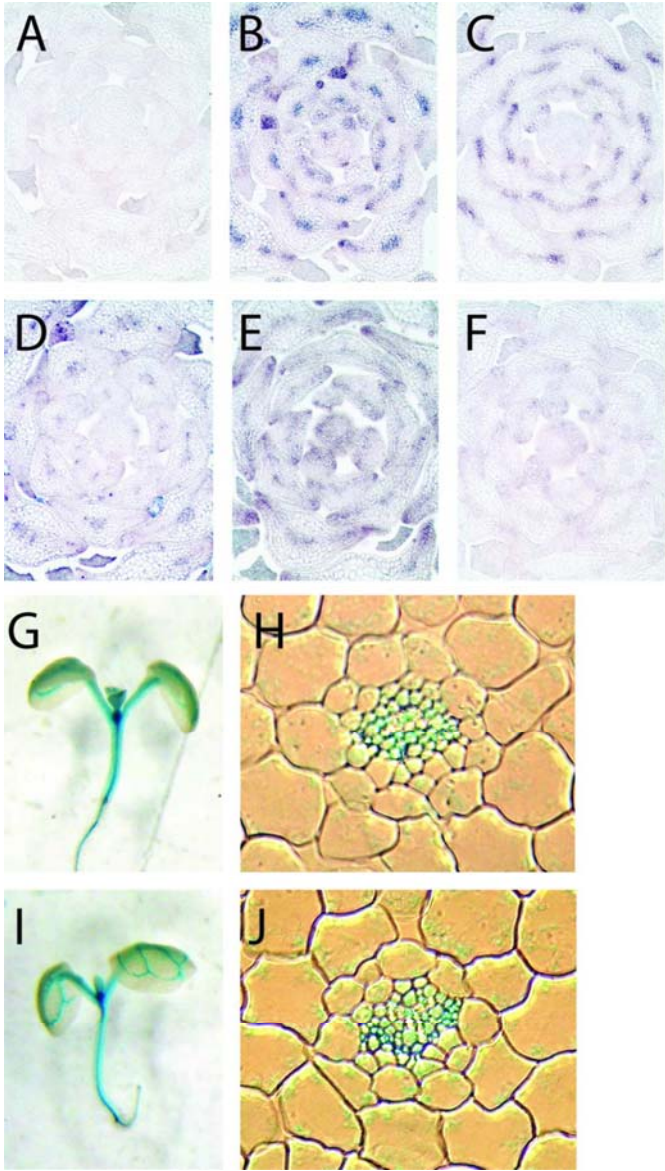


Figure 2. Spatial expression pattern of REVOLUTA and its targets. In situ hybridizations showing patterns of expression of (A) REV sense, (B) REV antisense, (C) TAA1 antisense, (D) HAT2 antisense, (E) HAT3 antisense and (F) ATHB4 antisense in the vasculature and the adaxial domain of developing leaves. Expression pattern analysis using GUS reporter lines in seven day old Arabidopsis seedlings (G) REV and (I) TAA1, pTAA1::GUS (= pTIR2::GUS) plants (Yamada, et al. 2009). Hypocotyl cross-sections reveal that both REV (H) and TAA1 (J) are primarily expressed in the vascular cylinder.
80x141mm (300 x 300 DPI)

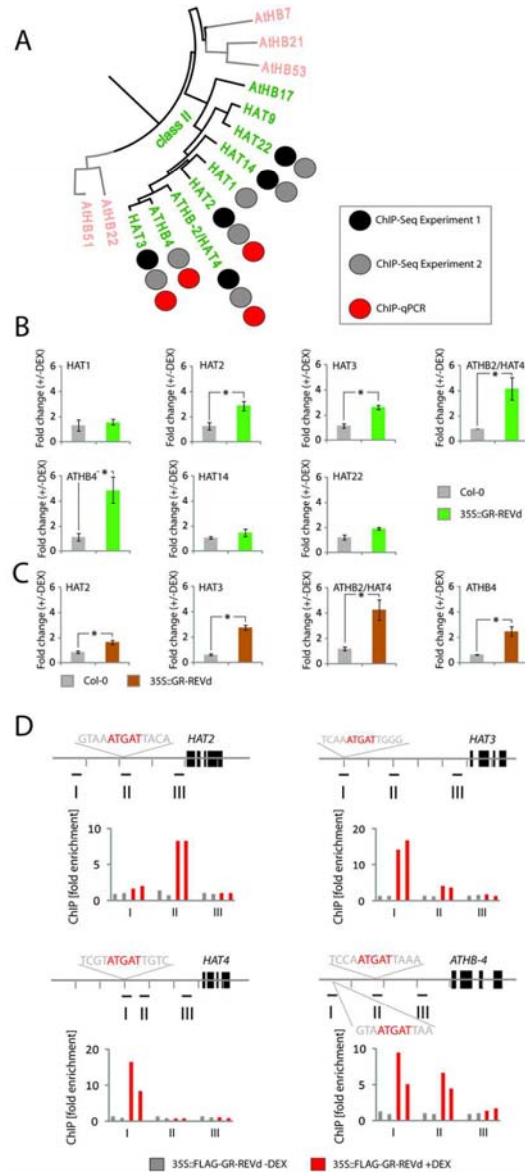


Figure 3. Identification of class II HD-ZIP transcription factors regulated by REVOLUTA. (A) Phylogenetic tree of Arabidopsis class II HD-ZIP proteins. Black circles indicate an enrichment detected in the first ChIP-Seq experiment, grey circles indicate that binding was identified in the second ChIP-Seq experiment. Red circles indicate that the binding of REV to the binding site located in the respective promoters was verified by ChIP-qPCR. (B) Real-time quantitative RT-PCR experiments showing expression changes of HAT1, HAT2, HAT3, ATHB2/HAT4, ATHB4, HAT14 and HAT22 in Col-0 (grey) and 35S::GR-REVd (green) in response to 30 min. DEX-induction. Plotted are average expression levels of three biological replicates normalized to actin of the ratio +DEX versus -DEX treatments with standard error. Asterisk: $p < 0.05$ (C) Real-time quantitative RT-PCR experiments showing expression changes of HAT2, HAT3, ATHB2/HAT4 and ATHB4 in Col-0 (grey) and 35S::GR-REVd (brown) in response to 60 min. DEX-induction in the presence of the protein biosynthesis inhibitor cycloheximide (CHX). Asterisk: $p < 0.05$ (D) Chromatin-immunoprecipitation experiments with two biological replicates for 35S::FLAG-GR-REVd without DEX (grey bars) and 35S::FLAG-GR-REVd with DEX (red bars) plants testing the class II HD-ZIP loci HAT2, HAT3, ATHB2/HAT4 and ATHB4. Genomic regions

1
2
3 were tested with three primer pairs (I-III) for each locus by qPCR. Y-axis shows the fold enrichment
4 normalized to the non-induced IPs. Gene maps above the charts show the localization of the REV-binding
5 site identified by ChIP-Seq and the regions that were tested. Distance between two marks along the
6 chromosomes represents 1.0kb.
7 80x176mm (300 x 300 DPI)
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

CONFIDENTIAL

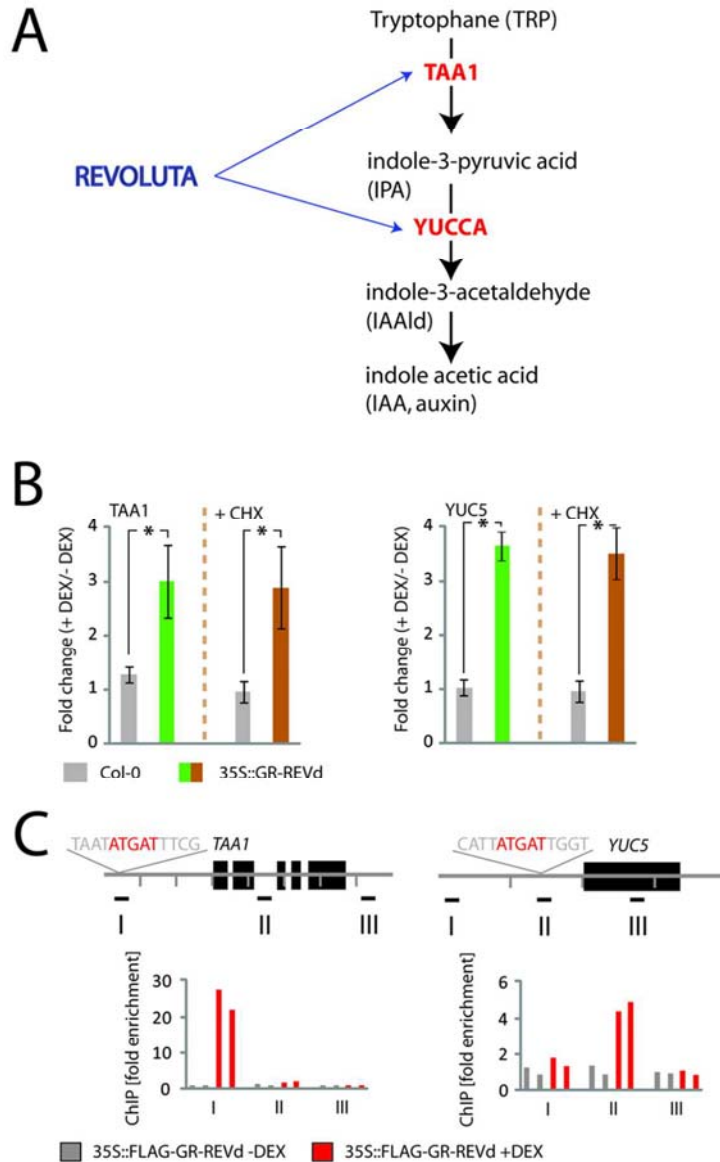


Figure 4. Identification of genes encoding auxin biosynthetic enzymes regulated by REV. (A) Schematic diagram depicting the proposed tryptophan-dependent auxin biosynthetic pathways (according to (Stepanova, et al. 2011, Won, et al. 2011)) and the role of REV in the regulation of TAA1 and YUC5. (B) Real-time quantitative RT-PCR experiments showing expression changes of TAA1 and YUC5 in response to DEX-induction. Plotted are fold changes in response to DEX in Col-0 (grey) and the inducible 35S::GR-REVd transgenic line (green and brown). Bars on the left show expression changes in the absence of the protein biosynthesis inhibitor cycloheximide, whereas bars on the right show expression changes in plants pre-treated with cycloheximide (+CHX). (C) Chromatin-immunoprecipitation experiments with two biological replicates for 35S::FLAG-GR-REVd without DEX (grey bars) and 35S::FLAG-GR-REVd with DEX (red bars) plants testing the TAA1 and YUC5 loci. Genomic regions were tested with three primer pairs (I-III) for each locus by qPCR.

80x127mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

CONFIDENTIAL

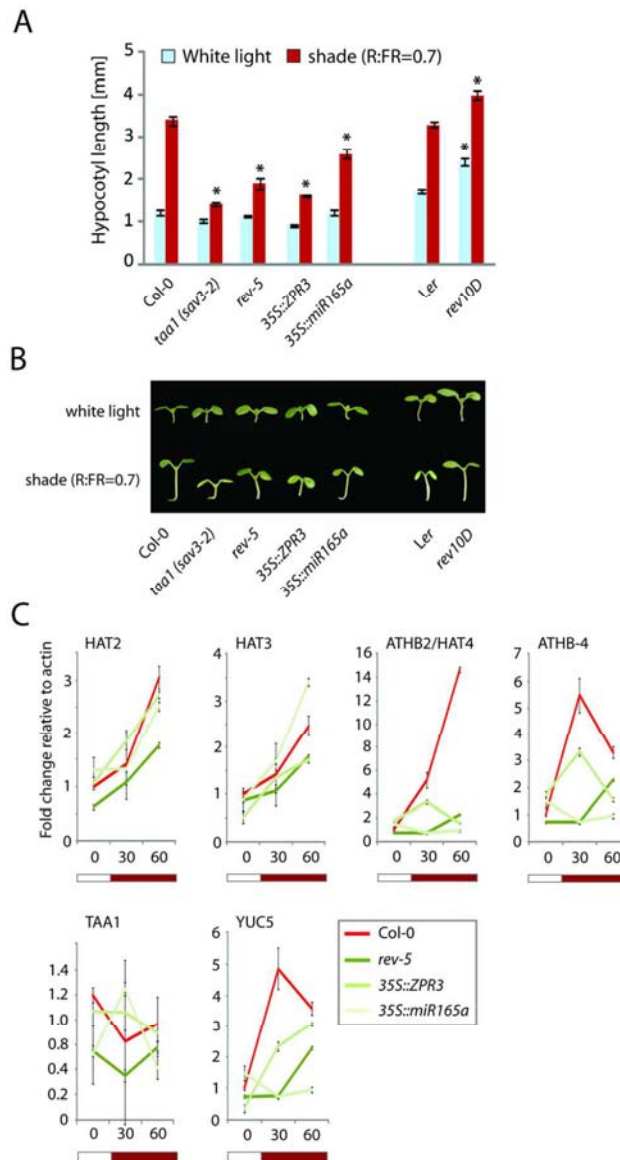


Figure 5. *hd-zipIII* mutant plants show altered shade avoidance responses. (A) Shade avoidance measurements by determining hypocotyl length in white light (WL) and white light supplemented with far-red light (WL+FR). Error bars represent the standard error. Asterisks indicate significant differences relative to the wild type controls ($p < 0.01$). Both student's T-Test and bifactorial ANOVA were performed to calculate p-values. (B) Representative seedlings. (C) Gene-expression analysis of HAT2, HAT3, ATHB2/HAT4, ATHB4, TAA1 and YUC5 in different *hd-zipIII* mutants (*rev-5*: dark green, *35S::ZPR3*: green, *35S::miR165a*: light green) in comparison to Col-0 wild type plants (red). Seedlings were grown in white light for 9 days and then exposed to simulated canopy shade conditions. Samples were harvested before shade treatments and 30 and 60 minutes after. Error bars represent the standard deviation of three biological replicates.

80x147mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

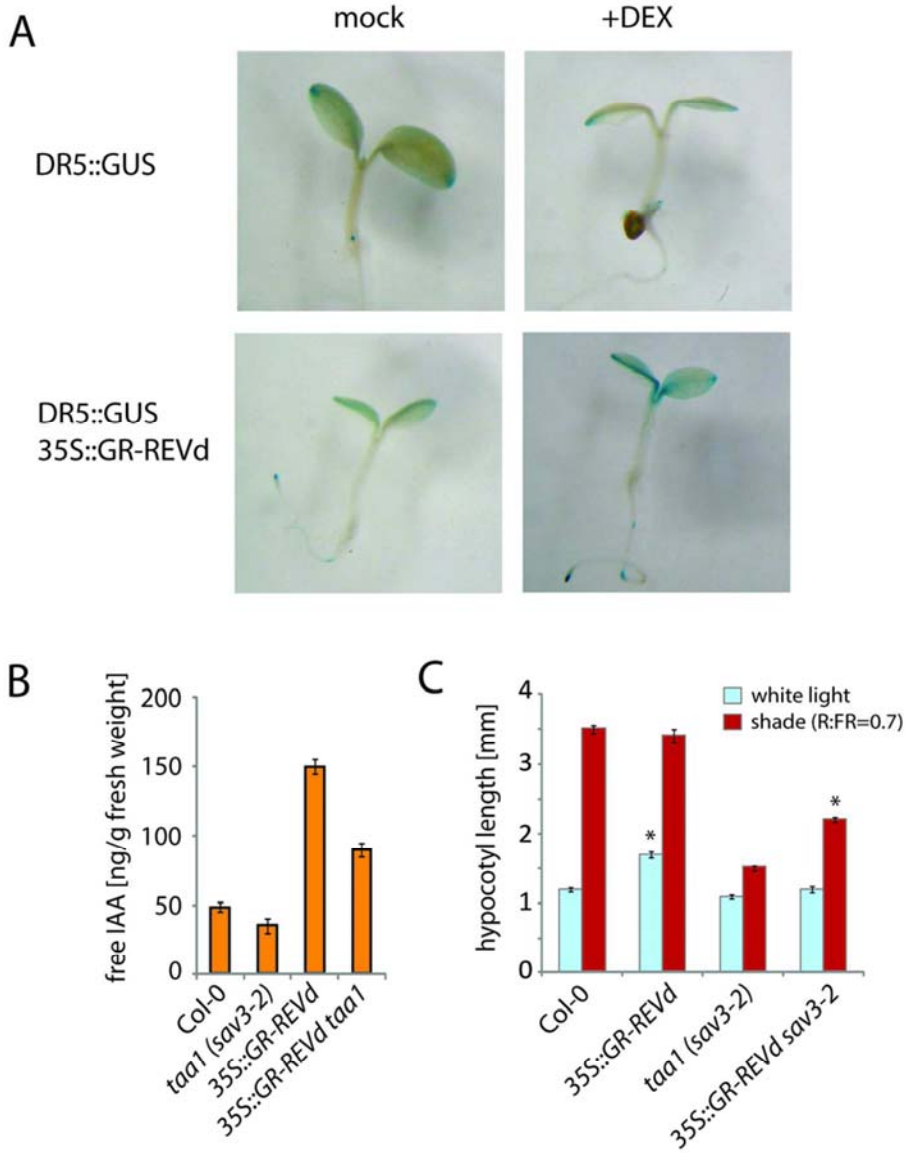


Figure 6. REV can induce the production of auxin. (A) Analysis of the DR5::GUS reporter in the presence of the inducible 35S::GR-REVd transgene. The upper panel shows DR5::GUS levels in wild type in white light (control) and in the presence of DEX. Below the wild type, seedlings are shown harboring the 35S::GR-REVd transgene in combination with DR5::GUS DEX-induced translocation of the GR-REVd chimeric protein up-regulates GUS-expression. (B) Determination of free auxin levels in Col-0, 35S::GR-REVd, taa1 (sav3-2) and 35S::GR-REVd sav3-2 plants using GC-MS. (C) Shade avoidance measurements by determining hypocotyl length in white light (WL) and white light supplemented with far-red light (WL+FR). Error bars represent the standard error. Asterisks indicate significant differences relative to the wild type controls ($p < 0.01$).

80x101mm (300 x 300 DPI)

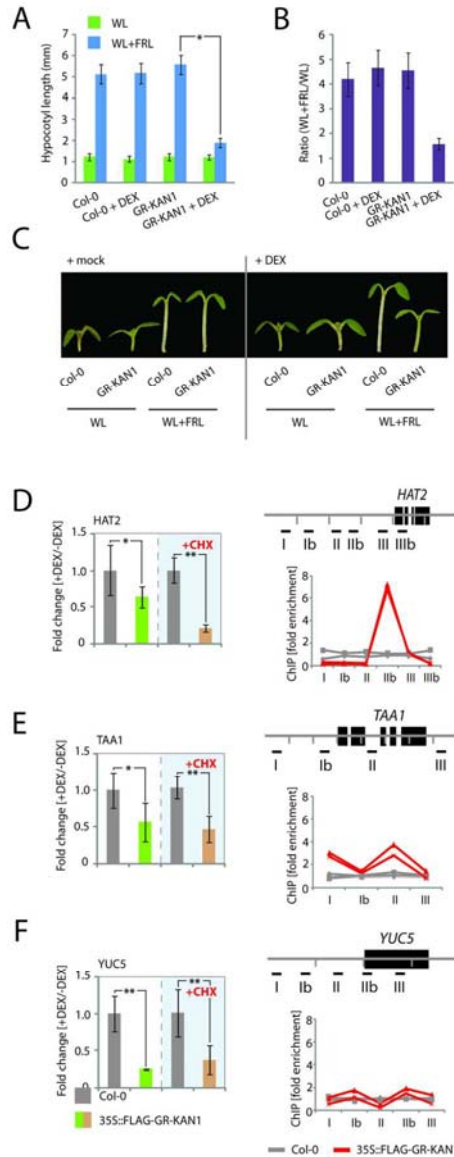


Figure 7. The leaf regulatory module consisting of HD-ZIPIII and KANADI transcription factors cross-regulates shade response genes. (A) Hypocotyl length of 35S::FLAG::GR-KAN1 and WT Col-0 w/o 5 μ M dexamethasone in white light WL and simulated canopy shade (Far-red light FRL enriched white light WL) show significant shorter hypocotyls in DEX-induced transgenic line. Asterisk: T-Test, $p < 0.005$. Error bars represent standard deviation. (B) Ratio of the lengths of hypocotyls treated with simulated canopy shade compared to white light WL. (C) Representative samples. (D-F) HAT2, TAA1 and YUC5 are negatively cross-regulated by KAN1, as their expression is significantly down-regulated in response to KAN1-induction. A clear enrichment of KAN1-binding was only observed for HAT2, indicating that KAN1 can bind to a region around fragment IIb (D). In the TAA1 promoter, we found to potential binding regions around fragments I and II (E). For YUC5 we were unable to identify a binding region (F).

8. BIBLIOGRAFIA

- Abe, M., Katsumata, H., Komeda, Y., and Takahashi, T. (2003). Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in *Arabidopsis*. *Development* *130*, 635-643.
- Achard, P., and Genschik, P. (2009). Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J Exp Bot* *60*, 1085-1092.
- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G.T., and Genschik, P. (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Curr Biol* *19*, 1188-1193.
- Ahmad, M., and Cashmore, A.R. (1996). The *pef* mutants of *Arabidopsis thaliana* define lesions early in the phytochrome signaling pathway. *Plant J* *10*, 1103-1110.
- Alba, R., Kelmenson, P.M., Cordonnier-Pratt, M.M., and Pratt, L.H. (2000). The phytochrome gene family in tomato and the rapid differential evolution of this family in angiosperms. *Mol Biol Evol* *17*, 362-373.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., *et al.* (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* *301*, 653-657.
- Al-Sady, B., Kikis, E.A., Monte, E., and Quail, P.H. (2008). Mechanistic duality of transcription factor function in phytochrome signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 2232-2237.
- Ariel, F.D., Manavella, P.A., Dezar, C.A., and Chan, R.L. (2007). The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant Sci* *12*, 419-426.
- Bae, G., and Choi, G. (2008). Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annu Rev Plant Biol* *59*, 281-311.
- Bhalerao, R.P., Eklof, J., Ljung, K., Marchant, A., Bennett, M., and Sandberg, G. (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* *29*, 325-332.
- Boccalandro, H.E., De Simone, S.N., Bergmann-Honsberger, A., Schepens, I., Fankhauser, C., and Casal, J.J. (2008). PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE1 regulates root phototropism and gravitropism. *Plant Physiol* *146*, 108-115.
- Boerjan, W., Cervera, M.T., Delarue, M., Beeckman, T., Dewitte, W., Bellini, C., Caboche, M., Van Onckelen, H., Van Montagu, M., and Inze, D. (1995). Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell* *7*, 1405-1419.
- Bolle, C. (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* *218*, 683-692.
- Borthwick, H.A., Hendricks, S.B., Parker, M.W., Toole, E.H., and Toole, V.K. (1952). A Reversible Photoreaction Controlling Seed Germination. *Proc Natl Acad Sci U S A* *38*, 662-666.
- Bou-Torrent, J., Roig-Villanova, I., and Martinez-Garcia, J.F. (2008). Light signaling: back to space. *Trends Plant Sci* *13*, 108-114.
- Brandt, R., Salla-Martret, M., Bou-Torrent, J., Musielak, T., Stahl, M., Lanz, C., Ott, F., Schmid, M., Greb, T., Schwarz, M., *et al.* (2012). Genome-wide binding-site analysis of REVOLUTA reveals a link between leaf patterning and light-mediated growth responses. *Plant J*.

Briggs W. R., and Spudich, J.L. (2005). Handbook of photosensory receptors. *Phytochrome signalling*, 151-170.

Briggs, W.R., and Christie, J.M. (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* 7, 204-210.

Carabelli, M., Morelli, G., Whitelam, G., and Ruberti, I. (1996). Twilight-zone and canopy shade induction of the *Athb-2* homeobox gene in green plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3530-3535.

Carabelli, M., Possenti, M., Sessa, G., Ciolfi, A., Sassi, M., Morelli, G., and Ruberti, I. (2007). Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genes Dev* 21, 1863-1868.

Carabelli, M., Sessa, G., Baima, S., Morelli, G., and Ruberti, I. (1993). The *Arabidopsis Athb-2* and *-4* genes are strongly induced by far-red-rich light. *Plant J* 4, 469-479.

Carlsbecker, A., Lee, J.Y., Roberts, C.J., Dettmer, J., Lehesranta, S., Zhou, J., Lindgren, O., Moreno-Risueno, M.A., Vaten, A., Thitamadee, S., *et al.* (2010). Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* 465, 316-321.

Casal, J.J., Davis, S.J., Kirchenbauer, D., Viczian, A., Yanovsky, M.J., Clough, R.C., Kircher, S., Jordan-Beebe, E.T., Schafer, E., Nagy, F., *et al.* (2002). The serine-rich N-terminal domain of oat phytochrome a helps regulate light responses and subnuclear localization of the photoreceptor. *Plant Physiol* 129, 1127-1137.

Casal, J.J., and Smith, H. (1988). Persistent effects of changes in phytochrome status on internode growth in light-grown mustard: Occurrence, kinetics and locus of perception. *Planta* 175, 214-220.

Castillon, A., Shen, H., and Huq, E. (2007). Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci* 12, 514-521.

Chandler, J.W., Cole, M., Flier, A., and Werr, W. (2009). BIM1, a bHLH protein involved in brassinosteroid signalling, controls *Arabidopsis* embryonic patterning via interaction with DORNROSCHEN and DORNROSCHEN-LIKE. *Plant molecular biology* 69, 57-68.

Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L.O., van der Horst, G.T., Batschauer, A., and Ahmad, M. (2011). The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu Rev Plant Biol* 62, 335-364.

Ciarbelli, A.R., Ciolfi, A., Salvucci, S., Ruzza, V., Possenti, M., Carabelli, M., Fruscalzo, A., Sessa, G., Morelli, G., and Ruberti, I. (2008). The *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper II gene family: diversity and redundancy. *Plant molecular biology* 68, 465-478.

Clack, T., Shokry, A., Moffet, M., Liu, P., Faul, M., and Sharrock, R.A. (2009). Obligate heterodimerization of *Arabidopsis* phytochromes C and E and interaction with the PIF3 basic helix-loop-helix transcription factor. *Plant Cell* 21, 786-799.

Clouse, S.D., and Sasse, J.M. (1998). BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 427-451.

Colon-Carmona, A., Chen, D.L., Yeh, K.C., and Abel, S. (2000). Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome in vitro. *Plant Physiol* 124, 1728-1738.

Devlin, P.F., and Kay, S.A. (2000). Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* 12, 2499-2510.

- Devlin, P.F., Patel, S.R., and Whitelam, G.C. (1998). Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell* 10, 1479-1487.
- Devlin, P.F., Yanovsky, M.J., and Kay, S.A. (2003). A genomic analysis of the shade avoidance response in Arabidopsis. *Plant Physiol* 133, 1617-1629.
- Djakovic-Petrovic, T., Wit, M.D., Voesenek, L.A., and Pierik, R. (2007). DELLA protein function in growth responses to canopy signals. *Plant J*.
- Dowson-Day, M.J., and Millar, A.J. (1999). Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in Arabidopsis. *Plant J* 17, 63-71.
- Duek, P.D., and Fankhauser, C. (2003). HFR1, a putative bHLH transcription factor, mediates both phytochrome A and cryptochrome signalling. *Plant J* 34, 827-836.
- Emery, J.F., Floyd, S.K., Alvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N.P., Izhaki, A., Baum, S.F., and Bowman, J.L. (2003). Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol* 13, 1768-1774.
- Endo, M., Nakamura, S., Araki, T., Mochizuki, N., and Nagatani, A. (2005). Phytochrome B in the mesophyll delays flowering by suppressing FLOWERING LOCUS T expression in Arabidopsis vascular bundles. *Plant Cell* 17, 1941-1952.
- Fairchild, C.D., Schumaker, M.A., and Quail, P.H. (2000). HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev* 14, 2377-2391.
- Fankhauser, C., and Staiger, D. (2002). Photoreceptors in Arabidopsis thaliana: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta* 216, 1-16.
- Fankhauser, C., Yeh, K.C., Lagarias, J.C., Zhang, H., Elich, T.D., and Chory, J. (1999). PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in Arabidopsis. *Science* 284, 1539-1541.
- Favory, J.J., Stec, A., Gruber, H., Rizzini, L., Oravecz, A., Funk, M., Albert, A., Cloix, C., Jenkins, G.I., Oakeley, E.J., *et al.* (2009). Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in Arabidopsis. *Embo J* 28, 591-601.
- Franklin, K.A., Praekelt, U., Stoddart, W.M., Billingham, O.E., Halliday, K.J., and Whitelam, G.C. (2003). Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* 131, 1340-1346.
- Franklin, K.A., and Quail, P.H. (2010). Phytochrome functions in Arabidopsis development. *J Exp Bot* 61, 11-24.
- Franklin, K.A., and Whitelam, G.C. (2004). Light signals, phytochromes and cross-talk with other environmental cues. *J Exp Bot* 55, 271-276.
- Friedrichsen, D.M., Joazeiro, C.A., Li, J., Hunter, T., and Chory, J. (2000). Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. *Plant Physiol* 123, 1247-1256.
- Galstyan, A., Bou-Torrent, J., Roig-Villanova, I., and Martinez-Garcia, J.F. (2012). A Dual Mechanism Controls Nuclear Localization in the Atypical Basic-Helix-Loop-Helix Protein PAR1 of Arabidopsis thaliana. *Mol Plant* 5, 143-151.

- Galstyan, A., Cifuentes-Esquivel, N., Bou-Torrent, J., and Martinez-Garcia, J.F. (2011). The shade avoidance syndrome in Arabidopsis: a fundamental role for atypical basic helix-loop-helix proteins as transcriptional cofactors. *Plant J* 66, 258-267.
- Galstyan, A., and Martinez-Garcia, J.F. (2010). Light Signalling in Plant Developmental Regulation. In *Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives*, E.C.P.a.M.R. Davey, ed. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010), pp. 255-275.
- Garcia-Martinez, J.L., Keith, B., Bonner, B.A., Stafford, A.E., and Rappaport, L. (1987). Phytochrome Regulation of the Response to Exogenous Gibberellins by Epicotyls of *Vigna sinensis*. *Plant Physiol* 85, 212-216.
- Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M., and Hofte, H. (1997). Cellular basis of hypocotyl growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol* 114, 295-305.
- Gil, P., and 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, 1678-1686.
- Gil, P., and Green, P.J. (1997). Regulatory activity exerted by the SAUR-AC1 promoter region in transgenic plants. *Plant molecular biology* 34, 803-808.
- Gil, P., Liu, Y., Orbovic, V., Verkamp, E., Poff, K.L., and Green, P.J. (1994). Characterization of the auxin-inducible SAUR-AC1 gene for use as a molecular genetic tool in Arabidopsis. *Plant Physiol* 104, 777-784.
- Goda, H., Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y., and Yoshida, S. (2004). Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* 134, 1555-1573.
- Gonzalez-Garcia, M.P., Vilarrasa-Blasi, J., Zhiponova, M., Divol, F., Mora-Garcia, S., Russinova, E., and Cano-Delgado, A.I. (2011). Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development* 138, 849-859.
- Gray, W.M., del Pozo, J.C., Walker, L., Hobbie, L., Risseuw, E., Banks, T., Crosby, W.L., Yang, M., Ma, H., and Estelle, M. (1999). Identification of an SCF ubiquitin–ligase complex required for auxin response in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev* 13, 1678-1691.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., and Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414, 271-276.
- Gray, W.M., Ostin, A., Sandberg, G., Romano, C.P., and Estelle, M. (1998). High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7197-7202.
- Grigg, S.P., Canales, C., Hay, A., and Tsiantis, M. (2005). SERRATE coordinates shoot meristem function and leaf axial patterning in Arabidopsis. *Nature* 437, 1022-1026.
- Guan, X.Y., Li, Q.J., Shan, C.M., Wang, S., Mao, Y.B., Wang, L.J., and Chen, X.Y. (2008). The HD-Zip IV gene GaHOX1 from cotton is a functional homologue of the Arabidopsis GLABRA2. *Physiol Plant* 134, 174-182.
- Halliday, K.J. (2004). Plant hormones: the interplay of brassinosteroids and auxin. *Curr Biol* 14, R1008-1010.
- Halliday, K.J., and Fankhauser, C. (2003). Phytochrome-hormonal signaling networks. *New Phytologist*, 449-463.

- Halliday, K.J., and Fankhauser, C. (2003). Phytochrome-hormonal signalling networks. *New Phytologist* 157, 449-463.
- Halliday, K.J., Thomas, B., and Whitelam, G.C. (1997). Expression of heterologous phytochromes A, B or C in transgenic tobacco plants alters vegetative development and flowering time. *Plant J* 12, 1079-1090.
- Hardtke, C.S. (2007). Transcriptional auxin-brassinosteroid crosstalk: who's talking? *Bioessays* 29, 1115-1123.
- Hardtke, C.S., Dorcey, E., Osmont, K.S., and Sibout, R. (2007). Phytohormone collaboration: zooming in on auxin-brassinosteroid interactions. *Trends in cell biology* 17, 485-492.
- Harmer, S.L. (2009). The circadian system in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 60, 357-377.
- He, J.X., Gendron, J.M., Sun, Y., Gampala, S.S., Gendron, N., Sun, C.Q., and Wang, Z.Y. (2005). BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* 307, 1634-1638.
- Hennig, L., Stoddart, W.M., Dieterle, M., Whitelam, G.C., and Schafer, E. (2002). Phytochrome E controls light-induced germination of Arabidopsis. *Plant Physiol* 128, 194-200.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., and Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic acids research* 27, 297-300.
- Hiltbrunner, A., Tscheuschler, A., Viczian, A., Kunkel, T., Kircher, S., and Schafer, E. (2006). FHY1 and FHL act together to mediate nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor. *Plant Cell Physiol* 47, 1023-1034.
- Hornitschek, P., Kohnen, M.V., Lorrain, S., Rougemont, J., Ljung, K., López-Vidriero, I., Franco-Zorrilla, J.M., Solano, R., Trevisan, M., Pradervand, S., *et al.* (2012). Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. *The Plant Journal*, no-no.
- Hornitschek, P., Lorrain, S., Zoete, V., Michielin, O., and Fankhauser, C. (2009). Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. *Embo J* 28, 3893-3902.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., and Zimmermann, P. (2008). Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics* 2008, 420747.
- Hu, Y., Wang, Z., Wang, Y., Bao, F., Li, N., Peng, Z., and Li, J. (2001). Identification of brassinosteroid responsive genes in Arabidopsis by cDNA array. *Sci China C Life Sci* 44, 637-643.
- Huq, E., Al-Sady, B., Hudson, M., Kim, C., Apel, K., and Quail, P.H. (2004). PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science* 305, 1937-1941.
- Huq, E., Al-Sady, B., and Quail, P.H. (2003). Nuclear translocation of the photoreceptor phytochrome B is necessary for its biological function in seedling photomorphogenesis. *Plant J* 35, 660-664.
- Huq, E., and Quail, P.H. (2002). PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in Arabidopsis. *Embo J* 21, 2441-2450.

- Jenkins, G.I. (2009). Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annu Rev Plant Biol* 60, 407-431.
- Jiao, Y., Lau, O.S., and Deng, X.W. (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet* 8, 217-230.
- Jordan, E.T., Marita, J.M., Clough, R.C., and Vierstra, R.D. (1997). Characterization of regions within the N-terminal 6-kilodalton domain of phytochrome A that modulate its biological activity. *Plant Physiol* 115, 693-704.
- Josse, E.M., Foreman, J., and Halliday, K.J. (2008). Paths through the phytochrome network. *Plant, cell & environment* 31, 667-678.
- Kang, B., Grancher, N., Koyffmann, V., Lardemer, D., Burney, S., and Ahmad, M. (2008). Multiple interactions between cryptochrome and phototropin blue-light signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 227, 1091-1099.
- Kanyuka, K., Praekelt, U., Franklin, K.A., Billingham, O.E., Hooley, R., Whitlam, G.C., and Halliday, K.J. (2003). Mutations in the huge *Arabidopsis* gene BIG affect a range of hormone and light responses. *Plant J* 35, 57-70.
- Karniol, B., Wagner, J.R., Walker, J.M., and Vierstra, R.D. (2005). Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. *Biochem J* 392, 103-116.
- Khanna, R., Huq, E., Kikis, E.A., Al-Sady, B., Lanzatella, C., and 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*.
- Kim, J.I., Shen, Y., Han, Y.J., Park, J.E., Kirchenbauer, D., Soh, M.S., Nagy, F., Schafer, E., and Song, P.S. (2004). Phytochrome phosphorylation modulates light signaling by influencing the protein-protein interaction. *Plant Cell* 16, 2629-2640.
- Koini, M.A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C.A., Harberd, N.P., Whitlam, G.C., and Franklin, K.A. (2009). High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Curr Biol* 19, 408-413.
- Kurepin, L.V., Farrow, S., Walton, L.J., Emery, R.J.N., Pharis, R.P., and Chinnappa, C.C. (2012). Phenotypic plasticity of sun and shade ecotypes of *Stellaria longipes* in response to light quality signaling: Cytokinins. *Environmental and Experimental Botany* 84, 25-32.
- Leivar, P., Monte, E., Al-Sady, B., Carle, C., Storer, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Quail, P.H. (2008). The *Arabidopsis* phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *Plant Cell* 20, 337-352.
- Li, J., and Chory, J. (1999). Brassinosteroid action in plants. *J Exp Bot* 50, 275-282.
- Li, J., Li, G., Wang, H., and Wang Deng, X. (2011). Phytochrome Signaling Mechanisms. *The Arabidopsis Book*, e0148.
- Li, L., and Deng, X.W. (2005). It runs in the family: regulation of brassinosteroid signaling by the BZR1–BES1 class of transcription factors. *Trends Plant Sci* 10, 266-268.
- Li, L., Ljung, K., Breton, G., Schmitz, R.J., Pruneda-Paz, J., Cowing-Zitron, C., Cole, B.J., Ivans, L.J., Pedmale, U.V., Jung, H.S., *et al.* (2012). Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture. *Genes Dev* 26, 785-790.

- Li, L., Yu, X., Thompson, A., Guo, M., Yoshida, S., Asami, T., Chory, J., and Yin, Y. (2009). Arabidopsis MYB30 is a direct target of BES1 and cooperates with BES1 to regulate brassinosteroid-induced gene expression. *Plant J* 58, 275-286.
- Li, Q.H., and Yang, H.Q. (2007). Cryptochrome signaling in plants. *Photochemistry and photobiology* 83, 94-101.
- Liu, Z., Zhang, Y., Liu, R., Hao, H., Wang, Z., and Bi, Y. (2011). Phytochrome interacting factors (PIFs) are essential regulators for sucrose-induced hypocotyl elongation in Arabidopsis. *J Plant Physiol* 168, 1771-1779.
- Lopez-Juez, E., Kobayashi, M., Sakurai, A., Kamiya, Y., and Kendrick, R.E. (1995). Phytochrome, Gibberellins, and Hypocotyl Growth (A Study Using the Cucumber (*Cucumis sativus* L.) long hypocotyl Mutant). *Plant Physiol* 107, 131-140.
- Lorrain, S., Allen, T., Duek, P.D., Whitelam, G.C., and Fankhauser, C. (2008). Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *Plant J* 53, 312-323.
- Luccioni, L.G., Oliverio, K.A., Yanovsky, M.J., Boccalandro, H.E., and Casal, J.J. (2002). Brassinosteroid mutants uncover fine tuning of phytochrome signaling. *Plant Physiol* 128, 173-181.
- Ma, L., Li, J., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H., and Deng, X.W. (2001). Light control of Arabidopsis development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* 13, 2589-2607.
- Ma, L., Sun, N., Liu, X., Jiao, Y., Zhao, H., and Deng, X.W. (2005). Organ-specific expression of Arabidopsis genome during development. *Plant Physiol* 138, 80-91.
- Ma, L., Zhao, H., and 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, 969-981.
- Mancinelli, A. (1994). The physiology of phytochrome action. In *Photomorphogenesis in plants*, K.R.a.K. GHM, ed. (Amsterdam, Kluwer Academic Publishers), pp. 211-269.
- Martinez-Garcia, J.F., Galstyan, A., Salla-Martret, M., Cifuentes-Esquivel, N., Gallemí, M., and Bou-Torrent, J. (2010). Regulatory components of shade avoidance syndrome. *Advances in Botanical Research* 53, 65-116.
- Martínez-García, J.F., Galstyan, A., Salla-Martret, M., Cifuentes-Esquivel, N., Gallemí, M., and Bou-Torrent, J. (2010). Regulatory Components of Shade Avoidance Syndrome. In *Advances in Botanical Research*, K. Jean-Claude, and D. Michel, eds. (Academic Press), pp. 65-116.
- Martinez-Garcia, J.F., Huq, E., and Quail, P.H. (2000). Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288, 859-863.
- Martinez-Garcia, J.F., Santes, C.M., and Garcia-Martinez, J.L. (2000). The end-of-day far-red irradiation increases gibberellin A1 content in cowpea (*Vigna sinensis* L.) by reducing its inactivation. *Physiologia Plantarum* 108, 426-434.
- Martinez-Garcia, J.F., Virgos-Soler, A., and Prat, S. (2002). Control of photoperiod-regulated tuberization in potato by the Arabidopsis flowering-time gene CONSTANS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15211-15216.

Mas, P. (2008). Circadian clock function in *Arabidopsis thaliana*: time beyond transcription. *Trends in cell biology* 18, 273-281.

Mathews, S., and Sharrock, R.A. (1997). Phytochrome gene diversity. *Plant, cell & environment* 20, 666-671.

Matsushita, T., Mochizuki, N., and Nagatani, A. (2003). Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature* 424, 571-574.

McConnell, J.R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J., and Barton, M.K. (2001). Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. *Nature* 411, 709-713.

Michael, T.P., Mockler, T.C., Breton, G., McEntee, C., Byer, A., Trout, J.D., Hazen, S.P., Shen, R., Priest, H.D., Sullivan, C.M., *et al.* (2008). Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. *PLoS Genet* 4, e14.

Millar, A.J., Straume, M., Chory, J., Chua, N.H., and Kay, S.A. (1995). The regulation of circadian period by phototransduction pathways in *Arabidopsis*. *Science* 267, 1163-1166.

Monte, E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Zhang, Y., Li, X., Young, J., Austin-Phillips, S., and Quail, P.H. (2003). Isolation and characterization of phyC mutants in *Arabidopsis* reveals complex crosstalk between phytochrome signaling pathways. *Plant Cell* 15, 1962-1980.

Montgomery, B.L. (2008). Right place, right time: Spatiotemporal light regulation of plant growth and development. *Plant signaling & behavior* 3, 1053-1060.

Montgomery, B.L., and Lagarias, J.C. (2002). Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci* 7, 357-366.

Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.H., Liu, Y.X., Hwang, I., Jones, T., and Sheen, J. (2003). Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300, 332-336.

Morelli, G., and Ruberti, I. (2000). Shade avoidance responses. Driving auxin along lateral routes. *Plant Physiol* 122, 621-626.

Morelli, G., and Ruberti, I. (2002). Light and shade in the photocontrol of *Arabidopsis* growth. *Trends Plant Sci* 7, 399-404.

Morgan, D.C., O'Brien, T., and Smith, H. (1980). Rapid photomodulation of stem extension in light grown *Sinapis alba* L. Studies on kinetics, site of perception and photoreceptor. *Planta* 150, 95-101.

Mukherjee, K., and Burglin, T.R. (2006). MEKHLA, a novel domain with similarity to PAS domains, is fused to plant homeodomain-leucine zipper III proteins. *Plant Physiol* 140, 1142-1150.

Nakamura, A., Higuchi, K., Goda, H., Fujiwara, M.T., Sawa, S., Koshiba, T., Shimada, Y., and Yoshida, S. (2003). Brassinolide induces IAA5, IAA19, and DR5, a synthetic auxin response element in *Arabidopsis*, implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signaling. *Plant Physiol* 133, 1843-1853.

Neff, M.M., and Chory, J. (1998). Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during *Arabidopsis* development. *Plant Physiol* 118, 27-35.

- Neff, M.M., Fankhauser, C., and Chory, J. (2000). Light: an indicator of time and place. *Genes Dev* 14, 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., *et al.* (1999). BAS1: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15316-15323.
- Nemhauser, J.L. (2008). Dawning of a new era: photomorphogenesis as an integrated molecular network. *Curr Opin Plant Biol* 11, 4-8.
- Nemhauser, J.L., Hong, F., and Chory, J. (2006). Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* 126, 467-475.
- Nemhauser, J.L., Mockler, T.C., and Chory, J. (2004). Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis. *PLoS Biol* 2, E258.
- Ni, M., Tepperman, J.M., and 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, 657-667.
- Niwa, Y., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2009). The circadian clock regulates the photoperiodic response of hypocotyl elongation through a coincidence mechanism in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* 50, 838-854.
- Nozue, K., Covington, M.F., Duek, P.D., Lorrain, S., Fankhauser, C., Harmer, S.L., and Maloof, J.N. (2007). Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* 448, 358-361.
- Ohgishi, M., Oka, A., Morelli, G., Ruberti, I., and Aoyama, T. (2001). Negative autoregulation of the Arabidopsis homeobox gene ATHB-2. *Plant J* 25, 389-398.
- Otsuga, D., DeGuzman, B., Prigge, M.J., Drews, G.N., and Clark, S.E. (2001). REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant J* 25, 223-236.
- Palena, C.M., Tron, A.E., Bertocini, C.W., Gonzalez, D.H., and Chan, R.L. (2001). Positively charged residues at the N-terminal arm of the homeodomain are required for efficient DNA binding by homeodomain-leucine zipper proteins. *Journal of molecular biology* 308, 39-47.
- Park, J.-E., Kim, Y.-S., Yoon, H.-K., and Park, C.-M. (2007). Functional characterization of a small auxin-up RNA gene in apical hook development in Arabidopsis. *Plant Science* 172, 150-157.
- Parks, B.M., and Quail, P.H. (1993). hy8, a new class of arabidopsis long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *Plant Cell* 5, 39-48.
- Pedmale, U.V., and Liscum, E. (2007). Regulation of phototropic signaling in Arabidopsis via phosphorylation state changes in the phototropin 1-interacting protein NPH3. *J Biol Chem* 282, 19992-20001.
- Petersson, S.V., Johansson, A.I., Kowalczyk, M., Makoveychuk, A., Wang, J.Y., Moritz, T., Grebe, M., Benfey, P.N., Sandberg, G., and Ljung, K. (2009). An Auxin Gradient and Maximum in the Arabidopsis Root Apex Shown by High-Resolution Cell-Specific Analysis of IAA Distribution and Synthesis. *Plant Cell* 21, 1659-1668.
- Pierik, R., Cuppens, M.L., Voeselek, L.A., and Visser, E.J. (2004). Interactions between ethylene and gibberellins in phytochrome-mediated shade avoidance responses in tobacco. *Plant Physiol* 136, 2928-2936.

- Pierik, R., Djakovic-Petrovic, T., Keuskamp, D.H., de Wit, M., and Voesenek, L.A. (2009). Auxin and ethylene regulate elongation responses to neighbor proximity signals independent of gibberellin and della proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* *149*, 1701-1712.
- Pierik, R., Voesenek, L.A., de Kroon, H., and Visser, E.J. (2004). Density-induced plant size reduction and size inequalities in ethylene-sensing and ethylene-insensitive tobacco. *Plant Biol (Stuttg)* *6*, 201-205.
- Pierik, R., Whitelam, G.C., Voesenek, L.A., de Kroon, H., and 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*, 310-319.
- Ponting, C.P., and Aravind, L. (1999). START: a lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins. *Trends in Biochemical Sciences* *24*, 130-132.
- Pratt, L.H. (1994). Distribution and localization of phytochrome within the plant. *Photomorphogenesis in plants*.
- Prigge, M.J., Otsuga, D., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Drews, G.N., and Clark, S.E. (2005). Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* *17*, 61-76.
- Quail, P.H. (2002). Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr Opin Cell Biol* *14*, 180-188.
- Quail, P.H. (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 85-93.
- Reed, J.W. (1999). Phytochromes are Pr-iptetic kinases. *Curr Opin Plant Biol* *2*, 393-397.
- Reed, J.W., Foster, K.R., Morgan, P.W., and Chory, J. (1996). Phytochrome B affects responsiveness to gibberellins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* *112*, 337-342.
- Reed, J.W., Nagatani, A., Elich, T.D., Fagan, M., and Chory, J. (1994). Phytochrome A and Phytochrome B Have Overlapping but Distinct Functions in *Arabidopsis* Development. *Plant Physiol* *104*, 1139-1149.
- Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., Furuya, M., and Chory, J. (1993). Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* *5*, 147-157.
- Rizzini, L., Favory, J.J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schafer, E., Nagy, F., Jenkins, G.I., *et al.* (2011). Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein. *Science* *332*, 103-106.
- Rockwell, N.C., Su, Y.S., and Lagarias, J.C. (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* *57*, 837-858.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* *234*, 364-368.
- 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*, 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, 4756-4767.
- Rolland, F., and Sheen, J. (2005). Sugar sensing and signalling networks in plants. *Biochem Soc Trans* 33, 269-271.
- Rueda, E.C., Dezar, C.A., Gonzalez, D.H., and Chan, R.L. (2005). Hahb-10, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is regulated by light quality and quantity, and promotes early flowering when expressed in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 46, 1954-1963.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., *et al.* (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* 99, 463-472.
- Salisbury, F.J., Hall, A., Grierson, C.S., and Halliday, K.J. (2007). Phytochrome coordinates Arabidopsis shoot and root development. *Plant J* 50, 429-438.
- Salter, M.G., Franklin, K.A., and Whitelam, G.C. (2003). Gating of the rapid shade-avoidance response by the circadian clock in plants. *Nature* 426, 680-683.
- Satter, R.L., and Galston, A.W. (1981). Mechanisms of control of leaf movements. *Ann Rev Plant Physiol* 32, 83-110.
- Sawa, S., Ohgishi, M., Goda, H., Higuchi, K., Shimada, Y., Yoshida, S., and 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, 1011-1022.
- Schafer, E., and Nagy, F. (2006). Photomorphogenesis in plants and bacteria. Function and signal transduction mechanisms, 3rd edn (Dordrecht, Springer).
- Schena, M., Lloyd, A.M., and Davis, R.W. (1993). The HAT4 gene of Arabidopsis encodes a developmental regulator. *Genes Dev* 7, 367-379.
- Schmidt, M., and Schneider-Poetsch, H.A. (2002). The evolution of gymnosperms redrawn by phytochrome genes: the Gnetatae appear at the base of the gymnosperms. *J Mol Evol* 54, 715-724.
- Schrack, K., Nguyen, D., Karlowski, W.M., and Mayer, K.F. (2004). START lipid/sterol-binding domains are amplified in plants and are predominantly associated with homeodomain transcription factors. *Genome Biol* 5, R41.
- Schwechheimer, C., and Deng, X.W. (2000). The COP/DET/FUS proteins-regulators of eukaryotic growth and development. *Semin Cell Dev Biol* 11, 495-503.
- Sessa, G., Carabelli, M., and Ruberti, I. (1994). Identification of distinct families of HD-Zip proteins in Arabidopsis thaliana. , Vol 412-426 (Berlin, Springer-Verlag).
- Sessa, G., Carabelli, M., Sassi, M., Ciolfi, A., Possenti, M., Mittempergher, F., Becker, J., Morelli, G., and Ruberti, I. (2005). A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in Arabidopsis. *Genes Dev* 19, 2811-2815.
- Sessa, G., Morelli, G., and Ruberti, I. (1993). The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *Embo J* 12, 3507-3517.
- Sessa, G., Morelli, G., and Ruberti, I. (1997). DNA-binding specificity of the homeodomain-leucine zipper domain. *Journal of molecular biology* 274, 303-309.

- Sessa, G., Steindler, C., Morelli, G., and Ruberti, I. (1998). The Arabidopsis Athb-8, -9 and -14 genes are members of a small gene family coding for highly related HD-ZIP proteins. *Plant molecular biology* *38*, 609-622.
- Sharrock, R.A., and Mathews, S. (2006). *Phytochrome genes in higher plants: structure, expression, and evolution.* (Dordrecht, The Netherlands, Springer).
- Shen, H., Zhu, L., Castillon, A., Majee, M., Downie, B., and Huq, E. (2008). Light-induced phosphorylation and degradation of the negative regulator PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 from Arabidopsis depend upon its direct physical interactions with photoactivated phytochromes. *Plant Cell* *20*, 1586-1602.
- Shin, J., Park, E., and Choi, G. (2007). PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in Arabidopsis. *Plant J* *49*, 981-994.
- Shin, R., Burch, A.Y., Huppert, K.A., Tiwari, S.B., Murphy, A.S., Guilfoyle, T.J., and Schachtman, D.P. (2007). The Arabidopsis transcription factor MYB77 modulates auxin signal transduction. *Plant Cell* *19*, 2440-2453.
- Shinomura, T., Uchida, K., and Furuya, M. (2000). Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high-irradiance response of hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Plant Physiol* *122*, 147-156.
- Song, P.S. (1999). Inter-domain signal transmission within phytochromes. *J Biochem Mol Biol* *32*, 215-225.
- Sorin, C., Salla-Martret, M., Bou-Torrent, J., Roig-Villanova, I., and Martinez-Garcia, J.F. (2009). ATHB4, a regulator of shade avoidance, modulates hormone response in Arabidopsis seedlings. *Plant J.*
- Spartz, A.K., Lee, S.H., Wenger, J.P., Gonzalez, N., Itoh, H., Inzé, D., Peer, W.A., Murphy, A.S., Overvoorde, P.J., and Gray, W.M. (2012). The SAUR19 subfamily of SMALL AUXIN UP RNA genes promote cell expansion. *The Plant Journal* *70*, 978-990.
- Stavang, J.A., Gallego-Bartolome, J., Gomez, M.D., Yoshida, S., Asami, T., Olsen, J.E., Garcia-Martinez, J.L., Alabadi, D., and Blazquez, M.A. (2009). Hormonal regulation of temperature-induced growth in Arabidopsis. *Plant J.*
- Steindler, C., Matteucci, A., Sessa, G., Weimar, T., Ohgishi, M., Aoyama, T., Morelli, G., and Ruberti, I. (1999). Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development* *126*, 4235-4245.
- Suesslin, C., and Frohnmeyer, H. (2003). An Arabidopsis mutant defective in UV-B light-mediated responses. *Plant J* *33*, 591-601.
- Sun, Y., Fan, X.Y., Cao, D.M., Tang, W., He, K., Zhu, J.Y., He, J.X., Bai, M.Y., Zhu, S., Oh, E., *et al.* (2010). Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in Arabidopsis. *Dev Cell* *19*, 765-777.
- Swain, S.M., and Singh, D.P. (2005). Tall tales from sly dwarves: novel functions of gibberellins in plant development. *Trends Plant Sci* *10*, 123-129.
- Szemenyei, H., Hannon, M., and Long, J.A. (2008). TOPLESS Mediates Auxin-Dependent Transcriptional Repression During Arabidopsis Embryogenesis. *Science* *319*, 1384-1386.

- Tao, Y., Ferrer, J.L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J.A., Li, L., Moreno, J.E., Bowman, M.E., Ivans, L.J., *et al.* (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* *133*, 164-176.
- Taylor, B.L., and Zhulin, I.B. (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* *63*, 479-506.
- Tepperman, J.M., Hwang, Y.S., and Quail, P.H. (2006). phyA dominates in transduction of red-light signals to rapidly responding genes at the initiation of Arabidopsis seedling de-etiolation. *Plant J.*
- Thiele, A., Herold, M., Lenk, I., Quail, P.H., and Gatz, C. (1999). Heterologous expression of Arabidopsis phytochrome B in transgenic potato influences photosynthetic performance and tuber development. *Plant Physiol* *120*, 73-82.
- Tiwari, S.B., Wang, X.-J., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (2001). AUX/IAA Proteins Are Active Repressors, and Their Stability and Activity Are Modulated by Auxin. *The Plant Cell Online* *13*, 2809-2822.
- Tokutomi, S., Matsuoka, D., and Zikihara, K. (2008). Molecular structure and regulation of phototropin kinase by blue light. *Biochim Biophys Acta* *1784*, 133-142.
- Tron, A.E., Bertoncini, C.W., Chan, R.L., and Gonzalez, D.H. (2002). Redox regulation of plant homeodomain transcription factors. *J Biol Chem* *277*, 34800-34807.
- Tron, A.E., Bertoncini, C.W., Palena, C.M., Chan, R.L., and Gonzalez, D.H. (2001). Combinatorial interactions of two amino acids with a single base pair define target site specificity in plant dimeric homeodomain proteins. *Nucleic acids research* *29*, 4866-4872.
- Tron, A.E., Welchen, E., and Gonzalez, D.H. (2004). Engineering the loop region of a homeodomain-leucine zipper protein promotes efficient binding to a monomeric DNA binding site. *Biochemistry* *43*, 15845-15851.
- Truernit, E., Bauby, H., Dubreucq, B., Grandjean, O., Runions, J., Barthelemy, J., and Palauqui, J.C. (2008). High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of Phloem development and structure in Arabidopsis. *Plant Cell* *20*, 1494-1503.
- Truernit, E., and Palauqui, J.C. (2009). Looking deeper: whole-mount confocal imaging of plant tissue for the accurate study of inner tissue layers. *Plant signaling & behavior* *4*, 151-152.
- Truernit E, B.H., Dubreucq B, Grandjean O, Runions J, Barthélémy J, Palauqui JC. (2008). High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of Phloem development and structure in Arabidopsis. *Plant Cell*.
- Turck, F., Fornara, F., and Coupland, G. (2008). Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annu Rev Plant Biol* *59*, 573-594.
- Turk, E.M., Fujioka, S., Seto, H., Shimada, Y., Takatsuto, S., Yoshida, S., Denzel, M.A., Torres, Q.I., and Neff, M.M. (2003). CYP72B1 inactivates brassinosteroid hormones: an intersection between photomorphogenesis and plant steroid signal transduction. *Plant Physiol* *133*, 1643-1653.
- Turk, E.M., Fujioka, S., Seto, H., Shimada, Y., Takatsuto, S., Yoshida, S., Wang, H., Torres, Q.I., Ward, J.M., Murthy, G., *et al.* (2005). BAS1 and SOB7 act redundantly to modulate Arabidopsis photomorphogenesis via unique brassinosteroid inactivation mechanisms. *Plant J* *42*, 23-34.

- Ulmasov, T., Liu, Z.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1995). Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell* 7, 1611-1623.
- Vandenbussche, F., Pierik, R., Millenaar, F.F., Voeseenek, L.A., and Van Der Straeten, D. (2005). Reaching out of the shade. *Curr Opin Plant Biol.*
- Vanneste, S., and Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136, 1005-1016.
- Vert, G., Nemhauser, J.L., Geldner, N., Hong, F., and Chory, J. (2005). Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annual review of cell and developmental biology* 21, 177-201.
- Vert, G., Walcher, C.L., Chory, J., and Nemhauser, J.L. (2008). Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9829-9834.
- Walcher, C.L., and Nemhauser, J.L. (2012). Bipartite promoter element required for auxin response. *Plant Physiol* 158, 273-282.
- Wang, H., and Deng, X.W. (2003). Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants. *Trends Plant Sci* 8, 172-178.
- Wang, Z.Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., Yang, Y., Fujioka, S., Yoshida, S., Asami, T., *et al.* (2002). Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell* 2, 505-513.
- Weijers, D., and Friml, J. (2009). SnapShot: Auxin Signaling and Transport. *Cell* 136, 1172-1172.e1171.
- Weinig, C. (2000). Limits to adaptive plasticity: temperature and photoperiod influence shade-avoidance responses. *American journal of botany* 87, 1660-1668.
- Whitelam, G.C., Johnson, E., Peng, J., Carol, P., Anderson, M.L., Cowl, J.S., and Harberd, N.P. (1993). Phytochrome A null mutants of Arabidopsis display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell* 5, 757-768.
- Whitelam, G.C., Patel, S., and Devlin, P.F. (1998). Phytochromes and photomorphogenesis in Arabidopsis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353, 1445-1453.
- Wuyts, N., Palauqui, J.C., Conejero, G., Verdeil, J.L., Granier, C., and Massonnet, C. (2009). High-contrast three-dimensional imaging of the Arabidopsis leaf enables the analysis of cell dimensions in the epidermis and mesophyll. *Plant methods* 6, 17.
- Yang, C.J., Zhang, C., Lu, Y.N., Jin, J.Q., and Wang, X.L. (2011). The mechanisms of brassinosteroids' action: from signal transduction to plant development. *Mol Plant* 4, 588-600.
- Yanovsky, M.J., Casal, J.J., and Whitelam, G.C. (1995). Phytochrome A, phytochrome B and HY4 are involved in hypocotyl growth responses to natural radiation in Arabidopsis: Weak de-etiolation of the phyA mutant under dense canopies. *Plant, cell & environment.*
- Yeh, K.C., and Lagarias, J.C. (1998). Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13976-13981.
- Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T., and Chory, J. (2005). A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis. *Cell* 120, 249-259.

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

Yu, X., Liu, H., Klejnot, J., and Lin, C. (2010). The Cryptochrome Blue Light Receptors. *Arabidopsis Book* *8*, e0135.

Zhang, Y., Liu, Z., Wang, L., Zheng, S., Xie, J., and Bi, Y. (2010). Sucrose-induced hypocotyl elongation of *Arabidopsis* seedlings in darkness depends on the presence of gibberellins. *J Plant Physiol* *167*, 1130-1136.

Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W. (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* *136*, 2621-2632.

Portada

Imatges de microscòpia confocal d'un tall transversal de cotilèdon de Col-0 (imatge central) i d'*athb4hat3* (imatge inferior a la dreta) en dia 1.

Contraportada

De superior a inferior: Imatge d'una plàntula Col-0 en dia 7 seguida per una imatge de microscòpia electrònica de rastreig de fulles primàries de Col-0 en dia 5; ídem d'*athb4hat3*.

