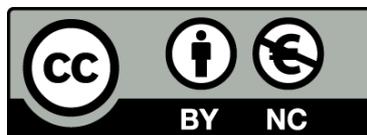




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Regulación de las respuestas a la proximidad vegetal en *Arabidopsis thaliana* y especies afines

María José Molina Contreras



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0. Spain License.**

Regulación de las respuestas a la
proximidad vegetal en *Arabidopsis thaliana*
y especies afines.

María José Molina-Contreras



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

**Regulación de las respuestas a la proximidad vegetal en
Arabidopsis thaliana y especies afines.**

María José Molina Contreras,
2017



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y DE CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN.

PROGRAMA DE DOCTORADO: BIOTECNOLOGÍA

Regulación de las respuestas a la proximidad vegetal en *Arabidopsis thaliana* y especies afines.

Memoria presentada por María José Molina Contreras para optar al título de doctor por la Universidad de Barcelona.

El director de la tesis:

Dr. Jaime F. Martínez-García
Dra. Irma Roig Villanova

El tutor:

Dr. Albert Ferrer Prats

La candidata a doctor:

María José
Molina Contreras

María José Molina Contreras
2017

A mi familia por tanto amor

AGRADECIMIENTOS

Siempre he pensado que hay que dar las gracias diariamente, por este motivo intento hacerlo cada día. No obstante recapitular como se consiguió llegar a finalizar de una etapa siempre es algo bonito.

En primer lugar, me gustaría agradecer a Jaume Martínez por darme la oportunidad de poder hacer la tesis en su grupo de investigación y por motivarme a ir a los congresos y estancia (experiencias que cambian la vida). A Jaume e Irma por la codirección, en especial en esta última época, que hemos trabajado a tres bandas codo con codo, gracias por hacer esto posible, os estoy muy agradecida (de todo corazón). Agradecer a todos los miembros del laboratorio del pasado y del presente (contenta me tenéis!!) que participaron directa o indirectamente en este trabajo. Especialmente a M. Belvilaqua y E. Bottenweg, por su participación directa y ayuda científica en el proyecto. A veces no nos damos cuenta pero ir a tomar un café en el tiempo de incubación o una merienda, contribuye a la que felicidad global incrementa y todo es fácil. Gracias por las meriendas, cervezas, fiestas, ha sido genial compartirlo con vosotros. Gracias a los miembros del laboratorio de Dr. A.Graf, por su constante ánimo en los momentos técnicamente difíciles, además por enseñarme que el negro también es un color en el mundo del inmunoblot y continuar creyendo en la magia de la proteómica.

Quiero agradecer a David Caparròs que me diera la oportunidad de iniciarme en el mundo de la ciencia y especialmente al que era su becario de doctorado, entonces, por confiar siempre en mí y animarme a seguir en el mundo de la ciencia. Más tarde incorporaríamos a otro en el club de las discusiones científicas y culinarias. Gracias chicos, no concibo el doctorado sin momentos como el “manitas, manitas”!

No obstante, hubieron momentos muy complicados, por ello, la fundación del rincón del lamento con todos sus integrantes fue básico para la salud emocional. Ese rincón era el lugar donde todos eran piezas claves para solventar las crisis científicas-personales. No obstante, a pesar de que un día se cerró la persiana, en mi recuerdo no concibo, esa época sin aquel lugar. Las penas compartidas, siempre fueron menos penas y las risas más energéticas.

Además, me gustaría agradecer y dedicar unas líneas A LOS QUE...

A los que crecieron durante el doctorado, a los que no conocen su potencial pero alguien lo descubre y le recuerda lo que valen, a los que se forjan cada día con el esfuerzo y sacrificio constante de su trabajo. A los que hacen que todo fluya bien. A los que se ofrecen a tomar cervezas tras el día como terapia. A los que siguen creyendo en los unicornios. A los que compartieron conmigo risas y lágrimas de alegría, de tristeza, de ansiedad y de miedo. A los que hicieron que me emocionara con sus regalos de cumpleaños. A los que te abrazaban por el pasillo y te decían que les alegrabas el día. A los que te trían tartas y desayunos sin necesidad de que fuera un día especial, así convertirlo en uno de ellos. A los que participaron en el Secret Santa y la Happy Hour. A los primos-hermanos por tanto apoyo, alegría, fiestas y bromas, sois los mejores. A los que siempre escucharon tus historias científicas a pesar de no entender de qué hablabas ni que decías y siempre tuvieron palabras de apoyo. A los que enseñaste a posar en las fotos en su primer San Juan. A los que compartimos los secretos del Y2H. A los amigos que hice en los congresos y estancias. A los que te envían audios de 9 min. explicándote la vida. A los que estén donde estén se acuerdan de ti. A los que no importa cuánto tiempo hace que no vais a tomar una “tapillas” (que acababan en Kharma) pero siguen estando ahí.

A los miembros de los servicios del CRAG, que están formados por personas fantásticas siempre dispuestas a abrazarte y darte una palabra de ánimo.

A los que no se ofenden por no nombrarlos directamente y saben que los quiero igual o más.

Y finalizo con mi familia, pieza fundamental de que esta tesis haya visto la luz por el apoyo incondicional, por el amor que proporcionáis, por la obra de crowdfunding que habéis hecho en esta última etapa para que tuviera más fácil el poder comer y pudiera focalizar en la escritura de la tesis. Sois el mejor pilar que una persona pueda tener, gracias.

Y a ti, por hacerme creer en que se puede querer en lo que ves, que la vida es demasiado corta como para no vivir “el aquí y el ahora” y que existen nuevas especies sin clasificar.

RESUMEN

El síndrome de huida de la sombra (*Shade Avoidance Syndrome*, SAS) se refiere al conjunto de respuestas de las plantas desencadenadas por la detección de la disminución de la razón entre luz roja (R) y roja lejana (FR) de la radiación incidente (razón R:FR). Esta razón, que indica la proximidad de vegetación que puede competir por los recursos, es percibida por los fotorreceptores fitocromos y pone en marcha las respuestas del SAS, entre las que se encuentra el aumento del alargamiento del hipocotilo.

Entre los componentes reguladores del SAS en *Arabidopsis thaliana* se encuentra ATHB4, cuya expresión se induce rápidamente tras la percepción de proximidad vegetal. ATHB4 es un factor de transcripción de la familia HD-Zip II que actúa como un represor transcripcional. Resultados previos del laboratorio indicaron que (1) ATHB4 tiene un mecanismo molecular dual, actuando como un cofactor transcripcional en la regulación SAS en la plántula y como un factor de transcripción en el control de la polaridad de las hojas, y (2) el dominio Nt es una región implicada en la interacción con otras proteínas que es necesaria para las dos actividades indicadas de ATHB4. Para profundizar en los mecanismos moleculares de ATHB4, hemos sobreexpresado en plantas transgénicas ATHB4 fusionado al activador transcripcional VP16 (35S:ATHB4-VP16). De estos experimentos se confirmó que ATHB4 actúa como cofactor transcripcional en el control del alargamiento del hipocotilo en respuesta a la proximidad vegetal, mientras que actúa como factor de transcripción en la regulación de la polaridad foliar. Por otro lado, realizamos dos aproximaciones complementarias para identificar interactores del Nt de ATHB4, lo que permitió identificar a TOPLESS (TPL), TPL-RELATED 4 (TPR4), SEUSS (SEU) y SIN3 ASSOCIATED POLYPEPTIDE P18 (SAP18).

En contraste con *A. thaliana*, *Cardamine hirsuta*, un especie filogenéticamente próxima, no responde a la proximidad vegetal alargando sus hipocotilos, es decir, tolera la sombra. Los análisis comparativos de las respuestas a la proximidad vegetal nos llevó a generar plantas de *C. hirsuta* con niveles reducidos de PHYA (35S:RNAi-ChPHYA), que en *A. thaliana* se ha descrito como un regulador negativos del SAS. Las plantas 35S:RNAi-ChPHYA resultaron en plántulas con capacidad de responder a la sombra simulada. En paralelo, realizamos un cribado genético que nos llevó a la identificación y caracterización de plántulas mutantes en *C. hirsuta* con una respuesta a la sombra en hipocotilo restaurada (mutantes *sis*, *slender in shade*). Los dos mutantes eran recesivos y alélicos (*sis1-1* y *sis1-2*) y nos llevaron a determinar que *SIS1* codifica el gen *ChPHYA*. La complementación de plantas deficientes en *phyA* de *A. thaliana* con las construcciones *pPHYA:PHYA* and *pPHYA:SIS1* nos indicó que las proteínas PHYA y SIS1 tienen diferentes actividades. En resumen, nuestros resultados indican que la tolerancia a la sombra en *C. hirsuta* requiere la actividad de *phyA*, que actuaría suprimiendo la respuesta de alargamiento del hipocotilo. En resumen, nuestros resultados indican que la tolerancia a la sombra en *C. hirsuta* requiere mecanismos de supresión, y que *phyA* formaría parte de éstos.

RESULTADOS	23
Capítulo I. Estudio de los mecanismos moleculares de ATHB4 en las respuestas del síndrome de huida de la sombra (SAS)	23
1.1. Análisis de la estructura y función de ATHB4 en la regulación del SAS ..	23
1.2. Identificación y análisis de la relevancia biológica de los interactores vía el N-terminal de ATHB4 en la regulación del SAS.....	31
1.2.1. Búsqueda de interactores de ATHB4 por cribado de doble híbrido (Y2H)	31
1.2.2. Búsqueda de interactores vía el N-terminal de ATHB4 por aproximación proteómica en plantas.....	40
1.3. Función de los motivos EAR de ATHB4	49
Capítulo II. Estudio de los componentes genéticos y mecanismos moleculares que regulan la tolerancia a la proximidad vegetal	57
2.1. Respuestas a la sombra de plántulas de <i>A. thaliana</i> y <i>C. hirsuta</i>	57
2.2. PhyA y la tolerancia a la sombra en <i>C. hirsuta</i>	59
2.3. Estrategias para el análisis comparativo entre especies.....	63
2.3.1. Estrategia directa: Identificación y caracterización de líneas transgénicas de <i>C. hirsuta</i> con niveles reducidos de fitocromo A (phyA) .	63
2.3.2. Estrategia indirecta: Cribado genético para la identificación de mutantes en <i>C. hirsuta</i>	64
2.3.2.1. Análisis genéticos	68
2.3.2.2. Identificación de las mutaciones en <i>sis1</i>	70
2.4. Estudio fisiológico de los mutantes <i>sis1</i>	71
2.4.1. Comparación de las respuestas a la luz entre especies	71
2.5. Complementación de plantas deficientes en <i>phyA</i> de <i>A. thaliana</i> con las construcciones <i>pPHYA:PHYA</i> y <i>pPHYA:SIS1</i>	79
DISCUSIÓN	87
Cuando la estrategia es huir de la proximidad vegetal:	
1.1. Estructura y función de ATHB4 en el síndrome de la huida de la sombra.	87

1.2.	Relevancia biológica de los interactores vía el N-terminal de ATHB4 en la regulación del SAS	90
1.3.	Función de los motivos EAR en ATHB4	92
Tolerancia a la sombra, una estrategia alternativa frente a la proximidad vegetal.		
2.1.	<i>A. thaliana</i> y <i>C. hirsuta</i> , dos plantas modelo para el estudio de estrategias alternativas a la proximidad vegetal	95
2.2.	Complementación de plantas deficientes en phyA de <i>A. thaliana</i>	97
CONCLUSIONES		99
MATERIALES Y MÉTODOS		101
1.	Material bacteriano y levaduras.....	101
1.1.	Cepas de bacterias y levaduras.....	101
1.2.	Condiciones de crecimiento de bacterias y levaduras.....	101
1.3.	Medios de cultivos de bacterias y levaduras	102
1.4.	Resumen de compuestos de selección añadidos a los medios de cultivo bacterianos y de plantas.....	102
2.	Material vegetal	103
2.1.	Líneas transgénicas	103
2.2.	Líneas de ganancia de función cedidas por otros laboratorios.....	103
2.3.	Líneas de pérdida de función por inserción de T-DNA.....	103
2.4.	Cruces	104
2.5.	Condiciones de cultivo en invernadero y fitotrones.....	104
2.6.	Condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	104
2.7.	Medios de cultivo <i>in vitro</i>	104
3.	Plásmidos	105
3.1.	Vectores comerciales o cedidos.....	105
3.2.	Construcciones y transformaciones en planta.....	106
3.3.	Plásmidos cedidos por otros laboratorios	110
3.4.	Oligonucleótidos	111
4.	Metodología	113
4.1.	Técnicas de biología molecular de ácidos nucleicos	113

4.1.1.	Obtención de DNA plasmídico	113
4.1.2.	Reacciones de modificación de DNA.....	113
4.1.3.	Subclonaje de fragmentos de DNA en vectores con el método GATEWAY®	114
4.1.4.	Transformación de células competentes de <i>E.coli</i> por choque térmico	114
4.1.5.	Transformación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> por electroporación	114
4.1.6.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	115
4.1.7.	Separación de DNA en geles de agarosa	115
4.1.8.	Purificación de DNA	116
4.1.9.	Secuenciación de DNA.	116
4.1.10.	Extracción de RNA en planta.	116
4.1.11.	Cuantificación de ácidos nucleicos.	116
4.1.12.	Retrotranscripción.	116
4.1.13.	PCR cuantitativa (<i>Real-time quantitative PCR</i> , RT-qPCR)	116
4.2.	Técnicas de biología molecular de proteínas.....	117
4.2.1.	Obtención de extractos totales proteicos.	117
4.2.2.	Separación electroforética de las proteínas.....	118
4.2.3.	Transferencia de proteínas e inmunodetección	118
4.2.4.	Inmunoprecipitación de proteínas.....	119
4.2.5.	Anticuerpos utilizados.....	121
4.2.6.	Doble híbrido (Y2H)	121
4.3.	Metodología vegetal	123
4.3.1.	Esterilización y siembra de semillas	123
4.3.2.	Transformación de plantas por floral dip.....	124
4.3.3.	Transformación transitoria en <i>N. benthamiana</i> para localización subcelular	124
4.3.4.	Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i> , BiFC)	125

4.3.5.	Extracción rápida de DNA genómico de planta para su genotipado	125
4.3.6.	Genotipado de plantas por PCR	126
4.3.7.	Tratamientos y ensayos en plantas.....	126
4.3.8.	Medidas de los hipocotilos.....	127
4.3.9.	Análisis de fenotipos dependientes de DEX.....	127
4.3.10.	Cuantificación de pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides)	128
4.4.	Análisis Bioinformáticos.....	128
BIBLIOGRAFÍA	131

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura I1	Espectro de la radiación lumínica con los principales fotorreceptores vegetales	2
Figura I2	Fotoequilibrio y espectro de absorción de los fitocromos	4
Figura I3	Estrategias para lidiar con la proximidad vegetal	7
Figura I4	Resumen del análisis estructura-función de <i>ATHB4</i>	17

RESULTADOS

Capítulo I: Estudio de los mecanismos moleculares de *ATHB4* en las respuestas del SAS.

Figura R1.1	Esquema de las diferentes regiones y dominios definidos en <i>ATHB4</i>	23
Figura R1.2	Longitud del hipocotilo de plántulas de <i>A. thaliana</i> que sobreexpresan variantes de <i>ATHB4</i> en respuesta a la sombra simulada	25
Figura R1.3	Comparación de los niveles de <i>ATHB4</i> en plántulas que sobreexpresan <i>ATHB4-VP16</i> y <i>ATHB4-GFP</i> en respuesta a la sombra simulada	26
Figura R1.4	Efecto de la sobreexpresión de <i>ATHB4-VP16</i> y <i>ATHB4-GFP</i> en la expresión de los genes <i>ATHB2</i> , <i>HAT2</i> y <i>OPT1</i> en plántulas de <i>A. thaliana</i> en respuesta a la sombra simulada	27
Figura R1.5	Efecto de la sombra simulada y la sobreexpresión de <i>ATHB4-VP16</i> y <i>ATHB4-GR</i> en el aspecto de las rosetas.....	28
Figura R1.6	Efecto de la sombra simulada y la sobreexpresión de <i>ATHB4-VP16</i> y <i>ATHB4-GR</i> en la polaridad de las hojas	29
Figura R1.7	Comparación de los niveles de <i>ATHB4</i> en hojas de plantas <i>ATHB4-GR</i> y <i>ATHB4-VP16</i> en respuesta a sombra simulada	30
Figura R1.8	Análisis de interacción entre <i>ATHB4</i> y <i>TPL</i>	32
Figura R1.9	Efecto de la sobreexpresión de <i>TPL</i> en la longitud del hipocotilo en respuesta a la sombra simulada.....	33
Figura R1.10	Efecto de la sobreexpresión de <i>TPL</i> en la expresión de los genes <i>ATHB4</i> , <i>ATHB2</i> y <i>SAUR15</i> en respuesta a sombra simulada	34
Figura R1.11	Efecto de la mutación <i>tpl-1</i> en la longitud del hipocotilo en respuesta a la sombra simulada	35
Figura R1.12	Efecto de la mutación de <i>tpl-1</i> en la expresión de los genes <i>ATHB2</i> y <i>SAUR15</i> en respuesta a sombra simulada.....	35

Figura R1.13	Longitud del hipocotilo de plántulas de pérdida de función en <i>TPL</i> y <i>TPR4</i> en respuesta a sombra simulada	36
Figura R1.14	Análisis de interacción entre <i>ATHB4</i> y <i>SEU</i>	38
Figura R1.15	Efecto de la pérdida de función <i>SEU</i> en la longitud del hipocotilo en respuesta a sombra simulada	39
Figura R1.16	Efecto de la pérdida de función <i>SEU</i> en la expresión de <i>PIL1</i> , <i>ATHB2</i> y <i>SAUR15</i> en respuesta a sombra simulada.....	40
Figura R1.17	Comparación de los niveles de expresión de <i>ATHB4-GFP</i> y <i>NtHD-GFP</i>	41
Figura R1.18	Efecto de la sobreexpresión de <i>ATHB4-GFP</i> y <i>NtHD-GFP</i> en el alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra simulada	42
Figura R1.19	Detección de la actividad GFP de <i>ATHB4-GFP</i> y <i>NtHD-GFP</i>	43
Figura R1.20	Esquema de la estrategia de inmunoprecipitación de complejos empleada para detectar interactores de <i>ATHB4</i> vía el dominio N-terminal.....	44
Figura R1.21	Inmunoprecipitación e identificación de complejos proteicos que interactúan con las proteínas GFP, <i>ATHB4-GFP</i> y <i>NtHD-GFP</i>	45
Figura R1.22	Análisis de interacción entre <i>NtATHB4</i> con <i>SAP18</i>	47
Figura R1.23	Análisis de los niveles de <i>SAP18</i> en plántulas de la línea mutante <i>sap18-10</i>	48
Figura R1.24	Efecto de la mutación <i>sap18-10</i> en la longitud del hipocotilo en respuesta a la sombra simulada.....	49
Figura R1.25	Cambios introducidos en los motivos EAR del gen <i>ATHB4</i>	49
Figura R1.26	Análisis de papel de los motivos EAR de <i>ATHB4</i> en la interacción con <i>TPL</i> y <i>SAP18</i>	50
Figura R1.27	Longitud del hipocotilo de plántulas que sobreexpresan <i>ATHB4_{E1+E2m}⁻</i> <i>GR</i> en respuesta a la sombra simulada	51
Figura R1.28	Detección de la proteína <i>ATHB4</i> y $\Delta 142$ <i>ATHB4</i>	53
Figura R1.29	Localización subcelular de <i>ATHB4-GFP</i> , $\Delta 50$ <i>ATHB4-GFP</i> , $\Delta 30$ <i>ATHB4-GFP</i> , <i>ATHB4_{E1+E2m}⁻</i> - <i>GFP</i> en respuesta a la sombra simulada.....	54

Capítulo II. Estudio de los componentes genéticos y mecanismos moleculares que regulan la tolerancia a la proximidad vegetal

Figura R2.1	Longitud del hipocotilo de plántulas de <i>A. thaliana</i> y <i>C. hirsuta</i> en respuesta a sombra simulada	58
--------------------	---	----

Figura R2.2	Acumulación de pigmentos en plántulas de <i>A. thaliana</i> y <i>C. hirsuta</i> en respuesta a sombra simulada	58
Figura R2.3	Longitud del hipocotilo de plántulas de <i>A. thaliana</i> sobreexpresantes de <i>PHYA</i> (AOX) en respuesta a sombra simulada	59
Figura R2.4	Efecto de la sobreexpresión de <i>PHYA</i> sobre la expresión de los genes <i>PIL1</i> y <i>ATHB2</i> en plántulas de <i>A. thaliana</i> en respuesta a sombra simulada	60
Figura R2.5	Alineamiento de las secuencias de cDNA de <i>PHYA</i> de <i>A. thaliana</i> y <i>C. hirsuta</i>	61
Figura R2.6	Niveles de transcrito <i>PHYA</i> y proteína phyA en <i>A. thaliana</i> y <i>C. hirsuta</i> en oscuridad.....	62
Figura R2.7	Niveles de <i>PHYA</i> y phyA en plántulas etioladas de líneas transgénicas <i>RNAi:PHYA</i> de <i>C. hirsuta</i>	63
Figura R2.8	Longitud del hipocotilo de plántulas de líneas transgénicas <i>RNAi:PHYA</i> de <i>C. hirsuta</i> en respuesta a sombra simulada.	64
Figura R2.9	Esquema del cribado genético para la identificación de mutantes de <i>C. hirsuta</i> que evitan la sombra	65
Figura R2.10	Comparación de la respuesta del hipocotilo en los tres mutantes de <i>C. hirsuta</i> seleccionados (M4) a diferentes condiciones de luz.....	67
Figura R2.11	Cruce entre los mutantes (<i>m10</i> y <i>m181</i>) y la línea silvestre (Ox) para el análisis de segregación del fenotipo	68
Figura R2.12	Test de alelismo de los mutantes <i>m10</i> y <i>m181</i>	69
Figura R2.13	Cambios en la secuencia del gen <i>ChPHYA</i> en los mutantes <i>sis1</i>	71
Figura R2.14	Longitud del hipocotilo de plántulas mutantes en <i>PHYA</i> de <i>A. thaliana</i> y <i>C. hirsuta</i> en respuesta a diferentes razones de R:FR.....	72
Figura R2.15	Longitud del hipocotilo de plántulas mutantes en <i>PHYA</i> de <i>A. thaliana</i> y <i>C. hirsuta</i> crecidas en luz monocromática Bc.....	73
Figura R2.16	Longitud del hipocotilo de plántulas mutantes en <i>PHYA</i> de <i>A. thaliana</i> y <i>C. hirsuta</i> crecidas en luz monocromática Rc.....	75
Figura R2.17	Longitud del hipocotilo de plántulas mutantes en <i>PHYA</i> de <i>A. thaliana</i> y <i>C. hirsuta</i> crecidas en luz monocromática FRc.....	76
Figura R2.18	Acumulación de pigmentos en plántulas mutantes para <i>PHYA</i> de <i>A. thaliana</i> y <i>C. hirsuta</i> en respuesta a sombra simulada	77

Figura R2.19	Efecto de la pérdida de función de <i>PHYA</i> en la expresión de los genes <i>PIL1</i> y <i>ATHB2</i> en plántulas de <i>C. hirsuta</i> en respuesta a sombra simulada.	78
Figura R2.20	Alineamiento de las secuencias de la proteína de <i>PHYA</i> de <i>A. thaliana</i> y <i>C. hirsuta</i>	79
Figura R2.21	Construcciones usadas en los ensayos de complementación de plantas mutantes <i>phyA-501</i> de <i>A. thaliana</i>	80
Figura R2.22	Longitud del hipocotilo de plántulas <i>pPHYA:PHYA (phyA-501)</i> crecidas en luz monocromática FRc	80
Figura R2.23	Respuesta del hipocotilo de plántulas <i>pPHYA:PHYA (phyA-501)</i> crecidas en sombra simulada	81
Figura R2.24	Longitud del hipocotilo de plántulas <i>pPHYA:SIS1 (phyA-501)</i> crecidas en luz monocromática FRc	82
Figura R2.25	Respuesta del hipocotilo de plántulas <i>pPHYA:SIS1 (phyA-501)</i> crecidas en sombra simulada	83
Figura R2.26	Correlación entre la expresión de <i>PHYA/SIS1</i> en sombra simulada y oscuridad en plántulas <i>pPHYA:PHYA (phyA-501)</i> y <i>pPHYA:SIS1 (phyA-501)</i>	85
Figura R2.27	Correlación entre la actividad biológica de <i>PHYA/SIS1</i> en la inhibición de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra simulada y sus niveles de expresión en oscuridad	86
Figura R2.28	Correlación entre la actividad biológica de <i>PHYA/SIS1</i> en la inhibición de la respuesta de elongación del hipocotilo y sus niveles de expresión en sombra simulada	86
DISCUSIÓN		
Figura D1.1	Modelo de posible mecanismo de acción de <i>ATHB4-GFP</i> y <i>ATHB4-VP16</i>	89
MATERIALES Y MÉTODOS		
Figura M1	Tratamiento de luz utilizados durante esta tesis	127

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla I1	Diversidad morfológica entre <i>A. thaliana</i> y <i>C. hirsuta</i> 19
----------	--

RESULTADOS

Capítulo I: Estudio de los mecanismos moleculares de ATHB4 en las respuestas del SAS.

Tabla R1.1	Resumen de los resultados obtenidos como posibles interactores de ATHB4 identificados mediante la estrategia Inmunoprecipitación en planta 46
------------	---

Capítulo II. Estudio de los componentes genéticos y mecanismos moleculares que regulan la tolerancia a la proximidad vegetal.

Tabla R2.1	Resumen de los fenotipos analizados de los putativos mutantes de <i>C. hirsuta</i> que evitan la sombra encontrados en el cribado genético 66
------------	---

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla M1	Antibióticos y otros compuestos de selección que se han utilizado en este trabajo con las bacterias: <i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i> y en plantas: <i>A. thaliana</i> , <i>C. hirsuta</i> 102
Tabla M2	Líneas de ganancia de función. 103
Tabla M3	Líneas de pérdida de función. 103
Tabla M4	Cruces realizados y/o utilizados en este trabajo 104
Tabla M5	Vectores comerciales utilizados en este trabajo 105
Tabla M6	Plásmidos y transformaciones utilizadas en esta tesis 106
Tabla M7	Plásmidos cedidos por otros laboratorios utilizados en esta tesis 110
Tabla M8	Oligonucleótidos utilizados en esta tesis. 111

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Importancia de la luz en el desarrollo vegetal.

Para las plantas, la luz tiene un doble papel: es fuente de energía para la fotosíntesis y a la vez proporciona información del entorno que las rodea, ayudándolas a modular su desarrollo. Puesto que las plantas son seres sésiles y no pueden cambiar de hábitat donde crecen, necesitan percibir constantemente el ambiente que las rodea para poder adaptar su crecimiento. La detección y captación de la luz como información se lleva a cabo por un complejo sistema de señales que son integradas y procesadas por receptores lumínicos (fotorreceptores). Los fotorreceptores son responsables de modular múltiples respuestas fisiológicas como la germinación de las semillas, el crecimiento de la plántula, el establecimiento de la arquitectura de la planta adulta, la inducción de la floración o la adaptación a la proximidad vegetal. La plasticidad del desarrollo de las plantas permite que un genotipo pueda dar lugar a una gama de fenotipos dependiendo de las condiciones ambientales (Sultan & Schmitt 2000). Esta plasticidad se sustenta en la capacidad de las plantas de integrar las señales ambientales y sincronizar el crecimiento y el desarrollo, por ej., iniciando el momento de la reproducción en la estación más adecuada. Las respuestas de las plantas que afectan al desarrollo en función de la luz se conocen como **fotomorfogénesis**.

2. La desetiología de las plántulas: un ejemplo de proceso fotomorfogénico.

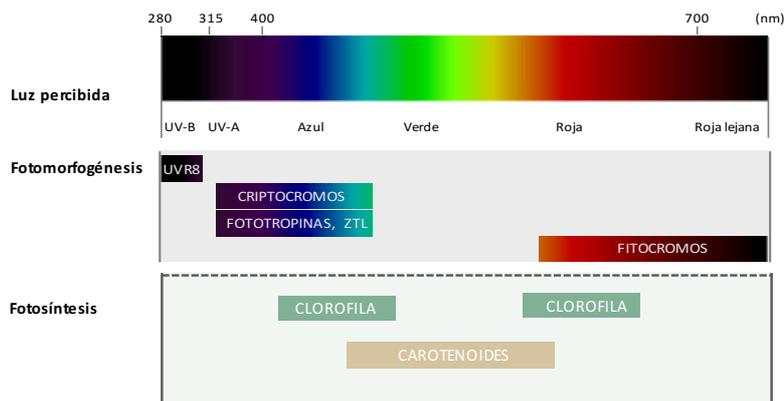
Cuando las condiciones de temperatura, humedad y oxígeno son las adecuadas, las semillas germinan. Tras la germinación las plantas pueden crecer en oscuridad y desarrollarse etioladas (escotomorfogénesis), presentando un hipocotilo alargado, etioplastos (cloroplastos que no han sido expuestos a la luz) y cotiledones cerrados (protegidos por el gancho apical) (Josse & Halliday 2008). Por el contrario, puede suceder que las plantas crezcan en luz y se desarrollen desetiologadas caracterizándose por tener hipocotilos cortos y cotiledones expandidos (desaparición del gancho apical) y los etioplastos transformados en cloroplastos por la producción y acumulación de pigmentos fotosintéticos (Han et al. 2007; Arsovski et al. 2012). Este proceso fotomorfogénico es uno de los más estudiados en plantas y, como se verá a continuación, ha ayudado a identificar fotorreceptores y entender los mecanismos que emplean para regular el desarrollo vegetal.

3. Percepción de luz.

La radiación fotosintéticamente activa o PAR (Photosynthetic Active Radiation) comprende entre los 400-700 nm; no obstante, otras regiones del espectro son también importantes en la regulación del desarrollo vegetal. Para el uso de la luz como señal informativa del entorno, las plantas superiores poseen al menos cinco tipos de fotorreceptores implicados en la percepción de diferentes regiones del espectro solar (**Figura 11 A**), tanto en la región PAR como fuera de ella (Hohm et al. 2013). UVR8 actúa como receptor de luz UltraVioleta-B (UV-B; 280–315 nm), mientras que los criptocromos (CRY1-3), las fototropinas (PHOT1 y 2) y otras proteínas “LOV” miembros de la familia ZTL/FKF1/LKP2 absorben específicamente luz UltraVioleta-A (UV-A: ~315-

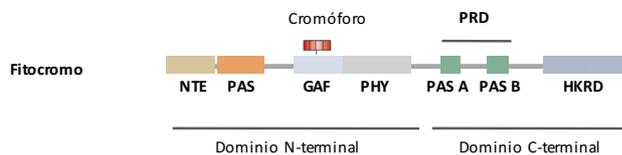
400 nm) y azul (Blue, B; ~400-500 nm); la familia más grande y probablemente mejor caracterizada de fotorreceptores son los fitocromos (PHYA-E) (Figura I1 B), los cuales median las respuestas a luz roja (Red; R: 660nm) y roja lejana (Far Red; FR: 600-750 nm) (Heijde & Ulm 2012). Todos estos fotorreceptores controlan de manera conjunta el desarrollo fotomorfogénico (desetiolación) de las plántulas por medio de complejas redes a partir de la percepción de la cantidad y calidad de luz (Smith 1982; Roig-Villanova et al. 2006). A continuación se detallan los diferentes los fotorreceptores.

A



Adaptada de Heijde et al, 2012

B



Adaptada de Li et al, 2011

Figura I1. Espectro de la radiación lumínica con los principales fotorreceptores vegetales. (A) Representación del espectro de luz y de los fotorreceptores que captan las diferentes longitudes de onda que lo componen. **(B)** Esquema de la estructura de los fotorreceptores fitocromos en *A. thaliana*. **NTE** (N-TERMINAL EXTENSION), **PAS** (PERARNT-SIM), **GAF** (CGMP-SPECIFIC PHOSPHODIESTERASES, ADENYL CYCLASES AND FHLA); **PHY**, (PHYTOCHROME-SPECIFIC DOMAIN) ; **PRD**, PAS-related domain (**PAS A** y **PAS B**); **HKRD**, (HISTIDINE KINASE RELATED DOMAIN) .

3.1. UVR8.

La luz UV-B es percibida por el fotorreceptor UVR8. Esta proteína se localiza en el citoplasma y en el núcleo, y su abundancia no se ve afectada por la radiación UV-B u otra calidad de luz (Heijde & Ulm 2012). No obstante, tras la irradiación con UV-B el receptor actúa en el núcleo donde se asocia con los promotores de sus genes diana. El receptor UVR8 se encuentra de manera natural formando homodímeros, que son inactivos; cuando UVR8 percibe el UV-B a través de triptófanos (Trp) específicos, el dímero se puede disociar (formando monómeros activos) e iniciar la cascada de señalización (Christie et al. 2012). En este sentido UVR8 es un fotorreceptor

único ya que, a diferencia de los fitocromos o criptocromos, no contiene un cromóforo no proteico pero sí una capacidad de detección de la luz intrínseca gracias a ciertos Trp de su secuencia. Se ha sugerido que el Trp 285 (Trp285) es el que actúa como el sensor UV-B, si bien otros residuos como los Trp94, Trp233 y Trp337 están implicados; datos *in vivo* sugieren que los Trp285 y Trp233 son los más importantes en este proceso.

3.2. Criptocromos, fototropinas y otras proteínas LOV.

3.2.1. Criptocromos.

Los criptocromos (crys) fueron descubiertos por primera vez en *A. thaliana* y posteriormente se han encontrado en otras plantas. *A. thaliana* tiene tres genes que codifican criptocromos (CRY1, CRY2 y CRY3) (Christie et al. 2012). Análisis genéticos indican que tras percibir B, estos receptores median la inhibición del alargamiento del hipocotilo, el control del tiempo de la floración, los ritmos circadianos, la apertura de los estomas, el desarrollo de raíces, respuestas a estrés biótico (bacterias, patógenos virales) y abiótico, ciclos celulares, desarrollo de frutos y óvulos, dormición de semillas y magnetorrecepción, tal y como se describe en (Li & Yang 2007; Yu et al. 2010). CRY1 y CRY2 tienen dos dominios N-terminal PHR (PHOTOLYASE-HOMOLOGOUS REGION) los cuales se unen no covalentemente a dos cromóforos, el FAD (FLAVIN ADENINE DINUCLEOTIDE) y una pterina o deazaflavina (bases nitrogenadas derivados de la pteridina), que proporcionan la capacidad de detección de B y UV-A. En C-terminal contienen otro dominio, el CCE (del inglés, CRY C-TERMINAL EXTENSION) que es crítico para la función y la regulación de los criptocromos. En el caso de CRY3, contiene un N-terminal PHR mucho más corto y sin región CCE (Ogliche et al. 2010). Otra diferencia entre los criptocromos CRY1 y CRY2 con el CRY3 es que los primeros actuarían mayoritariamente en el núcleo (Wu & Spalding 2007; Shalitin et al. 2002) mientras que CRY3 tendría su función en los cloroplastos y en las mitocondrias (Kleine et al. 2003). Se plantea la hipótesis de que los fotones excitan los electrones de la molécula de flavina, lo que resulta en una reacción redox o lanzadera circular de electrones y esto produce cambios conformacionales en los fotorreceptores. El criptocromo fotoexcitado se fosforila y adopta una conformación abierta, que interactúa con proteínas de señalización lumínica alterando la expresión génica (Yu et al. 2010).

3.2.2. Fototropinas y otras proteínas con dominio LOV.

Las fototropinas (phot) son fotorreceptores sensibles a B que intervienen en respuestas como el fototropismo, la inhibición del crecimiento del hipocotilo en respuesta a B (Folta et al. 2003), la apertura estomática (Kinoshita et al. 2001) y los movimientos intracelulares de los cloroplastos en respuesta al exceso de luz (Łabuz et al. 2012). En *A. thaliana* hay dos genes que codifican fototropinas, PHOT1 y PHOT2, que tienen funciones altamente redundantes. Las fototropinas constan de dos partes: una Ser/Thr quinasa en la parte C-terminal, y dos dominios LOV (LIGHT OXIGEN VOLTAGE) que se unen no covalentemente a los cromóforos de Flavina: FMN (FLAVIN MONONUCLEOTIDE) o los FAD (FLAVIN ADENINE DINUCLEOTIDE) (Ogliche et al. 2010; Freddolino et al. 2013). Aunque se cree que los criptocromos desempeñan un papel principal en la regulación de la expresión génica por B (Ohgishi et al. 2004) varios genes parecen estar controlados también por PHOT1 en respuesta a B en *A. thaliana* (Łabuz et al. 2012).

Otras proteínas como ZTL (ZEITLUPE), FKF1 (FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1) y LKP2 (LOV KELCH REPEAT PROTEIN 2) también poseen un dominio LOV en la parte N-terminal seguido

por un dominio F-box (que median la ubiquitinación de otras proteínas) y varias repeticiones de un motivo KELCH (motivo implicado en interacción proteína-proteína) (Adams et al. 2000). Estas proteínas ZTL/FKF1/LKP2 también estarían implicadas en la percepción de B, en la regulación del reloj circadiano y en la floración en respuesta al fotoperiodo, aunque no se conoce en detalle su papel ni la función.

3.3. Fitocromos.

Los fitocromos (phys), componen la familia de los fotorreceptores que detectan la luz R y FR. Todos los fitocromos son cromoproteínas diméricas solubles. Cada subunidad está compuesta por una cadena polipeptídica denominada apoproteína (de aproximadamente 120 kDa) a la que se une covalentemente un cromóforo llamado fitocromobilina. El conjunto se llama holoproteína y es la forma capaz de percibir y activarse por la luz. Todos los phys tienen el mismo cromóforo pero se diferencian en la apoproteína, que la codifican genes diferentes. Los phys existen en 2 formas fotorreversibles: la forma biológicamente inactiva (Pr), que presenta un máximo de absorción de R (660 nm), y la activa (Pfr), que presenta un máximo de absorción de FR (730 nm) (Quail et al. 1995) (**Figura I2**). Los phys se sintetizan en el citoplasma en la forma Pr inactiva, que al absorber R cambia a su conformación activa, Pfr, y migran al núcleo para ejercer su función (Hiltbrunner et al. 2005b). La forma activa Pfr se puede degradar (Marme et al. 1971) o convertir de nuevo a la forma Pr, ya sea por la absorción de FR en una fotoconversión rápida o por una reacción no fotoinducida, que es lenta (reversión en oscuridad) (Quail 1997; Mancinelli 1994). Ambas formas tienen espectros de absorción distintos pero solapados y como consecuencia se establece un equilibrio dinámico entre ellas que depende de las características de la luz, denominado fotoequilibrio. Así, en una planta crecida en luz coexisten Pr y Pfr en un equilibrio que refleja las proporciones relativas de R y FR de su ambiente lumínico (**Figura I2**). Una de las primeras clasificaciones de los phys fue bioquímica y demostró la existencia de dos tipos principales: los de **tipo I** (fotolábil), que se degradan cuando perciben luz R o blanca (White; W) y predominan en plántulas etioladas (crecidas en oscuridad); y los de **tipo II** (fotoestables), que no se degradan tras la exposición a luz y predominan en plántulas desetioladas (plántulas crecidas en luz) (Clough & Vierstra 1997). Posteriormente, en *A. thaliana* se identificaron cinco genes que codificaban fitocromos: *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD*, *PHYE*. El *phyA* se considera del tipo I por ser fotolábil y los demás, *phyB-phyE*, son del tipo II (Quail 1997).

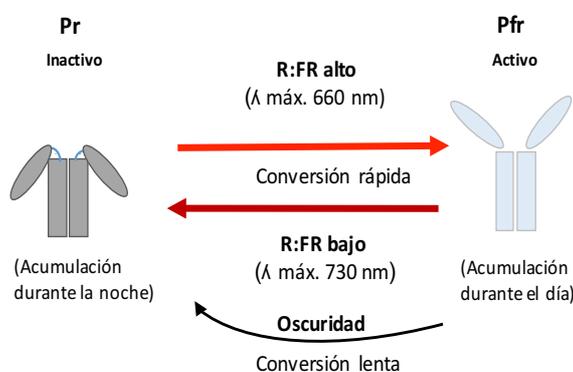


Figura I2. Fotoequilibrio y espectro de absorción de los fitocromos. Esquema de la estructura de los fotorreceptores fitocromos en *A. thaliana* y los espectros de absorción las dos isoformas: la Pr que presenta un máximo de absorción a 660 nm, Pfr máximo de absorción de 730 nm.

3.3.1. Nomenclatura de los fitocromos.

Existe una nomenclatura estandarizada en el campo del estudio de los fitocromos que es la que se ha utilizado en esta tesis (Quail et al. 1994).

1. *PHY* se refiere al gen.
2. *PHY* se refiere a la apoproteína (proteína sin cromóforo).
3. *phy* se refiere a la holoproteína (proteína con el cromóforo)
4. *phy* se refiere al mutante.

3.3.2. Estructura molecular de los fitocromos.

Como se ha descrito anteriormente, los fitocromos están formados por un cromóforo y una parte proteica, la apoproteína. El cromóforo fitocromobilina es un tetrapirrol lineal. Las apoproteínas tiene dos dominios principales: el N-terminal, que tiene forma globular y une el cromóforo; y el C-terminal, implicado en la dimerización y la transducción de las señales lumínicas (Quail 2010) (**Figura I1 B**). El dominio N-terminal está compuesto por:

1. Una extensión terminal llamada **NTE** (N-TERMINAL EXTENSION), es necesaria para la unión del cromóforo y para la degradación de Pfr (Casal et al. 2002; Li et al. 2011).
2. Varios subdominios muy conservados (Rockwell & Lagarias 2006):
 - a. **PAS** (PER-ARNT-SIM) importante para la unión del cromóforo.
 - b. **GAF** (cGMP-SPECIFIC PHOSPHODIESTERASES, ADENYLYL CYCLASES AND FHLA) es una región hidrofílica posiblemente involucrada en la fotodegradación de proteínas (Rogers et al. 1986). Esta región contiene un motivo PEST [secuencia rica en prolina (P), glutamato (E), serina (S) y treonina (T)] y la Cys a la que se une el cromóforo (en los fitocromos de plantas).
 - c. **PHY** (PHYTOCHROME-SPECIFIC DOMAIN), importante para la fotoconversión de Pr y Pfr.

El dominio C-terminal es importante para la señalización, dimerización y la translocación desde el citoplasma al núcleo de los fitocromos. Consta de tres subdominios:

1. Dos subdominios **PAS** (**PAS-A** y **PAS-B**), implicados en la interacción proteína-proteína con componentes de la vía de señalización o como moduladores de respuesta a pequeños ligandos o cambios en condiciones de luz, niveles de oxígeno y potenciales redox (Quail 1997; Neff et al. 2000)
2. Un subdominio **HKRD** (HISTIDINE KINASE RELATED DOMAIN), relacionado con los residuos de histidina encontrados en quinasas (Quail 2010). La función es desconocida pero se postula que tendría un papel en la señalización de los fitocromos, ya que interacciona con PKS1 (PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1) y esta interacción regula negativamente a phyB (Fankhauser et al. 1999).

3.3.3. El estímulo lumínico detectado por los fitocromos.

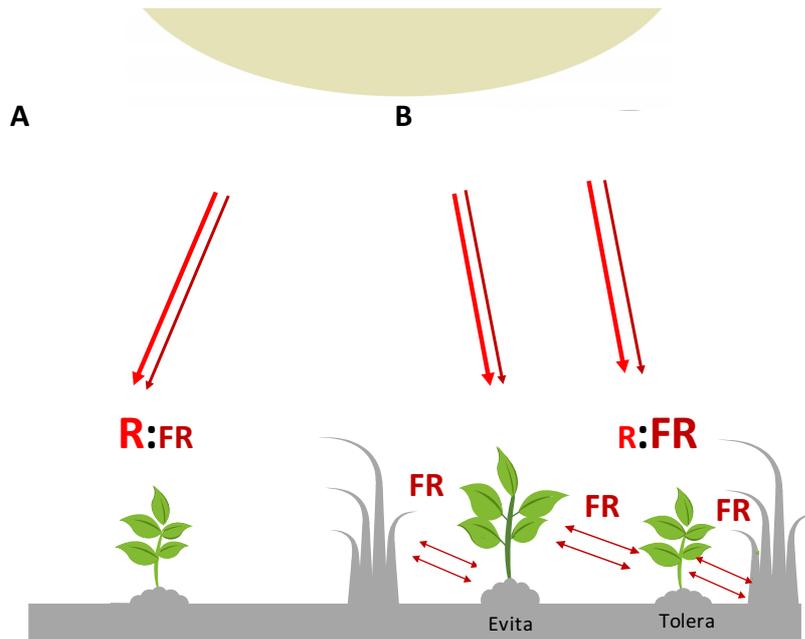
Para las plantas la luz es un recurso energético a la vez que una fuente de información del entorno que les rodea, que modula el desarrollo vegetal. La detección y captación de la luz como señal informativa se lleva a cabo por un complejo sistema de señales que son integradas y procesadas por fotorreceptores para modular múltiples respuestas fisiológicas como la germinación, desetiolación, adaptación a la proximidad vegetal o inducción de la floración. La radiación solar está compuesta por diferentes longitudes de onda (**Figura I1A**) y las plantas tienen fotorreceptores específicos encargados de la percepción de las diferentes partes del espectro solar, como se describió anteriormente (apartado 3). Siempre que las plantas crecen próximas, ya sea en bosques, prados, campos de cultivo u otro tipo de comunidades herbáceas, se da competición por la luz. Cuando las plantas crecen en baja densidad vegetal, la luz solar que reciben presenta un ratio o proporción de R y FR (R:FR) alto, mientras cuando crecen en alta densidad vegetal la R:FR baja, característica que indica la proximidad de vegetación. En ambientes con alta densidad vegetal la reducción del R:FR puede estar producida por dos situaciones: **sombra por proximidad**, en que las plantas vecinas crecen cerca pero sin sombrear directamente, o por **sombra por dosel**, en que las plantas sombrean a las plantas vecinas. En condiciones de proximidad vegetal, los tejidos verdes absorben luz de la región PAR (400–700 nm) mientras que reflejan específicamente el FR, produciendo una reducción del R:FR intermedio o bajo. Mientras que en condiciones de sombra por dosel, los tejidos verdes filtran la intensidad total de luz PAR, por lo que el R:FR resultante se reduce fuertemente debido a la disminución de R (**Figura I3**). En ambos casos, la cercanía de vegetación se convierte en una señal de luz caracterizada por una baja R:FR.

Los cambios en el R:FR son percibidos por los fitocromos, que informan a las plantas de la densidad de vegetación. En un día soleado sin vegetación cerca, la alta relación R:FR desplaza el fotoequilibrio hacia la forma Pfr activa, que inhibe el alargamiento de hipocotilos y tallos, la hiponastia (movimiento de las hojas hacia arriba) y la floración. Por el contrario, la cercanía de vegetación provoca una disminución en el R:FR, que desplaza el fotoequilibrio hacia la forma Pr. Al disminuir los niveles de Pfr, cesa la inhibición del alargamiento de hipocotilos y tallos, que se alargan fuertemente, y se acelera de la floración. El conjunto de respuestas que se promueven en ambientes sombreados se conocen como el síndrome de la huida de la sombra (SAS, del inglés *Shade Avoidance Syndrome*) (Martínez-García et al. 2010; Roig-Villanova and Martínez-García 2016)

En el laboratorio simulamos estas condiciones fijando la intensidad de W y enriqueciéndola con distintas intensidades de FR. Para evitar posibles confusiones sobre los experimentos realizados con diferentes tipos de sombra vegetal, en esta tesis se utilizarán los siguientes términos: (A) **sombra simulada**, para referirnos a cualquier condición en que las plantas crecen en luz de baja R:FR, (B) **sombra por proximidad**, que simula las condiciones de proximidad vegetal con R:FR intermedio o bajo y (C) **sombra por dosel**, que recrean las condiciones en que las plantas reciben directamente la sombra con muy bajo R:FR (Roig-Villanova & Martínez-García 2016).

En los experimentos de sombra simulada del capítulo I se utilizaron las condiciones de **sombra por proximidad**, mientras que en el capítulo II se utilizaron normalmente las condiciones de **sombra por dosel** exceptuando algunos casos concretos, que se detallarán.

Sombra por proximidad



Sombra por dosel

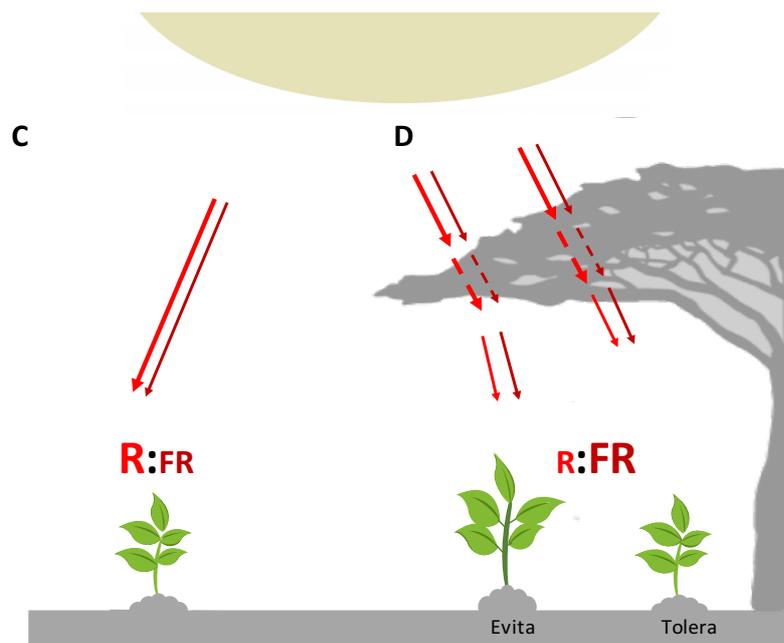


Figura I3. Estrategias para lidiar con la proximidad vegetal. En el panel de arriba se representa la situación de **sombra por proximidad** y en el de abajo la **sombra por dosel**. En **(A, C)** la planta recibe luz con una alta razón R:FR en **(B)** las plantas reciben la misma luz que la planta anterior pero además enriquecida en luz FR que es reflejada por las plantas vecinas produciendo una disminución del R:FR. En **(D)**, las plantas reciben la misma luz que la planta **(A, C)** pero además enriquecida con mayor cantidad de FR por una disminución de R produciendo una disminución del R:FR. En las condiciones **(B, D)** se da la activación del SAS en plantas que evitan la sombra, pero no en las que la toleran.

3.3.4. Funciones y respuestas fisiológicas reguladas por de los fitocromos.

Como hemos descrito anteriormente, los fitocromos actúan durante todo el ciclo de la vida de la planta. El análisis de mutantes que carecen de uno o varios fitocromos ha proporcionado información sobre su función en procesos concretos del desarrollo vegetal. A continuación, se describen algunas de las respuestas fisiológicas reguladas por fitocromos en *A. thaliana*.

Germinación de las semillas: Al menos tres fitocromos están implicados en el control de la germinación: phyA, phyB y phyE. El phyB controla las respuestas en alta R:FR (Reed et al. 1994; Botto et al. 1996; Li et al. 2011) mientras que phyA promueve la germinación en FR (Johnson et al. 1994b; Reed et al. 1994). Sin embargo, también se encontró que el phyE desempeñaba un papel en el control de la germinación de semillas en FR. Esto podría ser debido a que phyE está directamente involucrado en la fotopercepción de FR para esta respuesta, o porque phyA requiere phyE para mediar la germinación de las semillas (Hennig et al. 2002).

Desetiología de las plántulas: Como ya se ha comentado, cuando las plantas crecen en luz se caracterizan por tener hipocotilos cortos y cotiledones expandidos (desaparición del gancho apical) y los etioplastos transformados en cloroplastos por la producción y acumulación de pigmentos fotosintéticos (Han et al. 2007; Arsovski et al. 2012). El phyB es el fitocromo predominante en la regulación de la desetiología en R (Reed et al. 1993) aunque phyA tiene un papel principal en la regulación rápida de los cambios de expresión génica en respuesta al tratamiento de R (Smith 2000). El phyA es el único fitocromo en la regulación de las respuestas de desetiología en FR. Así, los mutantes *phyA* muestran un fenotipo similar al de las plantas silvestres cuando crecen en W y R. Sin embargo en FR, los mutantes *phyA* muestran un fenotipo escotomorfogénico (es decir, son ciegas a esta luz) lo que confirma el papel principal del phyA en percibir y mediar estas respuestas a FR (Dehesh et al. 1993; Nagatani et al. 1993; Parks & Quail 1993; Whitelam 1993; Reed et al. 1994). Las plántulas *phyA* muestran hipocotilos alargados en B (Whitelam 1993; Neff et al. 2000) sugiriendo que phyA tiene un papel en la percepción y transducción de B. Los mutantes deficientes en phyC presentan una pérdida parcial de la respuesta a R con hipocotilos más cortos y cotiledones más pequeños respecto a las plantas silvestres. El phyC actúa dependiente de phyB formando heterodímeros *in vivo* (Franklin, Davis, et al. 2003; Monte et al. 2003). La función de phyD y phyE sería minoritaria en la regulación de esta respuesta en comparación con los otros fitocromos.

Función sensora de la temperatura: El phyB tendría un papel termosensor, permitiendo que los fitocromos funcionen como sensores térmicos que integran la información de los cambios en la temperatura durante el transcurso de la noche (Jung et al. 2016).

Respuestas a la proximidad vegetal: La luz de baja razón R:FR es la señal que inicia las respuestas del SAS, que incluyen la inhibición de la germinación, mayor alargamiento del hipocotilo, menor ramificación y aceleración del proceso de floración (Martínez-García et al. 2010). En condiciones de baja densidad vegetal (sin vegetación vecina, alta R:FR), el phyB es el supresor principal del SAS ya que en W (alta R:FR) las plantas *phyB* tienen un fenotipo similar al de plantas silvestres crecidas en sombra simulada (baja R:FR) (Nagatani et al. 1991; Somers et al. 1991). En la regulación de las respuestas del SAS, que también se pueden inducir irradiando con FR al final del día (tratamientos denominados EOD-FR, del inglés end of day-FR), phyB, D y E tienen un

papel redundante (Devlin et al. 1999; Franklin et al. 2003). El phyA, a pesar de estar presente en niveles reducidos en plantas crecidas en W, desempeña un papel importante en la regulación del alargamiento del hipocótilo en respuesta a los cambios de R:FR. Así, plántulas mutantes *phyA* muestran mayor alargamiento del hipocotilo en comparación con las plantas silvestres en luz de baja R:FR (Johnson et al. 1994), un fenotipo que se hace más obvio en condiciones de R:FR muy baja (Yanovsky et al. 1995; Martínez-García et al. 2014). Estas observaciones llevaron a la sugerencia de que en plantas de tipo silvestre, la acción de phyA antagonizaba el síndrome de la huida de la sombra mediada por phyB reprimiendo el alargamiento del hipocotilo. Experimentos con el cuádruple mutante, *phyAphyBphyDphyE*, mostraron que es insensible a la disminución de la razón R:FR. Además, en condiciones de EOD-FR se confirmó que phyC es el único fitocromo sin un papel en la regulación de las respuestas del SAS (Franklin & Davis et al. 2003).

Debido a que las **respuestas a la proximidad vegetal** son un tema principal de la tesis, este punto se describirá en el apartado 4.1 con más detalle.

3.3.5. Interacciones y regulación aguas abajo de los fitocromos.

La transducción de señal lumínica es el proceso que tiene lugar desde que el fitocromo percibe los cambios en la señal de luz hasta que se produce una alteración en la expresión génica (Quail 2002). La luz modula la acción de estos fotorreceptores induciendo cambios en su localización y/o abundancia. Hasta mediados de la década de 1990 se aceptaba que los fitocromos eran fotorreceptores citoplasmáticos (Nagy & Schäfer 2002). Sin embargo, se vio que deben entrar al núcleo para activar la mayoría de las respuestas de luz (Nagatani 2004; Kevei et al. 2007; Fankhauser & Chen 2008). Por lo tanto, la translocación regulada por luz de los fotorreceptores desde el citoplasma hacia el núcleo es un evento clave en la cascada de señalización de los fitocromos. La localización nuclear de los fitocromos desencadena eventos de señalización que alteran la expresión de los genes diana en cuestión de minutos, iniciando una cascada que finalmente conduce a la modulación de las respuestas morfológicas y/o fisiológicas (Quail 2002; Jiao et al. 2007).

Una de las primeras funciones bioquímicas conocidas de los fitocromos fue la capacidad de fosforilarse a sí mismos y a ciertos sustratos, como por ejemplo PKS1 (Fankhauser et al. 1999), NDPK2 (NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE 2) (Choi et al. 1999), criptocromos (tanto CRY1 como CRY2), las proteínas AUX/IAA (Colón-Carmona et al. 2000), FyPP (PHYTOCHROME-ASSOCIATED SERINE/THREONINE-PROTEIN PHOSPHATASE 1) (Kim et al. 2002), COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1) (Seo et al. 2004; Jang et al. 2010), PAPP5 (SERINE/THREONINE-PROTEIN PHOSPHATASE 5) (Ryu et al. 2005) y FHY1/FHL (FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL 1 / FAR-RED-ELONGATED HYPOCOTYL 1-LIKE) (Hiltbrunner et al. 2005a; Hiltbrunner et al. 2006). El conjunto de investigaciones sobre estas proteínas han sugerido que la fosforilación y desfosforilación de los fitocromos y de sus sustratos tiene una función importante en la modulación de la localización subcelular, en la estabilidad dependiente de las condiciones lumínicas y/o su afinidad por los componentes de la cadena de la transducción de la señal.

Mediante experimentos de genética reversa y ensayos de interacción por el sistema del doble híbrido en levadura (Y2H, Yeast Two Hybrid), se identificaron nuevos componentes de la vía de señalización de los fitocromos. El primer factor identificado fue PIF3 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3), un factor de transcripción de la familia bHLH que interaccionaba con

phyA y phyB. PIF3 se unía preferentemente a la forma Pfr (activa) de ambos fitocromos y la fotoconversión de la forma Pfr a la forma Pr (inactiva) provocaría su disociación (Ni et al. 1998; Quail et al. 1999). Se vio que *in vitro* phyB interaccionaba con PIF3 unido al DNA, lo cual sugirió que había una regulación directa de la expresión génica vía fitocromos en respuesta a luz R y FR (Martínez-García et al. 2000). Posteriormente se identificaron otras bHLHs por similitud de secuencia que se agrupaban en la subfamilia 15 (Leivar & Quail 2011a). De entre las diversas bHLHs de esta subfamilia, hasta 6 miembros (incluyendo PIF3) se han clasificado como PIFs: PIF1/PIF3-LIKE 5 (PIL5) (Huq et al. 2004; Yamashino et al. 2003; Oh et al. 2004), PIF4 (Huq & Quail 2002), PIF5/PIL6 (Yamashino et al. 2003), PIF6/PIL2 (Khanna et al. 2004; Yamashino et al. 2003), PIF7 (Leivar et al. 2008) y PIF8 (REF). Se ha demostrado la unión *in vitro* de PIF4, PIF5, PIF6, PIF7 y PIF8 a la forma Pfr de phyB, mientras que a PIF1 y PIF3 se unen a la forma Pfr tanto de phyA como de phyB (Khanna et al. 2004; Zhu et al. 2000). Existen otros miembros de esta subfamilia 15 para los que no se ha demostrado capacidad de interacción con los fitocromos: HFR1 (LONG HYPOCOTYL IN FR 1) (Fairchild et al. 2000), SPT (SPATULA) (Josse et al., 2011), ALC (ALCATRAZ) (Rajani & Sundaresan 2001), bHLH23, bHLH56, bHLH119 y bHLH127.

Las interacciones fitocromos-PIFs son de gran relevancia, ya que después de la activación por luz de los fitocromos, los PIFs se fosforilan: en la mayoría de los PIF (PIF1, PIF3, PIF4 y PIF5, conocidos como PIFQ) esto produce su degradación vía el proteosoma 26S (Shen et al. 2007; Shen et al. 2008; Al-Sady et al. 2006; Al-Sady et al. 2008; Leivar et al. 2009), lo que conduce a la inhibición de su actividad.

Aunque phyB es un fitocromo fotoestable, se ha observado que sus niveles se reducen ligeramente tras la exposición a luz, y los PIFs podrían participar en este proceso. Así, existe una relación inversa entre los niveles de phyB y los niveles de PIF: los mutantes *pif* acumulan mayor cantidad de proteína phyB mientras que los mutantes que sobreexpresan PIF tienen niveles reducidos de proteína phyB (Khanna et al. 2007; Leivar et al. 2008; Al-Sady et al. 2008). A pesar de que PIF1 y PIF3 tienen el mayor protagonismo en la degradación de phyB vía poliubiquitinación COP1-E3 ligasa (Jang et al. 2010) estudios recientes han indicado que el fotorreceptor phyB se sumoila reversiblemente en plantas, lo que provoca su acumulación en luz R. Además, la sumoilación del phyB inhibe su interacción con PIF5, probablemente inhibiendo el efecto de los PIFs sobre la degradación de phyB (Sadanandom et al. 2015).

Los experimentos con el cuádruple mutante *pif1pif3pif4pif5* (llamado *pifq*) mostraron que tiene un fenotipo fotomorfogénico cuando crece en oscuridad, presentando alteraciones moleculares en desetiación (Leivar et al. 2008; Leivar et al. 2009). Así, cuando la planta crece en oscuridad, los PIFs se acumulan y mantienen el desarrollo escotomorfogénico, mientras que en presencia de luz los fitocromos están activos e inactivan y degradan los PIFs, promoviendo el proceso de desetiación. Por tanto, los PIFs actúan como reguladores negativos en la transducción de la señal lumínica y en general, activan las respuestas típicas del crecimiento en oscuridad (etiación). No obstante, PIF6/PIL2 inhibe la elongación del hipocotilo en R, teniendo un papel positivo en la señalización de esta luz. A diferencia de los otros PIFs, PIF7 no se degrada por acción de los fitocromos activados por la luz, aunque sí se fosforila, lo que previene su unión al DNA (Li et al. 2012). PIF7 es una proteína poco abundante, pero que interactúa selectivamente con la forma Pfr de phyB. Además, actúa como un regulador negativo de la señalización por phyB en R (Leivar et al. 2008; Leivar & Quail 2011).

En resumen, los fitocromos inician una cascada de señalización mediante la cual interaccionan como mínimo con los PIFs, factores que tienen un papel central en la regulación de la

transducción de las señales del fitocromo y son piezas claves en la conexión de señales y estímulos que recibe la planta (Quail 2002; Jiao et al. 2007; Castillon et al. 2007; Duek & Fankhauser 2005; Martínez-García et al. 2010a; Leivar et al. 2012).

3.3.6. Componentes de la señalización de phyA.

Los mutantes que se desetiolan en FR anómalamente (son hipo o hipersensibles a este tratamiento) se considera que afectan a componentes de la señalización de phyA, ya que es el único fotorreceptor que controla esta respuesta a esta longitud de onda en plántulas. De esta manera se han identificado FHY1, su parálogo FHL, FHY3 y FAR1 (FAR-RED IMPAIRED RESPONSE 1). El análisis funcional de estos mutantes ha mostrado un rol de FHY1 y FHL en la localización nuclear de la forma activa de phyA. La percepción de FR, R y B por parte de phyA permite que pase a su forma activa (PfrA) la cual es capaz de interactuar con FHY1 y FHL en el citoplasma (Hisada et al. 2000; Kircher et al. 2002). La señal nuclear que presentan estos factores permite la entrada del complejo al núcleo, puesto que phyA no contiene una NLS (Nuclear Localization Signal) propia y necesita de esta interacción para ser transportado al núcleo, donde ejerce su acción. La acumulación de phyA en el núcleo también depende de los factores FHY3 y FAR1 ya que activan la expresión de *FHY1* y *FHL* (Hiltbrunner et al. 2006). Además, la fosforilación de FHY1 es clave para la dinámica de la señalización del phyA en condiciones de R y FR (Chen et al. 2012; Gu et al. 2013). En plántulas crecidas en oscuridad, phyA es el fitocromo más abundante que, tras la percepción de luz, es capaz de autorregular su abundancia controlado por el efecto de la fotolabilidad (Sharrock & Clack 2002). Así, la luz percibida por phyA o phyB reprime la expresión del gen *PHYA* (Quail et al. 1994; Cantón & Quail 1999).

La degradación de proteínas mediada por el proteasoma es un proceso que normalmente requiere que la proteína a eliminar se poliubiquitine primero. La poliubiquitinación de proteínas requiere la acción de ligasas de ubiquitinas E3 específicas. Se ha propuesto que la degradación de phyA depende principalmente de ligasas de ubiquitina E3 basadas en CULLIN1 (Debrieux et al. 2013) y bajo ciertas condiciones de COP1 (Seo et al. 2004; Debrieux et al. 2013). Además, el factor SPA1 (SUPPRESSOR OF PHYA 1) también sería parte de esta vía de señalización y actuaría formado un complejo COP1/SPA1 para interactuar directamente con phyA y así regular su abundancia y localización subcelular. Este complejo actúa como un represor de señalización del phyA (Saijo et al. 2008).

4. Estrategias para lidiar con la proximidad vegetal: evitar o tolerar la sombra.

Durante la evolución, las plantas han desarrollado dos estrategias principales para hacer frente a la proximidad de vegetación: evitarla o tolerarla. Las especies que evitan la sombra, como *A. thaliana*, ponen en marcha una serie de respuestas conocidas conjuntamente como el SAS. Otras especies vegetales optan por tolerar la sombra, como *Cardamine hirsuta*, una brasicéa emparentada con *A. thaliana*. En el laboratorio habíamos visto que el hipocotilo de *C. hirsuta* no se alargaba en respuesta a la exposición a sombra simulada (Hay et al. 2014). A continuación, se detallan estas dos estrategias (apartados 4.1 y 4.2) (**Figura I3**).

4.1. El síndrome de huida de la sombra (SAS).

Las respuestas del SAS son múltiples y afectan a todos los estadios de desarrollo de la planta como inhibición de la germinación, mayor crecimiento del hipocotilo en estadio de plántula (respuesta más estudiada), menor expansión de la lámina foliar y mayor alargamiento de los pecíolos, una menor ramificación y reducción del tiempo de floración (Franklin 2008; Franklin & Quail 2010; Martínez-García et al. 2010; Casal 2012) (**Figura I3**).

4.1.1. Componentes de la señalización aguas abajo de los fitocromos en respuesta a sombra.

Cuando hay una alta razón R:FR, el phyB se encuentra predominantemente en su conformación activa Pfr. Esta forma interacciona con el dominio APB (*Active Phytochrome Binding*) de los PIFs, los complejos entre phy-PIF se fosforilan rápidamente. En el caso de los PIFQ, se ubiquitinan y se degradan, lo que impide la activación de la expresión de los genes diana de los PIFs; en el caso de PIF7, su actividad de unión al DNA disminuye (Leivar & Quail 2011a). Cuando la R:FR baja (por la proximidad vegetal), los niveles de la forma activa de los phys disminuye, los complejos phy-PIF se desensamblan, y la mayor cantidad de proteína PIFQ y de forma PIF7 desfosforilada (con mayor actividad de unión al DNA) resulta en la inducción la expresión génica, que activa las respuestas del SAS.

En el caso de PIF4 y PIF5 se acumulan en oscuridad y en condiciones de R:FR bajo cuando los fitocromos están mayoritariamente inactivos, mientras que se degradan en R y alta R:FR. Tanto los mutantes *pif4* y *pif5* como el doble mutante *pif4pif5* tienen la respuesta a la sombra simulada atenuada (hipocotilos más cortos) lo que sugieren que son reguladores positivos del SAS. Esto se ha validado con experimentos hechos en líneas sobreexpresoras de estos genes que presentan un mayor alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra. Estos datos dan a entender que el SAS, en parte, se inicia como consecuencia de la disminución de la degradación de PIF4 y PIF5 mediada por phyB (Lorrain et al. 2008). En el caso de PIF7, se ha visto que tiene un papel principal en el alargamiento de los hipocotilos en sombra simulada, a juzgar por la fuerte atenuación del alargamiento del hipocotilo en W+FR de los mutantes *pif7*, lo que indica que también es un regulador positivo de esta respuesta (Li et al. 2012; Roig-Villanova & Martínez-García 2016). PIF1 y PIF3 tendrían un papel positivo menor en la regulación de esta respuesta del SAS. La expresión de genes marcadores de sombra también está atenuada en mutantes de PIF4, PIF5 y PIF7, observaciones consistentes con los resultados del alargamiento del hipocotilo en respuesta a la sombra simulada (Hornitschek et al. 2012; Leivar et al. 2012; Li et al. 2012).

Los PIFs regulan la respuesta del alargamiento, al menos en parte, mediante la regulación de la biosíntesis y señalización de varias fitohormonas. En concreto, las auxinas tienen un papel principal, ya que regulan aspectos del crecimiento vegetal como el alargamiento del hipocotilo y tallo, expansión de cotiledones y hojas, y la dominancia apical. La acción de esta hormona está influenciada por la luz, cuya percepción afecta los niveles, transporte y respuesta de la planta a las auxinas (Halliday & Fankhauser 2003). En consecuencia, los mutantes de *A. thaliana* con deficiencias en biosíntesis de auxina, transporte o señalización son incapaces de alargar el hipocotilo en respuesta a sombra (Tao et al. 2008; Keuskamp et al. 2010). En condiciones de baja R:FR, los PIF4, PIF5 y PIF7 inducen directamente la expresión de los genes *YUCCA* (*YUC*), que codifican genes de síntesis de auxinas, que se acumulan rápidamente en los cotiledones y lámina

foliar (Wit et al. 2015; Hornitschek et al. 2012). En el caso de los mutantes *pif4pif5* y *pif7*, la menor inducción de los genes *YUC* resulta en una menor acumulación de auxinas en respuesta a sombra, lo que explicaría la falta de alargamiento del hipocotilo (Hornitschek et al. 2012; Li et al. 2012).

Además de los PIFs, existen otros factores que regulan las respuestas del SAS. La percepción de la proximidad vegetal induce rápida y reversible de la expresión de los genes *PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED (PAR)* (Devlin et al. 2003; Carabelli et al. 2007; Roig-Villanova et al. 2006; Roig-Villanova et al. 2007; Salter et al. 2003; Sessa et al. 2005). Estos cambios rápidos de la expresión génica son parte de una red transcripcional dinámica que está afectada por factores endógenos (estadio de desarrollo, niveles hormonales) y exógenos (temperatura, cantidad de luz, reloj circadiano), que explicarían la complejidad en las respuestas del SAS. Entre los genes *PAR*, algunos codifican proteínas de la familia bHLH, como *HFR1*, *PIL1*, *PIL2*, *PAR1*, *PAR2*, *BES1-INTERACTING MYC-LIKE 1 (BIM1)* y *BR-ENHANCED EXPRESSION1 (BEE1)*, *BEE2* y *BEE3* (Galstyan et al. 2011; Cifuentes-Esquivel et al. 2013). Otro grupo integrante son la subfamilia II de los factores de transcripción *HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER (HD-Zip II)*, como *ATHB2/HAT4* (a partir de ahora *ATHB2*), *ATHB4*, *HAT1*, *HAT2* y *HAT3*. Experimentos de nuestro laboratorio que combinaban la aplicación de cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis proteica, con el tratamiento de sombra simulada, mostraron que algunos de los genes *PAR*, como *PAR1*, *ATHB2*, *ATHB4* y *PIL1*, eran dianas directas de la acción de los fitocromos (Roig-Villanova et al. 2006). Análisis genético han mostrado que la acción de muchos de estos genes *PAR* es necesaria para la implementación de las respuestas del SAS. Por lo tanto, estos factores *PAR* serían el punto de entrada de la señal de sombra percibida por los fitocromos para modular la red transcripcional implicada en la adaptación de la planta a la competencia por la luz. (Martínez-García et al. 2010). En el capítulo I de este trabajo nos centramos específicamente en el papel de *ATHB4*.

4.1.2. Componentes de la señalización lumínica: familia HD-Zip II.

Los factores HD-Zip se han clasificado en cuatro subfamilias de acuerdo a un conjunto de características como son la especificidad de unión a DNA, la estructura génica (posición específica de intrones y exones), los motivos comunes y las funciones fisiológicas (Ariel et al. 2007). Los miembros de la subfamilia HD-Zip II se caracterizan por tener una región N-terminal (Nt) muy conservada con función desconocida, y un homeodominio (HD, del inglés *HOMEODOMAIN*) seguida de una cremallera de leucinas adyacente (Zip, del inglés *LEUCINE ZIPPER*), conjuntamente responsables de la unión al DNA como dímeros, y una región C-terminal con una secuencia conservada CPSCE y vinculada a la actividad redox de las células (Ariel et al. 2007; Tron et al. 2002). Estudios funcionales utilizando proteínas truncadas muestran que el motivo Zip se requiere para la unión al DNA llevada a cabo por el dominio HD (Ariel et al. 2007). La región Nt contiene secuencias muy conservadas (LxLxLxL y/o LNLxL) llamadas motivos EAR (*ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR-ASSOCIATED AMPHIPHILIC REPRESSION*); la función de esta región Nt es prácticamente desconocida (Kagale & Rozwadowski 2011; Kagale et al. 2010).

De los diez miembros de HD-Zip II cinco son genes *PAR*, es decir, su expresión está rápidamente inducida por sombra simulada. Estos cinco miembros forman dos subgrupos de genes parálogos: *ATHB2/HAT1/HAT2* y *ATHB4/HAT3* (Carabelli et al. 2008b). Los dos primeros genes descritos de esta familia fueron *ATHB2* y *ATHB4* y se identificaron como inducidos rápidamente por luz de

baja R:FR (Carabelli et al. 1993). Los primeros estudios funcionales sobre estos genes HD-Zip II se hicieron sobreexpresando *ATHB2* en *A. thaliana*, que resultó en plántulas con un hipocotilo más largo, cotiledones y hojas más pequeñas (Schena et al. 1993) y un sistema radicular más alargado que las plántulas silvestres cuando crecían en W (alta R:FR). Plántulas transgénicas que sobreexpresaban *ATHB2* en antisentido (*anti-ATHB2*) mostraban un fenotipo opuesto (Schena et al. 1993; Steindler et al. 1999). En contraste con las líneas *anti-ATHB2*, plántulas mutantes de pérdida de función de *ATHB2* mostraban un fenotipo silvestre en W. Estas observaciones sugerían que la expresión de otros genes de la subfamilia HD-Zip II podría estar reducida en las líneas *anti-ATHB2*, causando una disminución de la actividad no sólo de *ATHB2* sino también de otras proteínas homólogas. Basándose en estos fenotipos de promoción del alargamiento del hipocotilo en W (alta R:FR) se sugirió que *ATHB2* era un regulador positivo de las respuestas del SAS, al menos en estadio de plántula (Sessa et al. 2005). No obstante, se desconocía qué efecto tenía la sobreexpresión de *ATHB2* cuando las plántulas crecían en sombra simulada.

El otro HD-Zip II que se ha estudiado con cierto detalle es *ATHB4*. Resultados previos del grupo mostraron que la sobreexpresión de *ATHB4* alteraba el desarrollo de las plántulas, produciendo un mayor alargamiento del hipocotilo en W. Por el contrario, en sombra simulada el alargamiento del hipocotilo se inhibía (Sorin et al. 2009), resultados que sugerían que *ATHB4* tendría un papel como regulador negativo de las respuestas del SAS. *HAT3* y *ATHB4* son genes parálogos (Ariel et al. 2007; Carabelli et al. 2008a). El mutante simple de pérdida de función de *ATHB4* no presentaba ningún fenotipo aparente, tanto en estadio adulto como en plántulas comparados con las plantas silvestres al igual que ocurría con la pérdida de función de *HAT3* (Salla-Martet 2012). En cambio, plántulas del doble mutante *athb4hat3* presentaban una menor respuesta del hipocotilo a sombra simulada comparado con plantas silvestres. Así, tanto la sobreexpresión de *ATHB4* como la pérdida de función de *ATHB4* (y *HAT3*) producía una reducción en la respuesta del hipocotilo a sombra simulada, con lo que resultaba difícil decir si se trata de un regulador positivo o de un regulador negativo; por tanto, *ATHB4* se clasificó como un regulador complejo de las respuestas del SAS (Sorin et al. 2009). Estos resultados contrastaban con los descritos por otros autores sobre el papel de otros miembros de la subfamilia HD-Zip II como reguladores positivos de las respuestas del SAS. Experimentos de nuestro laboratorio mostraron que los hipocotilos de líneas de sobreexpresión de otros factores HD-Zip II, como *HAT1*, *HAT2* y *ATHB2*, también se alargaban menos en respuesta a sombra simulada, lo que indicaba que estos factores, al igual que *ATHB4* tendrían un papel como reguladores negativos de las respuestas del SAS (Salla-Martet 2012).

Más allá de las respuestas del hipocotilo, se ha descrito e implicado a miembros de esta subfamilia en diversos aspectos del desarrollo de la planta como en la formación del carpelo (Reymond et al. 2012), en la formación y la actividad del meristemo apical (SAM, *Shoot Apical Meristem*) y en la polaridad de los cotiledones y hojas de manera conjunta con miembros de la subfamilia HD-Zip III (Bou-Torrent et al. 2012; Brandt et al. 2012).

En estadio adulto, el mutante *athb4hat3* presentaba hojas con una ligera curvatura hacia abajo y una reducción significativa en la expresión de genes relacionados con la regulación de la polaridad de las hojas como *PHABULOSA* (*PHB/ATHB14*), un miembro de la subfamilia HD-Zip III (Bou-Torrent et al. 2012; Brandt et al. 2012). Estudios anteriores del laboratorio mostraron que las plantas de sobreexpresión de *ATHB4* presentaban hojas en las que la lámina foliar se curvaba hacia arriba por una mayor proliferación de la parte abaxial (inferior) de las hojas respecto a la

parte adaxial (superior), características observada también en plantas que sobreexpresan *ATHB2* y *HAT3* (Bou-Torrent et al. 2012; Turchi et al. 2013). En cuanto a los análisis de expresión génica, *ATHB4* reprime la expresión de genes que codifican otros factores de la subfamilia HD-Zip II, como *ATHB2* o *HAT2*. *ATHB2*, *HAT1* y *HAT2* también reprimen la expresión de varios genes pertenecientes a la subfamilia HD-Zip II (Steindler et al. 1999; Sawa et al. 2002; Ciarelli et al. 2008b; Sorin et al. 2009) lo que sugiere que estos miembros de la subfamilia HD-Zip II conforman un circuito para la auto-regulación negativa coordinada de sus niveles, de forma que la expresión elevada de uno de estos miembros reprime la expresión de los demás. Dado que la expresión de estos genes está rápidamente inducida por sombra simulada, la percepción por los phys de una baja razón R:FR puede afectar rápidamente la expresión de toda la subfamilia, que a su vez modularía la expresión de algunos de sus genes, contribuyendo al complejo papel estos factores parecen tener en el control del SAS.

4.1.3. La subfamilia HD-Zip II y las respuestas a hormonas.

Como ya se ha comentado, las plantas interpretan e integran las señales lumínicas que perciben del ambiente empleando redes de señalización interconectadas y sofisticadas. Para conseguir esta integración, las señales iniciadas por la percepción de la proximidad vegetal confluyen en las redes reguladoras que controlan la división y la expansión celular, como son las de las hormonas vegetales. Las auxinas, los brasinosteroides (BRs) y las giberelinas (GAs) son hormonas estimuladoras del crecimiento, mientras que las citoquininas (CKs) son consideradas inhibidoras. Estas hormonas pueden actuar en el mismo sentido o antagonísticamente a las respuestas fotomorfogénicas.

Estudios previos relacionaron la actividad de miembros de la subfamilia HD-Zip II con las GAs (*ATHB4*), los BRs (*ATHB4* y *HAT3*) (Sorin et al. 2009) y las auxinas (*ATHB2*, *ATHB4* y *HAT2*) (Sawa et al. 2002; Steindler et al. 1999; Salla-Martet 2012), si bien se desconocían los mecanismos implicados. En el caso concreto de las auxinas, cuya implicación en el alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra simulada ha sido bien establecida (Roig-Villanova et al. 2007; Bou-Torrent et al. 2014; de Wit et al. 2015), se vio que (1) la sobreexpresión de *ATHB4* produce un incremento en la epinastia de los cotiledones, especialmente en condiciones de sombra simulada, efecto que se suprime cuando se añade el inhibidor del transporte polar de auxinas NPA (*1-N-Naphthylphthalamic Acid*); (2) las plantas con elevada actividad *ATHB4* presentan una reducción de respuesta en respuesta a la auxina sintética 2,4-D, sugiriendo un papel de este factor en la capacidad de respuesta de los hipocótilos en respuesta a auxinas (Sorin et al. 2009); y (3) la inducción por sombra de genes involucrados en respuestas a auxinas como *SAUR15* (*SMALL AUXIN UPREGULATED RNA 15*), *SAUR68* y *HAT2*, está fuertemente atenuada en las plantas que sobreexpresan *ATHB4* (Sorin et al. 2009). El conjunto de estos resultados sugiere que *ATHB4* (y por extensión otros miembros de la familia HD-Zip II) puede integrar la señal de sombra percibida por los phys con la señalización de auxinas en la modulación de las respuestas SAS.

4.1.4. Familia HD-Zip II y el desarrollo.

Plántulas del doble mutante *athb4hat3* mostraban defectos importantes en el desarrollo. En concreto, se observó que el mutante *athb4hat3* tiene un eje embrionario más largo y dos cotiledones irregulares que se pliegan de forma asimétrica. La caracterización con imágenes de

confocal mostraron que los cotiledones de algunos individuos *athb4hat3* carecían del parénquima en empalizada (Bou-Torrent et al. 2012).

Experimentos de ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) mostraron que *HAT2*, *HAT3*, *ATHB2* y *ATHB4* son genes diana directos de *REV* (*REVOLUTA*), un miembro de la subfamilia HD-Zip III, y que regula su expresión. En consistencia con estos resultados, la expresión espacial de *REV* es similar a la de *HAT1*, *HAT3* y *ATHB4*, en el dominio adaxial de las hojas (Brandt et al. 2012). Estudio de las respuestas a sombra simulada de mutantes de pérdida de función de los miembros de la subfamilia HD-Zip III [*REV*, *PHB*, *PHAVOLUTA* (*PHV/ATHB9*), *CORONA* (*CNA/ATHB15*) y *ATHB8*] mostraron que hay redundancia génica entre ellos, al igual que ocurre en la subfamilia HD-Zip II. Además, la red reguladora formada por miembros pertenecientes a HD-Zip III y los factores de transcripción KANADI (KAN) (que actúan de manera antagónica, ya que los HD-Zip III regulan activando la expresión génica mientras que los de la familia KAN la inhiben) estaban implicados en la regulación de las respuestas a sombra simulada en *A. thaliana* (Brandt et al. 2012). Estos resultados planteaban una conexión entre las respuestas a sombra simulada y la polaridad de las hojas, en la que *ATHB4* actuaría como un elemento integrador de ambas vías. No obstante, no está claro cómo se activaría *REV* en respuesta a una baja razón R:FR para inducir la expresión de *ATHB4* y otros miembros de la subfamilia HZ-Zip II.

4.1.5. Estructura y función de *ATHB4*.

Estudios de unión de *ATHB4* a DNA mediante *protein-arrays* y de ChIP permitieron identificar secuencias consenso de unión de *ATHB4*, resultados que confirmaron que *ATHB4* unía directamente al DNA. Mediante el uso de una forma mutada en el dominio HD (*ATHB4_{N210A}*) producida en el laboratorio por comparación con información disponible sobre *ATHB2*, pudimos demostrar que la unión de *ATHB4* al DNA era específica, dependía de este residuo y que otras regiones de *ATHB4* no eran capaces de reconocer ni unir otras secuencias de DNA (Gallemí 2013; Gallemí et al. 2017).

En los estudios para relacionar la estructura y la función de *ATHB4*, se dividió la proteína en cuatro dominios o regiones: Nt (1 al 142), HD (residuos 143-220), Zip (Z; 221-263) y C-terminal (Ct; 264-318) (**Figura I4**). Se generaron 12 formas truncadas o mutadas conteniendo combinaciones de estos dominios o regiones y se estudió su función en plantas transgénicas. Específicamente se estudiaron las siguientes respuestas: alargamiento del hipocotilo, expresión génica y la polaridad de las hojas en respuesta a sombra. Tras el estudio funcional de estas formas se vio que (1) el extremo Ct no era necesario para las funciones biológicas estudiadas; (2) los dominios HD y Zip eran suficientes para la homodimerización y su unión a DNA pero no para proporcionar actividad biológica; y (3) la parte Nt, de función desconocida, era fundamental para su papel regulador tanto de la respuesta del hipocotilo a sombra simulada y su actividad represora de la transcripción y la regulación de la polaridad de las hojas (Gallemí 2013; Gallemí et al. 2017). Por otro lado, se vio que formas que contenían la región Nt pero carecían de actividad de unión DNA (p.ej., la parte Nt fusionada al HD, o la forma mutada en la región HD, *ATHB4_{N210A}*) mostraban una actividad biológica y molecular similar a la de la forma entera y silvestre en la respuesta del hipocotilo y/o expresión génica, pero no en la polaridad de las hojas (Gallemí et al, 2017) (**Figura I4**). Para explicar el conjunto de resultados obtenidos tanto

de la actividad biológica como de las respuestas génicas se propuso que ATHB4 actuaría mediante dos mecanismos moleculares diferentes (**Figura I4**).

- A) Uniendo el DNA (formando homodímeros) en la regulación de la expresión génica y la polaridad de las hojas, actuando por tanto como un factor de transcripción.
- B) Sin unir el DNA en la regulación de la expresión génica y la respuesta del hipocotilo, actuando como un cofactor de transcripción.

Para llevar a cabo ambos mecanismos requiere interactuar con otras proteínas vía su región N-terminal. Dada la complejidad de acción de ATHB4 será importante avanzar en la elucidación de los mecanismos de estas conexiones entre la regulación de la luz y el desarrollo.

En el primer capítulo de la presente tesis presentamos estudios encaminados a profundizar en los mecanismos de acción de ATHB4 como factor y cofactor transcripcional en las distintas respuestas a sombra simulada.

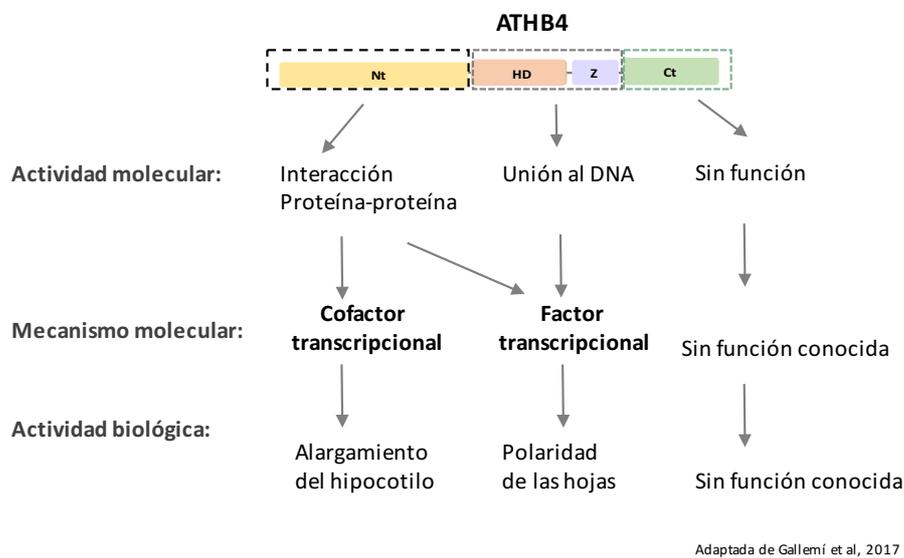


Figura I4. Resumen del análisis estructura-función de ATHB4. Esquema resumen de los análisis de estructura-función previos a esta tesis doctoral. ATHB4, la proteína en cuatro dominios o regiones: N-terminal (Nt; del residuo 1 al 142), homeodominio (HD; 143-220), cremallera de leucinas Zip (Z; 221-263) y C-terminal (Ct; 264-318) (Gallemí et al, 2017).

4.2. Tolerancia a la sombra.

Como se ha descrito anteriormente, existe mucha información de cómo las plantas perciben y evitan la sombra, pero en el caso de las plantas que la toleran se desconoce cómo se regula este proceso (Gommers et al. 2013). Actualmente se desconocen los mecanismos moleculares y componentes genéticos por los cuales las especies tolerantes a la sombra no responden alargando los tallos. Por este motivo el segundo capítulo de esta tesis se ha dedicado al estudio e identificación de los mecanismos moleculares que participan en la regulación de la tolerancia a la proximidad y la sombra vegetal.

4.2.1. *Cardamine hirsuta*: un sistema modelo para análisis genéticos comparativos.

Como modelo para el estudio de tolerancia a la sombra decidimos emplear *C. hirsuta*, una planta que también pertenece a la familia de las brassicáceas, por tanto filogenéticamente es muy cercana a *A. thaliana*. *C. hirsuta* es una buena planta modelo ya que su ciclo de vida es corto (aproximadamente como el de *A. thaliana*, unas 6 semanas desde la germinación hasta tener las semillas maduras), tiene un tamaño pequeño, se autofecunda, es relativamente fácil realizar cruces genéticos y produce semillas con abundancia (Hay & Tsiantis 2016). Es importante remarcar que es una especie diploide ($2n = 16$), con un genoma pequeño (225 Mbp) que ha sido secuenciado recientemente (Gan et al. 2016). Además, *C. hirsuta* puede ser transformada genéticamente por inmersión floral, permitiendo así la manipulación de su expresión génica; también se pueden mutagenizar semillas con las mismas metodologías que en *A. thaliana*, lo que permite llevar a cabo abordajes de genética clásica (Hay & Tsiantis 2016). Esta combinación de atributos hace de esta planta una excelente plataforma para los estudios funcionales y de genética comparativa, lo que permite la explotación de los conocimientos y las herramientas generadas en *A. thaliana* en un contexto nuevo.

Nuestros experimentos mostraron que los hipocotilos de *C. hirsuta* no se alargan en respuesta a sombra simulada (Hay et al. 2014), diferencias que son la base de nuestros análisis comparativos. No obstante, estas dos especies presentan otras diferencias no sólo de estrategia frente a la proximidad vegetal sino también morfológicas (**Tabla I1**). En *C. hirsuta* el tamaño de las plántulas es mayor (tanto la raíz, el hipocotilo como los cotiledones). Así, los hipocotilos de plántulas crecidas en W durante 7 días eran 2-3 veces más largos que los de las plántulas de *A. thaliana* crecidas a la vez en las mismas condiciones. En estadio adulto, las hojas de *C. hirsuta* son compuestas, a diferencia de las de *A. thaliana* que son simples (Hay et al. 2014; Hay & Tsiantis 2016). Además, *C. hirsuta* produce semillas más grandes, con mayor peso, más redondeadas y con un sistema de dispersión por explosión del fruto, a diferencia de *A. thaliana* que tiene semillas más pequeñas y con silicuas (frutos) dehiscentes (**Tabla I1**). Actualmente desconocemos si algunos de las diferencias que presenta *C. hirsuta* están relacionadas con la diferente estrategia a la proximidad vegetal.

La disponibilidad de dos especies próximas filogenéticamente pero que difieren en sus respuestas a la sombra (huida *versus* tolerancia), nos proporciona una gran herramienta para estudiar las diferencias moleculares de ambas estrategias evolutivas. En el segundo capítulo de la presente tesis presentamos un estudio comparativo entre *A. thaliana*, y *C. hirsuta*, dos especies que emplean estrategias opuestas a la sombra vegetal, con el fin de diseccionar las bases genéticas y moleculares de estas diferencias.

Morfología	<i>A. thaliana</i> (Col-0)	<i>C. hirsuta</i> (Ox)
Forma foliar	simple	compuesta
Tricomas foliares	ramificados	Sin ramificar
Nº de estambres	6	4
Nº de pétalos	4	0-4
Dispersión de semillas	No explosiva (dehiscencia del fruto)	Explosiva
Forma de la semilla	ovalada	circular
Superficie de la semilla	Con surcos	Con rugosidades
Peso de las semillas (mg)	0,02	0,146
Media de la longitud del hipocotilo de plántulas de día7 en luz continua (mm)	1,35	3,82
Respuesta a la sombra simulada del hipocotilo	Sí	No
Células del córtex y endodermis	8	12
Capas de las células del córtex	1	12

Tabla I1. Diversidad morfológica entre *A. thaliana* y *C. hirsuta*. Comparativa entre las dos especies en diferentes momentos de desarrollo.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto es entender la regulación del síndrome de la huida de la sombra (SAS) a nivel molecular y genético. Utilizando la planta modelo *A. thaliana* (que evita la sombra), nos centramos en el estudio de los mecanismos de acción del factor de transcripción ATHB4, identificado previamente en nuestro laboratorio por su papel en la regulación del SAS en las plántulas. Por otro lado, en el laboratorio vimos que *C. hirsuta*, una especie filogenéticamente próxima a *A. thaliana*, no se alarga en respuesta a la exposición a sombra simulada, presentando una estrategia adaptativa a la proximidad de vegetación: tolerancia a la sombra. El análisis comparativo entre *A. thaliana* y *C. hirsuta* nos ha ayudado a conocer las bases moleculares y genéticas que sustentan la diferencia de respuesta observada entre especies que evitan y toleran la proximidad vegetal.

Se plantearon los siguientes objetivos concretos:

- 1. Estudio de los mecanismos moleculares de ATHB4 en las respuestas del SAS.**
 - Análisis del mecanismo de acción de *ATHB4* en la regulación de diferentes procesos biológicos, generando plantas transgénicas que sobreproducen *ATHB4* fusionado a VP16 (del virus *herpes simplex* de animales), el cual codifica un dominio con una fuerte capacidad activadora de la transcripción.
 - Identificación y análisis de los interactores con la región Nt de *ATHB4*, para establecer su relevancia biológica en la regulación del SAS.
 - Estudio de la función de los motivos EAR (ubicados en la región Nt de *ATHB4*) analizando las actividades biológicas de una forma en la que estos dominios se han mutado.

- 2. Estudio comparativo de los componentes genéticos implicados en las respuestas de la planta a la proximidad vegetal en especies que evitan y toleran la sombra.**
 - Identificación y caracterización de líneas transgénicas de *C. hirsuta* con niveles reducidos de fitocromo A (*phyA*).
 - Cribado genético para la búsqueda de plántulas mutantes de *C. hirsuta* que respondan a la sombra simulada: Caracterización genética y molecular de mutantes *slender in shade (sis)*.
 - Estudio de la complementación de plantas deficientes en *phyA* de *A. thaliana* con las proteínas *PHYA* de *A. thaliana* y de *C. hirsuta*.

RESULTADOS

RESULTADOS

Capítulo I. Estudio de los mecanismos moleculares de ATHB4 en las respuestas del síndrome de huida de la sombra (SAS).

1.1. Análisis de la estructura y función de ATHB4 en la regulación del SAS.

Con anterioridad a este trabajo, en nuestro laboratorio se llevó a cabo un estudio de la relación entre la estructura y la función de ATHB4 sobreexpresando de forma estable en *A. thaliana* formas truncadas o mutadas de este factor fusionadas al GR (Glucocorticoid Receptor, receptor de glucocorticoides de origen animal inducible por la aplicación de dexametasona, DEX) que contenían combinaciones de los cuatro dominios o regiones que la componen: N-terminal (Nt; del residuo 1 al 142), homeodominio (HD; 143-220), cremallera de leucinas Zip (Z; 221-263) y C-terminal (Ct; 264-318) (Figura R1.1).

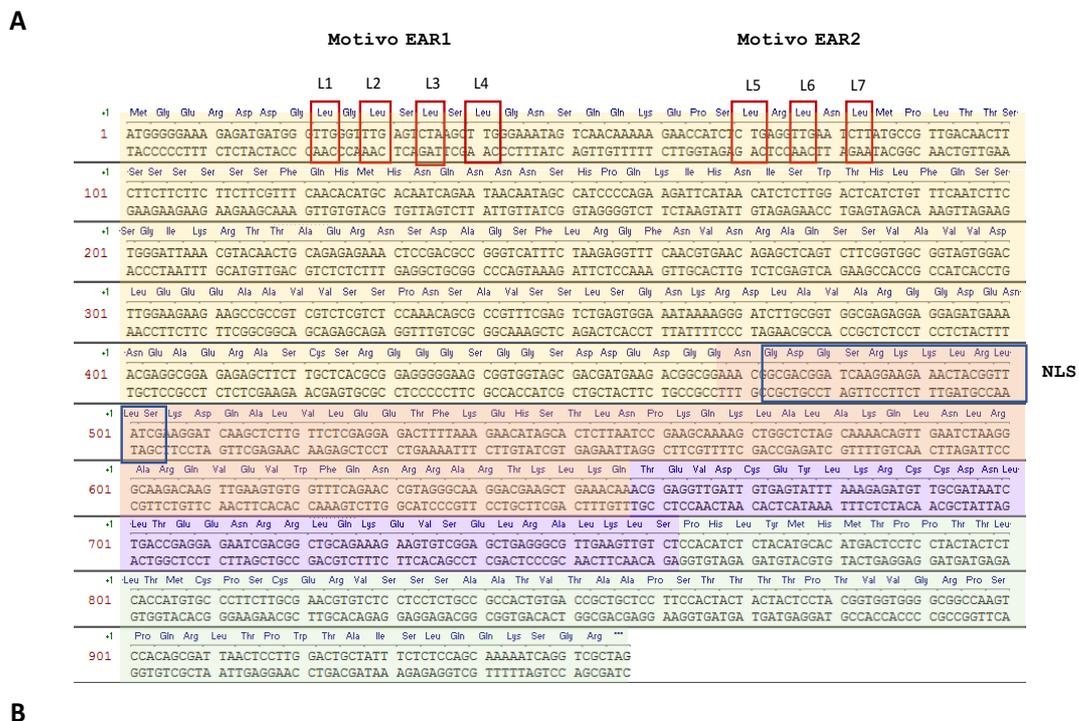


Figura R1.1. Esquema de las diferentes regiones y dominios definidos en ATHB4. (A) Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de *ATHB4*. Se resaltan las regiones N-terminal (Nt; amarillo), el Homeodominio (HD; naranja), la cremallera de leucinas (Zip, Z; lila) y C-terminal (Ct; verde). Las cajas muestran la ubicación de los motivos EAR (granate) y la señal de localización nuclear (Nuclear Localization Signal, NLS; azul). **(B)** Esquema de las diferentes regiones y dominios mostrados en A.

Los análisis funcionales se llevaron a cabo estudiando tres respuestas reguladas por ATHB4: (1) el alargamiento del hipocotilo y (2) la modulación de la expresión génica en respuesta a sombra simulada, y (3) la polaridad de las hojas. Tras los estudios funcionales se vio que el extremo Ct no tenía función biológica, mientras que la actividad dependía fundamentalmente de la región Nt, que hasta el momento había sido muy poco estudiada. Así, la sobreexpresión de formas truncadas de ATHB4 sin la región Nt o con una mutación puntual de la Leu10 por una Ala en esta región, específicamente en un motivo EAR (*ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR-ASSOCIATED AMPHIPHILIC REPRESSION*) (Hiratsu et al. 2003; Kagale et al. 2010; Kagale & Rozwadowski 2011) mostraban actividad biológica atenuada o incluso anulada en todas las respuestas analizadas. Mientras que las que contenían la región Nt WT (*Wild Type*) no podían unir el DNA (como las formas NtHD y la ATHB4_{N210A}, con un cambio de la Asn210 por una Ala). Estas tenían una actividad biológica similar a la de ATHB4 silvestre en la respuesta del hipocotilo y/o expresión génica (respuestas del SAS) pero carecían de actividad en la regulación de la polaridad de las hojas (Bou-Torrent et al. 2012; Brandt et al. 2012; Turchi et al. 2015). Puesto que ATHB4 podía actuar en el control del alargamiento del hipocotilo y cambios en la expresión génica en respuesta a sombra simulada de manera independiente a la unión al DNA, pero no en la regulación de la polaridad de las hojas, donde requería disponer de la actividad de unión al DNA intacta, estos resultados sugerían que ATHB4 mostraba dos mecanismos de acción complementarios: como un factor de transcripción (que une directa y específicamente al DNA) en procesos biológicos como la regulación de la polaridad de las hojas, y como cofactor transcripcional (que no precisa unir al DNA) en la regulación de la respuesta a sombra del hipocotilo (Gallemí et al. 2017).

Esta actividad dual nos resultó muy interesante. Por lo que como primer objetivo concreto de esta tesis nos propusimos analizar en profundidad este doble mecanismo de acción de ATHB4 utilizando una aproximación diferente: estudiando el efecto de la sobreexpresión de *ATHB4* fusionado a *VP16* (del virus *Herpes Simplex* de animales), que codifica un dominio con una fuerte capacidad activadora de la transcripción (Tiley et al. 1992; Hagmann, Georgiev, and Schaffner 1997) en plantas de *A. thaliana* (líneas pMJ4, *35S:ATHB4-VP16*). Una aproximación similar se empleó para demostrar que PAR1, una bHLH atípica que regula las respuestas del SAS, no es capaz de unir el DNA y actúa como un cofactor transcripcional (Galstyan et al 2011). Como se ha descrito anteriormente, ATHB4 es un represor transcripcional, con lo que reprime la expresión de sus genes diana directos (Gallemí et al. 2017). El razonamiento detrás de esta fusión es que si ATHB4 se comporta como cofactor transcripcional, las proteínas ATHB4 y ATHB4-VP16 no se unirían a los promotores de los genes que regulan; como consecuencia, la actividad transcripcional de ambas proteínas debería ser similar. Por el contrario, si ATHB4 se comporta como un factor de transcripción, la unión de las proteínas ATHB4 o ATHB4-VP16 a los promotores de sus genes diana resultaría en actividades biológicas opuestas (represión y activación de la transcripción, respectivamente). A nivel fenotípico, ambas formas tendrían probablemente efectos diferentes en la regulación de la polaridad de las hojas, proceso que hemos postulado que se regula por ATHB4 actuando como un factor transcripcional. En cambio, si ATHB4 no une al DNA en la regulación del alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra simulada, esperaríamos que la respuesta del hipocotilo de las líneas *35S:ATHB4-GFP* y *35S:ATHB4-VP16* fuera similar; por el contrario, si nuestra hipótesis no fuese correcta y ATHB4 une el DNA, la respuesta a sombra simulada de estas líneas transgénicas sería diferente.

Tras la transformación de *Arabidopsis* para la sobreexpresión de *ATHB4-VP16* obtuvimos un total de 35 plantas transgénicas independientes (transformantes primarios, T1). En la generación T2 se determinó que un total de 9 líneas tenían una inserción de T-DNA, que en la generación T3 llevamos a homocigosis. Comparamos la respuesta a sombra simulada en tres líneas transgénicas homocigotas independientes *35S:ATHB4-VP16* con el de la sobreexpresión constitutiva de *ATHB4* fusionada a *GFP* (*35S:ATHB4-GFP*) (disponible en el laboratorio) y el de plántulas silvestres (ecotipo Columbia-0, de ahora en adelante Col-0) (**Figura R1.2**). Para este tipo de experimentos, las plantas germinaron (día 0, d0) y crecieron a 22°C durante 2 días (d2) en luz blanca continua (W). A partir de este día las plántulas se mantuvieron en W o se transfirieron a sombra simulada (W+FR) hasta el día 7 (d7) (**Figura R1.2A**). Como se vio anteriormente, las plántulas Col-0 tratadas con sombra simulada mostraban hipocotilos más largos que las mantenidas en W. Además, los hipocotilos de la línea *35S:ATHB4-GFP* eran más largos que los Col-0 en W pero se alargaban menos en respuesta a sombra simulada que los silvestres, resultados consistentes con los observados con líneas inducibles *35S:ATHB4-GR* (Sorin et al. 2009). Los hipocotilos de las plántulas *35S:ATHB4-VP16* eran como los silvestres en W; y dos de las líneas analizadas (#035 y #065) respondían menos a W+FR, (**Figura R1.2B**) mostrando un fenotipo similar al de las líneas *35S:ATHB4-GFP*.

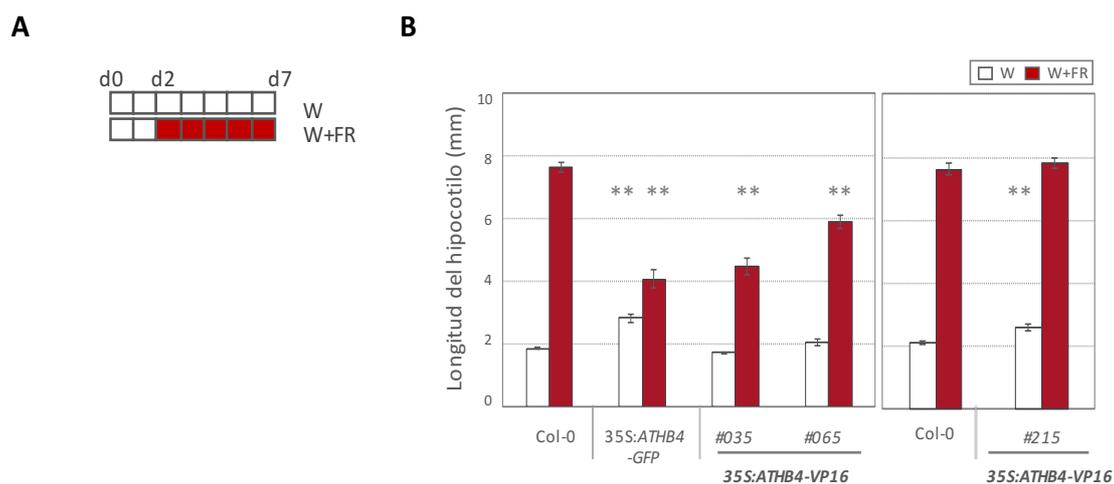


Figura R1.2. Longitud del hipocotilo de plántulas de *A. thaliana* que sobreexpresan variantes de *ATHB4* en respuesta a la sombra simulada. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas germinaron (día 0, d0) y crecieron a 22°C durante 2 días (d2) en luz blanca continua (W); posteriormente se mantuvieron en W o se transfirieron a W enriquecida con luz roja lejana (W+FR) hasta el día 7 (d7). **(B)** Longitud de los hipocotilos de plántulas silvestres Col-0, y líneas transgénicas *35S:ATHB4-GFP* y *35S:ATHB4-VP16* cultivadas como se indica en **A**. Las barras representan la media de la longitud y el SE de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre cada genotipo y Col-0 para cada condición de luz (Prueba t de Student; ** $P < 0,01$).

A continuación, analizamos estas líneas mediante RT-qPCR para cuantificar los niveles de *ATHB4* en plántulas transgénicas de d7 (**Figura R1.3**). La expresión de *ATHB4* era significativamente más alta que en Col-0 en plántulas *35S:ATHB4-GFP* y las de las líneas *35S:ATHB4-VP16* #035 y #065, mientras que en las de la línea #215, con fenotipo silvestre, los niveles de expresión eran similares a las plántulas silvestres (sin diferencias significativas); por este motivo nos focalizamos para los posteriores análisis en las líneas *35S:ATHB4-VP16* #035 y #065. Además, la expresión de

ATHB4 se observó significativamente incrementada tras el tratamiento de sombra simulada en todos los casos.

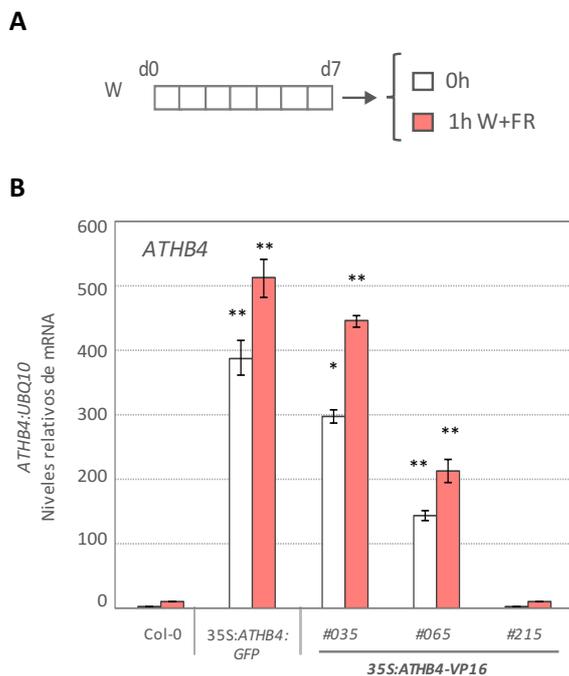


Figura R1.3. Comparación de los niveles de *ATHB4* en plántulas que sobreexpresan *ATHB4-GFP* y *ATHB4-VP16* en respuesta a la sombra simulada. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas crecieron a 22°C en W durante 7 días (d7) y se trataron durante 1 h con W+FR. Se recolectaron muestras inmediatamente antes (0h) y después de 1 h de W+FR (1h). **(B)** Niveles de mRNA de *ATHB4* en plántulas Col-0, *35S:ATHB4-GFP* y *35S:ATHB4-VP16* cultivadas como se describe en A. Se representa la media de tres réplicas biológicas, normalizada a los niveles de transcrito del gen *UBQ10*, y el SE. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre cada genotipo y Col-0 para cada condición de luz (Prueba t de Student; *P<0,05; ** P<0,01).

En base a datos previos del laboratorio, *ATHB4* se une directamente a los promotores de *ATHB2* y *HAT2*, mientras que el promotor del gen *OPT1* carece de sitios consenso de unión de *ATHB4* (Gallemi et al. 2017). Estos datos se han interpretado como indicativos de que *ATHB4* reprimiría la expresión de *ATHB2* y *HAT2* como un factor de transcripción, y la de *OPT1* como un cofactor transcripcional. A continuación, comparamos la expresión de los genes *OPT1* (gen no regulado por sombra simulada), *ATHB2* y *HAT2* (genes marcadores de la respuesta a sombra simulada) (Steindler et al. 1999; Sawa et al. 2002; Roig-Villanova et al. 2007; Sorin et al. 2009) en Col-0, y las líneas *35S:ATHB4-VP16* (#035, #065) y *35S:ATHB4-GFP* (Figura R1.4). La expresión de *OPT1*, que no se inducía en respuesta a W+FR, se reprimía en todas las líneas de sobreexpresión de las formas de *ATHB4* respecto a la línea Col-0 (Figura R1.4B). Sin embargo, la inducción por W+FR de la expresión de los genes marcadores de sombra, *ATHB2* y *HAT2*, estaba atenuada en la línea *35S:ATHB4-GFP* e incrementada en las líneas *35S:ATHB4-VP16* (Figura R1.4C-D). Estos resultados sugerían que *ATHB4-VP16* resulta en una proteína con actividad transcripcional activadora, en contraste con la de la proteína *ATHB4-GFP*, y que regula la expresión génica tanto por unión al DNA, actuando como un factor de transcripción (caso de *ATHB2* y *HAT2*) como sin unir al DNA (caso de *OPT1*) actuando como un cofactor transcripcional.

En resumen, *ATHB4* regula la expresión génica tanto actuando como un factor de transcripción (caso de *ATHB2* y *HAT2*) o como un cofactor transcripcional (caso de *OPT1*). Además, la actividad biológica de *35S:ATHB4-VP16* y de *35S:ATHB4-GFP* en la regulación del alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra simulada es similar, ya que los hipocotilos se alargan menos en respuesta a W+FR que los silvestres, sugiriendo que *ATHB4* modula la respuesta del hipocotilo sin unir a DNA, de acuerdo con nuestra hipótesis previa.

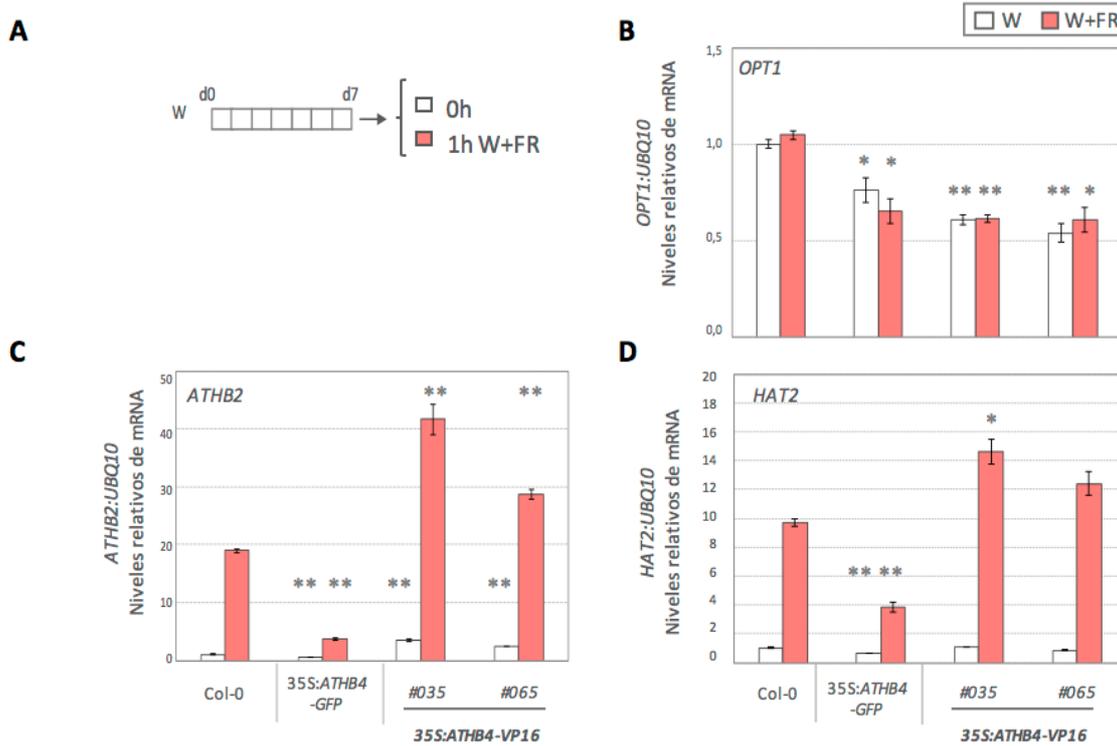


Figura R1.4. Efecto de la sobreexpresión de *ATHB4-VP16* y *ATHB4-GFP* en la expresión de los genes *OPT1*, *ATHB2* y *HAT2* en plántulas de *A. thaliana* en respuesta a la sombra simulada. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas se crecieron tal y como se detalla en la Figura R1.3. (B-D) Niveles de mRNA de *OPT1* (B), *ATHB2* (C) y *HAT2* (D) en plántulas Col-0, *35S:ATHB4-GFP* y *35S:ATHB4-VP16* cultivadas como se describe en A. Se representa la media de tres réplicas biológicas, normalizada a los niveles de transcrito del gen *UBQ10*, y el SE. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre cada genotipo y Col-0 para cada condición de luz (Prueba t de Student; *P<0,05; **P<0,01).

Tras estos resultados, nos planteamos estudiar el papel de *ATHB4* en la regulación de la polaridad de las hojas de la roseta en plantas adultas (Bou-Torrent et al. 2012). Por tanto, comparamos este carácter en las líneas de sobreexpresión *35S:ATHB4-VP16* y en la línea inducible *35S:ATHB4-GR* (tratada con dexametasona) en plantas adultas crecidas en W y en W+FR (Figura R1.5). En estos experimentos dejamos de utilizar la línea *35S:ATHB4-GFP* (debido a que en estadio adulto el fenotipo se perdió), pasando a utilizar la línea *35S:ATHB4-GR*.

Utilizando el mismo razonamiento anterior, a nivel fenotípico, si *ATHB4* no unía al DNA, esperábamos que tanto las hojas de *ATHB4-VP16* como las de *35S:ATHB4-GR* tratadas con DEX mostraran la misma actividad biológica: se curvaran hacia arriba. Por el contrario, si como habíamos postulado *ATHB4* unía al DNA para regular la polaridad de las hojas, esperábamos que la acción de *ATHB4-VP16* fuera opuesta a la de *ATHB4*. Para estos ensayos las rosetas de plantas crecidas en fotoperiodo de día corto (Short Day, SD; 8h W/16h D) de 3 semanas desde la germinación, se trataron diferencialmente con luz W o W+FR. En el caso de líneas inducibles *35S:ATHB4-GR*, el tratamiento diferencial con W+FR se combinó con aplicaciones continuadas de 10 µL de 5 µM Dexametasona (+DEX) en la región del meristemo apical (indicadas con flechas, Figura R1.5).

En día 30 se fotografiaron las rosetas (**Figura R1.5B, D, F, H, J, L**) y series heteroblásticas de sus hojas (**Figura R1.5C, E, G, I, K, M**) de plantas Col-0 (**Figura R1.5B-E**), *35S:ATHB4-GR* (tratadas con DEX) (**Figura R1.5F-I**) y *35S:ATHB4-VP16* (**Figura R1.5J-M**). En las imágenes de las series heteroblásticas, las hojas se iluminaron desde la izquierda; de esta manera, las sombras proyectadas informaban de la curvatura de la lámina foliar.

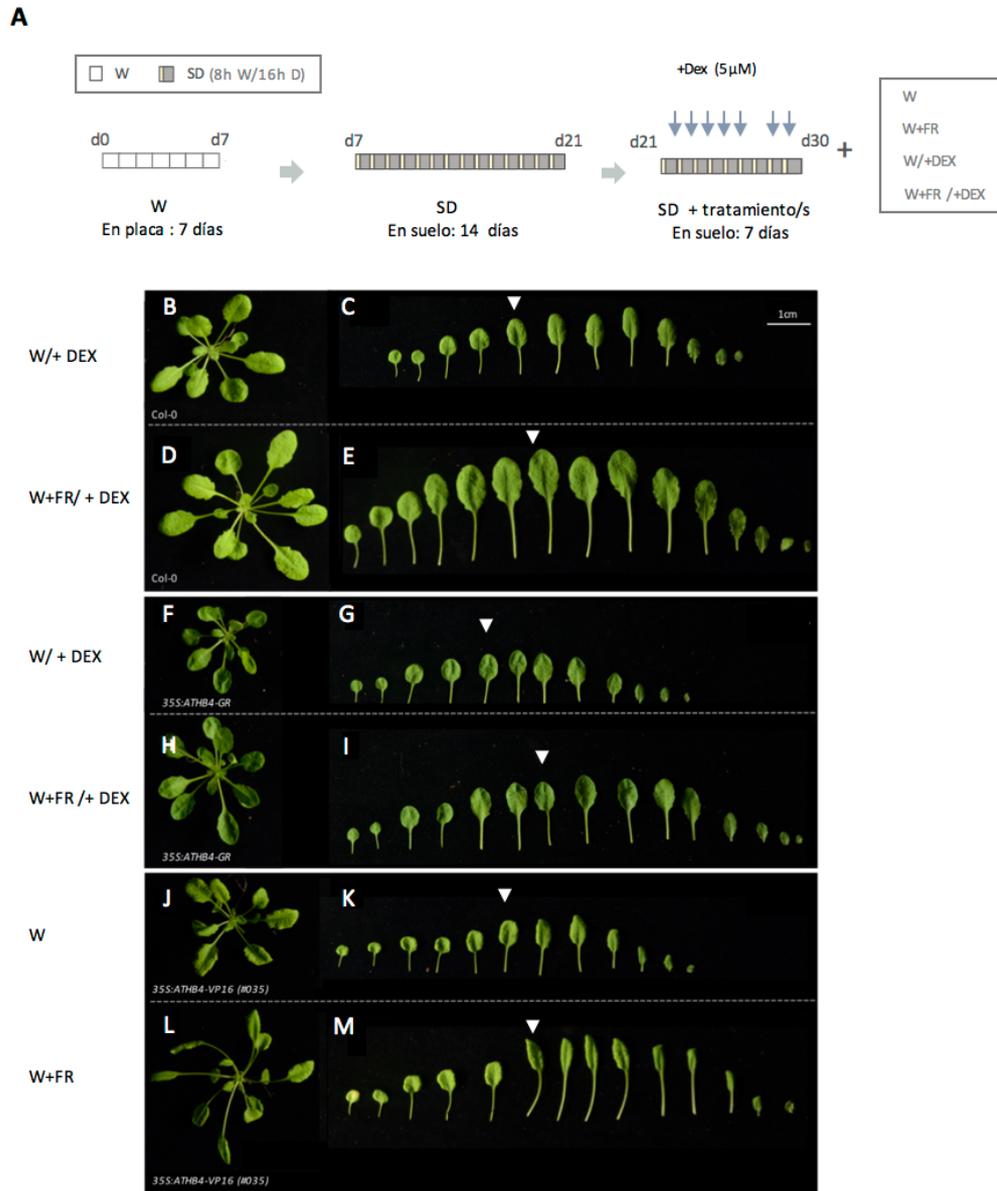


Figura R1.5. Efecto de la sombra simulada y la sobreexpresión de *ATHB4-VP16* y *ATHB4-GR* en el aspecto de las rosetas. (A) Esquema del procedimiento empleado para los ensayos de polaridad de las hojas. Plántulas de 7 días de edad (d7) crecidas a 22°C con luz W se pasaron a tiestos individuales y se crecieron en fotoperiodo de día corto (Short Day, SD; 8h W/16h D). A partir de la tercera semana (d21 desde la germinación), las plantas se trataron diferencialmente con luz W o W+FR (durante la fase luminosa del fotoperiodo); en el caso de líneas inducibles (por ejemplo, *35S:ATHB4-GR*) el tratamiento diferencial con W+FR se combinó con aplicaciones de 10 µL de 5 µM Dexametasona (+DEX) en la región del meristemo apical (indicadas con flechas). En día 30 se realizaron las fotografías de las rosetas y de las hojas de plantas Col-0 (**B-E**), *35S:ATHB4-GR* (**F-I**) y *35S:ATHB4-VP16* (**J-M**). Aspecto de las rosetas (**B, D, F, H, J, L**) y serie

heteroblástica de las hojas analizadas (**C, E, G, I, K, M**). La punta de flecha indica la hoja que estaba emergiendo (<0.5 mm) en el momento en que se iniciaron los tratamientos.

También realizamos cortes transversales de hojas (3 mm) para mostrar el efecto de la sobreexpresión de las líneas en la respuesta a la sombra (**Figura R1.6**). A pesar de que en nuestros experimentos incluimos Col-0 tratado con DEX (+DEX) o sin tratar, como control de *35S:ATHB4-VP16*, que no requiere DEX, como el fenotipo es idéntico, sólo se incluyen las imágenes de Col-0 tratado con DEX. Este ensayo mostró que en las líneas *35S:ATHB4-GR* tratadas con DEX crecidas en W las hojas se curvaban hacia arriba, lo que sugería que la expansión relativa de la parte abaxial de las hojas era mayor que la adaxial. Por el contrario, en las líneas *35S:ATHB4-VP16* las hojas se curvaban hacia abajo, lo que sugería que en estas plantas el crecimiento de la parte abaxial era menor que la adaxial. El tratamiento de sombra simulada tanto en *35S:ATHB4-GR* como en *35S:ATHB4-VP16* producía un incremento de estos fenotipos.

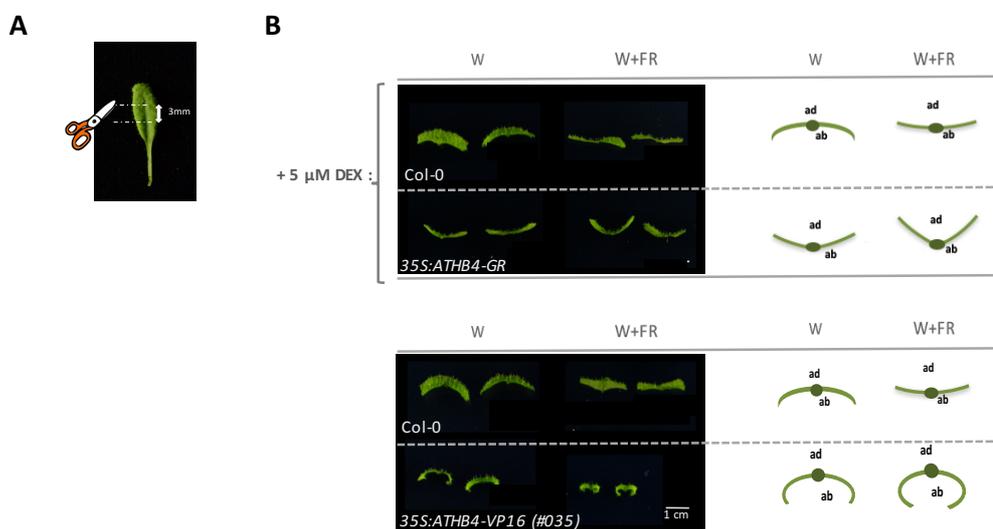


Figura R1.6. Efecto de la sombra simulada y la sobreexpresión de *ATHB4-VP16* y *ATHB4-GR* en la polaridad de las hojas. (A) Esquema del procedimiento seguido en la obtención de los cortes transversales de hojas mostrados en la parte **B**. **(B)** Cortes de hojas representativas de las plantas tratadas tal como se indica en la Figura R1.5 (izquierda) y esquema del efecto observado (derecha); cara adaxial (ad) y abaxial (ab) de las hojas; 5 μM de +DEX (como se indica en la Figura R1.5).

El análisis de la expresión de *ATHB4* en las hojas de las diferentes líneas transgénicas (**Figura R1.7**) mostró que la expresión del transgen en las plantas *35S:ATHB4-GR* tras tratar las plantas con DEX y sombra simulada no variaba significativamente (**Figura R1.7A**). En el caso de las líneas *35S:ATHB4-VP16*, la expresión del transgen se incrementaba significativamente en respuesta a W+FR sólo en las plantas #035 (**Figura R1.7B**).

Esto nos indicaba que en hojas de roseta la expresión del transgen o bien no estaba afectada por el tratamiento de sombra, o la heterogeneidad del material vegetal recogido era alta y enmascaraba las diferencias encontradas en estado de plántula (**Figura R1.3**).

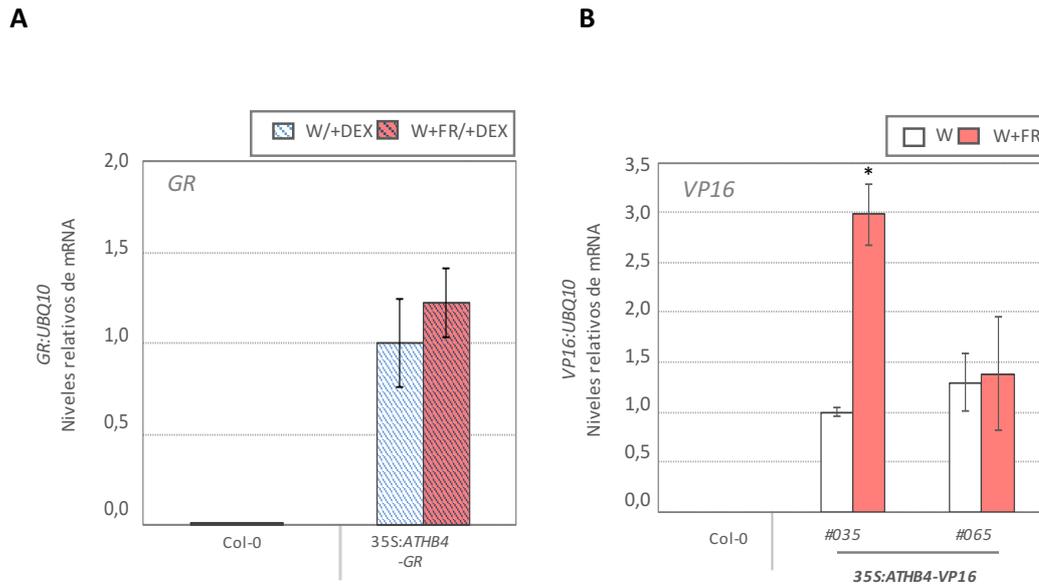


Figura R1.7. Comparación de los niveles de *ATHB4* en hojas de plantas *ATHB4-GR* y *ATHB4-VP16* en respuesta a sombra simulada. Las plantas se crecieron tal y como se detalla en la Figura R1.5A. Niveles de mRNA de *ATHB4-GR* (A) o *ATHB4-VP16* (B) en plantas cultivadas como se describe en Figura R1.5A. Las barras representan la media normalizada a los niveles de transcrito del gen *UBQ10* y el SE de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre la expresión antes y después del tratamiento de sombra simulada para cada genotipo (Prueba t de Student; *P<0,05).

Este conjunto de resultados es consistente con los obtenidos previamente en el laboratorio, sobreexpresando diversas formas truncadas de *ATHB4* que sugerían que *ATHB4* actúa como un factor de transcripción en la regulación de la polaridad foliar.

Como se ha descrito anteriormente, el estudio de las formas truncadas de *ATHB4* indicó que la región Nt era necesaria para la actividad de *ATHB4* tanto como factor como cofactor de transcripción. Debido a la poca información disponible sobre esta región, nos planteamos buscar posibles interactores de *ATHB4* vía la región Nt y analizar la relevancia biológica de dichas interacciones.

1.2. Identificación y análisis de la relevancia biológica de los interactores vía el N-terminal de ATHB4 en la regulación del SAS.

1.2.1. Búsqueda de interactores de ATHB4 por cribado de doble híbrido (Y2H).

Está descrito que los distintos miembros de la familia HD-Zip II tienen una gran homología de secuencia, especialmente en los dominios HD, responsable de la unión al DNA, y Z, responsable de la dimerización con cremalleras de Leucinas (Ariel et al. 2007). En nuestro laboratorio se dividió ATHB4 en cuatro regiones o dominios (residuos): Nt, HD, Z y Ct (**Figura R1.1A**). En algunas de estas regiones se encuentran motivos de gran relevancia para la función de ATHB4 (**Figura R1.1B**): en el HD hay una señal de localización nuclear (*Nuclear Localization Signal, NLS*) y la región Nt que contiene dos motivos EAR muy conservados (LxLxLxL y LNLxL) (Hiratsu et al. 2003; Kagale et al. 2010; Kagale & Rozwadowski 2011). Estos motivos se han implicado en la represión transcripcional y en la interacción proteína-proteína (Szemenyei et al. 2008; Kagale & Rozwadowski 2011; Pauwels et al. 2010).

Tras un escrutinio empleando el sistema de doble híbrido de levadura (Y2H, del inglés *Yeast Two Hybrid*, realizado por la compañía *Hybrigenics*) con la proteína ATHB4 entera, se identificaron más de 70 interactores de ATHB4. Entre ellos, nos centramos en TOPLESS (TPL), TPL-RELATED 4 (TPR4) y SEUSS (SEU) que codifican correpresores transcripcionales (Wang, Kim, and Somers 2013; Ke et al. 2015; Causier, Ashworth, et al. 2012; Sitaraman, Bui, and Liu 2008). Se ha descrito que TPL y TPRs interactúan con proteínas que contienen motivos EAR (Pauwels et al. 2010b; Causier, Lloyd, et al. 2012; Wang, Kim, and Somers 2013), lo que nos llevó a pensar que podrían ser candidatos a actuar conjuntamente con ATHB4, que hemos descrito como un represor de la transcripción (Gallemí et al 2017). Para validar las interacciones entre proteínas se realizaron dos técnicas complementarias: Y2H y Complementación de Fluorescencia Bimolecular (*Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC*). En nuestro laboratorio pusimos a punto el ensayo de Y2H basado en el *mating* (apareamiento) de cepas haploides. Se transformaron células competentes de la cepa pJ694 α con los plásmidos derivados del dominio de unión al DNA de GAL4 (BD), y las de la cepa YM4271a con plásmidos derivados del dominio de activación de GAL4 (AD). Como controles negativos se utilizaron los plásmidos vacíos (-), que sólo contienen el BD o el AD, y como controles positivos de interacción los plásmidos BD-p53 y AD-SV40 T-antigen. Después de seleccionar separadamente los transformantes obtenidos mediante los plásmidos individuales se combinaron mediante el *mating* de las cepas transformadas haploides, se sembraron gotas de 4 μ L de diluciones seriadas en medios mínimos para levaduras SD (del inglés, *Synthetic Defined*) sin leucina (L) ni triptófano (W) (SD-LW) y medios SD sin histidina (H), L, ni W (SD-HLW). En SD-LW se observaba crecimiento en todas las combinaciones, lo que indicaba que el *mating* había funcionado correctamente. La interacción entre proteínas se comprobaba en medio SD-HLW, donde no se esperaba crecimiento de los controles negativos y sí del control positivo. Mediante este ensayo, se vio que la región Nt de ATHB4 (Nt-ATHB4) no interactuaba con la forma entera de TPL (datos no mostrados). Varios autores utilizaban exclusivamente el dominio Nt de TPL en ensayos Y2H (Szemenyei, Hannon, and Long 2008; Ke et al. 2015); además, en el cribado Y2H se identificó que la parte Nt de TPL era la que interactuaba con la proteína ATHB4 entera. Así, se analizó la interacción del Nt-ATHB4 con el Nt de TPL (Nt-TPL; 1-242) (**Figura R1.8A**). No había crecimiento en medio SD-HLW en la combinación que produce las proteínas BD-Nt-ATHB4 + AD-Nt-ATHB4 (#5) indicativo de que Nt-ATHB4 no era capaz de homodimerizar vía el Nt. Sí

observamos crecimiento en medio SD-HLW en la combinación que expresa las proteínas BD-Nt-ATHB4 y AD-Nt-TPL (8) y en la combinación BD-Nt-TPL y AD-Nt-ATHB4 (#9), indicativo de que la región Nt de ATHB4 (Nt-ATHB4) interaccionaba con con Nt-TPL. Posteriormente, para el ensayo BiFC de la interacción entre las dos proteínas *in planta*, realizamos agroinfiltraciones en hojas de *N. benthamiana*. No observamos fluorescencia en los controles negativos (**Figura R1.8B, paneles izquierda y central**), mientras que en la combinación YN-TPL + YC-ATHB4 se detectó fluorescencia en los núcleos, mostrando que la forma entera de ATHB4 interacciona con la forma entera de TPL (**Figura R1.8B, panel derecha**).

Este conjunto de resultados indicaba que ATHB4 y TPL interaccionaban vía sus regiones Nt. A partir de estos resultados hipotetizamos que la interacción entre ATHB4 y TPL podría darse vía los motivos EAR presentes en la región Nt-ATHB4 y el dominio *LisH* presente en la región Nt-TPL (Szemenyei, Hannon, and Long 2008; Causier, Ashworth, et al. 2012)). Esta hipótesis será abordada más adelante en la sección 1.3 de la tesis.

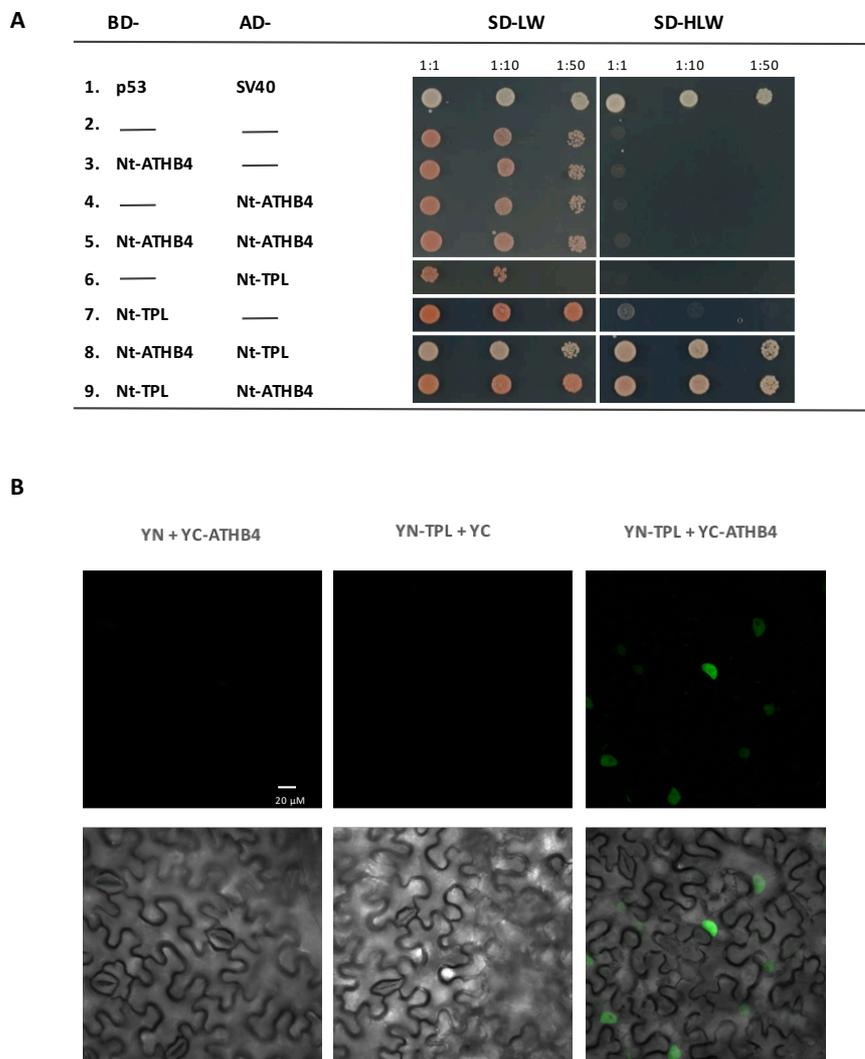


Figura R1.8. Análisis de interacción entre ATHB4 y TPL. (A) Ensayo de doble híbrido en levadura (Y2H). A la izquierda se indica las combinaciones de proteínas híbridas empleadas en el ensayo. A la derecha se muestran las diluciones de cultivos crecidos a partir de colonias resultantes del *mating* en medios selectivos SD-LW y SD-HLW. Todos los ensayos se realizaron mínimo dos veces obteniendo resultados iguales. La fusión del BD a la forma truncada de la murina p53 (en pVA3) y la fusión del AD al SV40 large T-

antigen (Simian Vacuolating Virus 40 Tag; en pTD1) se usaron como control positivo de la interacción, y los vectores vacíos (BD y AD) como negativos. Nt-ATHB4, aminoácidos 1-142 de ATHB4; Nt-TPL, aminoácidos 1-242 de TPL. **(B)** Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC) en hojas de *N. benthamiana* tras 3 días de la agroinfiltración de las proteínas fusionadas a YN- y YC- indicadas. Se muestran imágenes de fluorescencia en confocal de células epidérmicas (paneles de arriba) e imágenes sobrepuestas de fluorescencia y campo claro (paneles de abajo). YN, parte Nt de la Yellow fluorescent protein (YFP); YC, parte Ct de la YFP; YN-TPL, YN fusionado a la proteína TPL entera; YC-ATHB4, YC fusionado a la proteína ATHB4 entera. Se utilizaron como controles negativos YN-TPL+ YC (vacío) y YN- (vacío) + YC-ATHB4.

Tras validar la interacción de TPL con ATHB4, nos planteamos si TPL tendría un papel en sombra. Por ello estudiamos la respuesta del hipocotilo a sombra simulada en plantas con la función alterada de TPL. Los hipocotilos de plántulas *pTPL:TPL-HA* (sobreexpresión bajo el promotor endógeno de *TPL*, *pDS1*), mostraban una respuesta a la sombra simulada ligeramente atenuada respecto a la de las plántulas Col-0 (**Figura R1.9**).

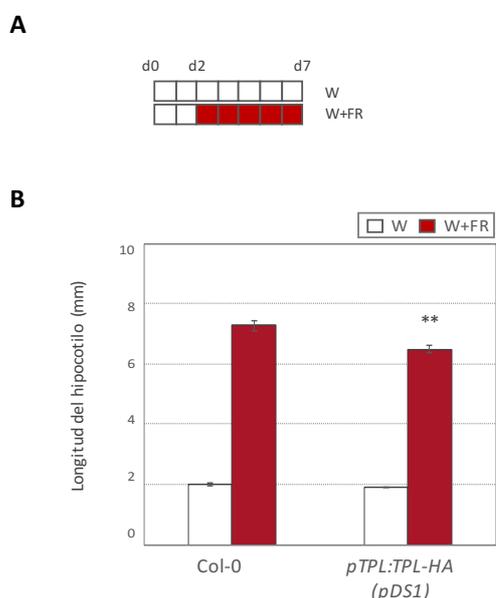


Figura R1.9. Efecto de la sobreexpresión de *TPL* en la longitud del hipocotilo en respuesta a la sombra simulada. **(A)** Esquema del tratamiento realizado. Las plantas se crecieron tal y como se detalla en la Figura R1.2. **(B)** Longitud del hipocotilo de plántulas silvestres Col-0 y *pTPL:TPL-HA* cultivadas como se indica en **A**. Las barras representan la media de la longitud y el SE de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas en la longitud de los hipocotilos entre genotipos para cada condición indicada (Prueba t de Student; ** P<0,01).

A continuación, analizamos por RT-qPCR la expresión de genes marcadores de sombra simulada, *ATHB4*, *ATHB2* y *SAUR15* (**Figura R1.10**). Observamos que en las plántulas *pTPL:TPL-HA* crecidas en W, el gen *ATHB2* se expresaba significativamente más que en Col-0. Además, la expresión de *ATHB4* y *ATHB2* se inducía ligera pero significativamente más que en Col-0 tras 8h de tratamiento de sombra simulada; otros casos como *SAUR15* (**Figura R1.10D**), *XTR7* o *HAT2* (datos no mostrados) no mostraban cambios.

Este conjunto de resultados indicaban que un incremento de los niveles de TPL (aumento del correpresor) resultaba en una inducción génica a tiempos largos por sombra de marcadores de sombra como *ATHB4* y *ATHB2*. Una posible explicación de estos resultados sería que TPL actuaría como un regulador positivo de la respuesta del alargamiento del hipocotilo en sombra simulada.

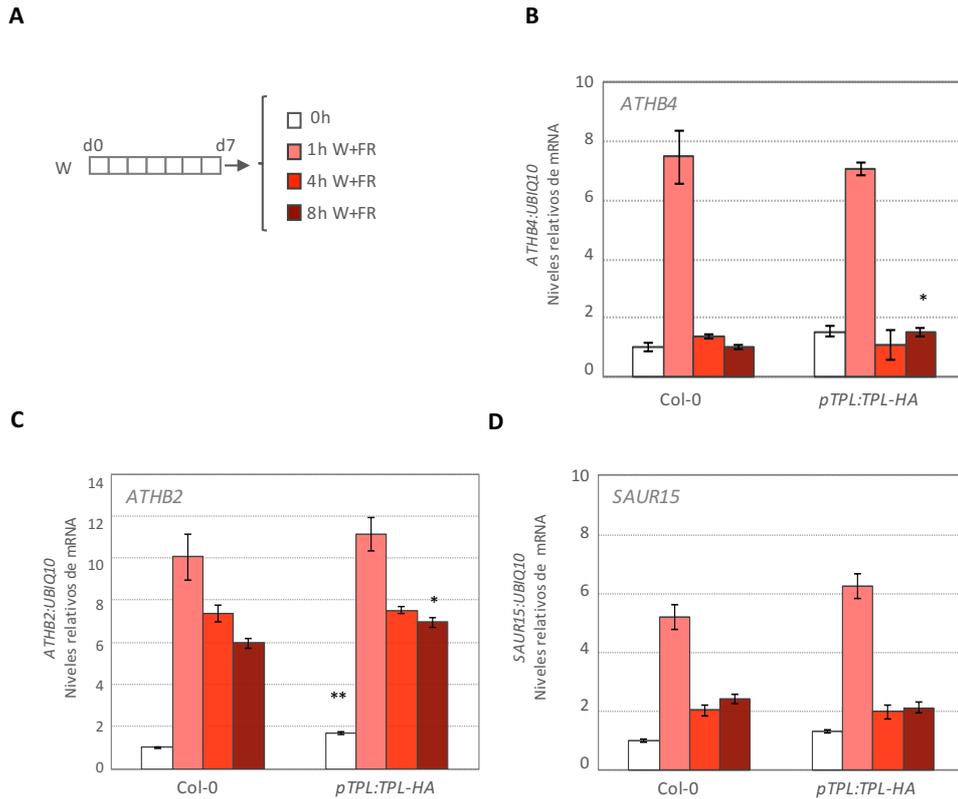


Figura R1.10. Efecto de la sobreexpresión de *TPL* en la expresión de los genes *ATHB4*, *ATHB2* y *SAUR15* en respuesta a sombra simulada. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas se crecieron tal y como se detalla en la Figura R1.3. Se recolectaron muestras antes (0h) y después de una (1h), cuatro (4h) y ocho horas (8h) de W+FR. **(B-D)** Niveles de mRNA de *ATHB4* **(B)**, *ATHB2* **(C)** y *SAUR15* **(D)** en plántulas Col-0 y *pTPL:TPL-HA* cultivadas como se describe en **A**. Se representa la media, normalizada a los niveles de transcrito del gen *UBQ10*, y el SE de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas para cada condición de luz respecto a Col-0 (Prueba t de Student; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

A continuación, se analizó el mutante dominante *tpl-1* (donde el residuo Asn176 está cambiado por una His) que actúa como un alelo dominante negativo para la familia TPL/TPR. Las plántulas de *tpl-1* son de ecotipo Landsberg *erecta-0* (de ahora en adelante *Ler-0*). Este mutante (*tpl-1*) muestra una diversidad de fenotipos, que varía desde plántulas con dos cotiledones (2C), con un solo cotiledón (1C), con cotiledones fusionados (F) incluso formando una copa (copa), y en plántulas sin parte aérea (fenotipo por el cual recibe el nombre). Analizamos el alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra simulada de estas plántulas que se distribuyeron por fenotipo y comprobamos que en general el mutante responde menos que el silvestre (**Figura R1.11**). La interpretación de los resultados era compleja, ya que no es fácil establecer si los efectos de la reducción de la respuesta a W+FR son directos (por la falta de TPL y TPRs) o indirectos (por los defectos en el desarrollo).

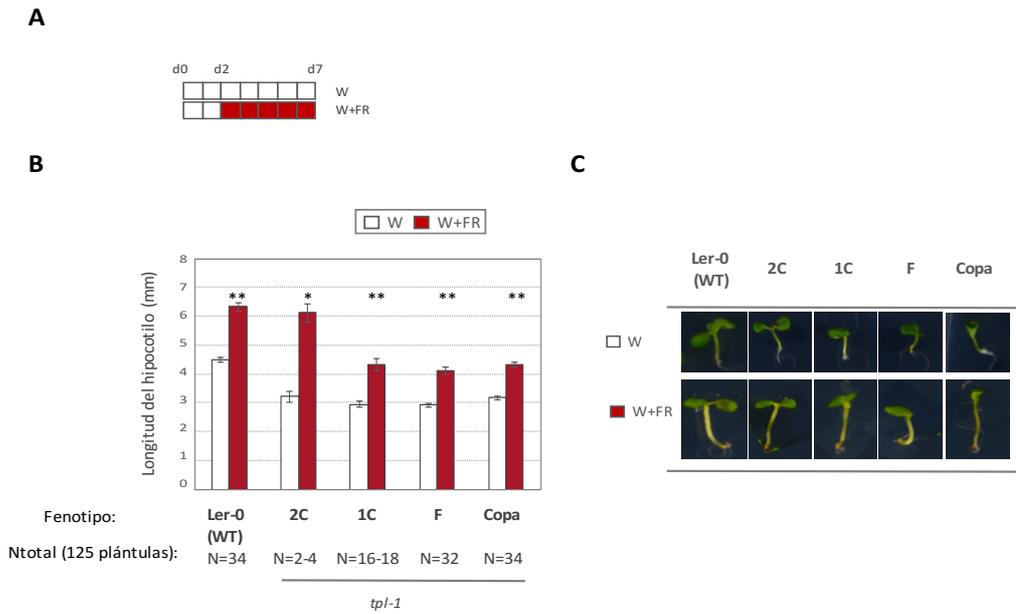


Figura R1.11. Efecto de la mutación *tpl-1* en la longitud del hipocotilo en respuesta a la sombra simulada. (A) Las plantas se crecieron tal y como se detalla en la Figura R1.2. **(B)** Longitud de los hipocotilos de plántulas silvestres *Ler-0* y la línea *tpl-1* cultivadas como se indica en A. Los datos de *tpl-1* se representan divididos en grupos según los diferentes fenotipos observados. Las barras representan la media de la longitud y el SE de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con W y W+FR (Prueba t de Student; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). **(C)** Aspecto de plantas representativas de los diferentes grupos mostrados en B. 2C: plántulas con dos cotiledones (aspecto WT), 1C: plántulas con 1 cotiledón, F: plántulas con cotiledones fusionados, Copa: plántulas con cotiledones fusionados con forma de copa.

El análisis por RT-qPCR de la expresión génica (**Figura R1.12**) mostró un incremento significativo en la inducción rápida por sombra simulada de la expresión de *ATHB2* (**Figura R1.12B**), pero no en otros como *SAUR15* (**Figura R1.12C**), *XTR7* o *HAT2* (no mostrados). Este conjunto de resultados era llamativo puesto que a pesar de los defectos morfológicos que presentaban las plántulas *tpl-1* los efectos moleculares sobre la inducción génica de *ATHB2* en respuesta a W+FR eran pequeños.

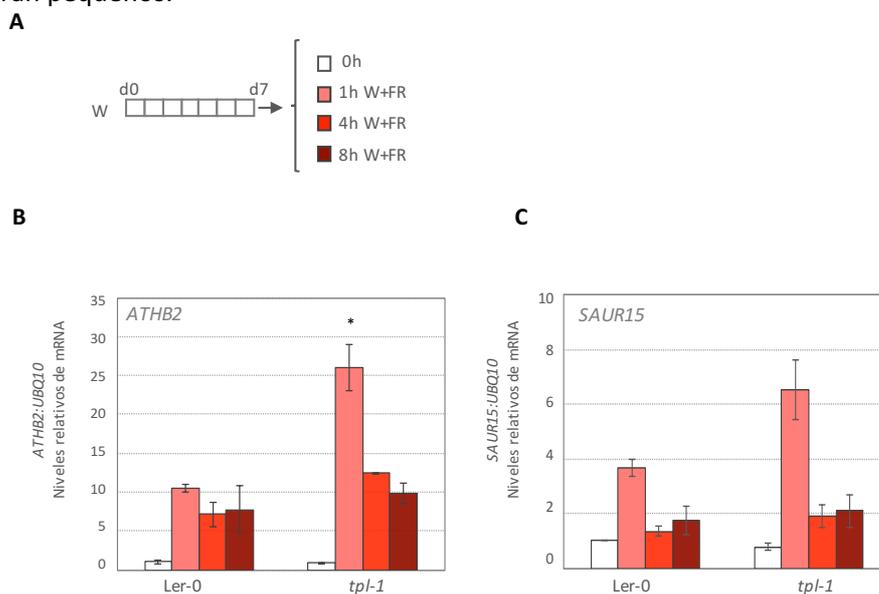
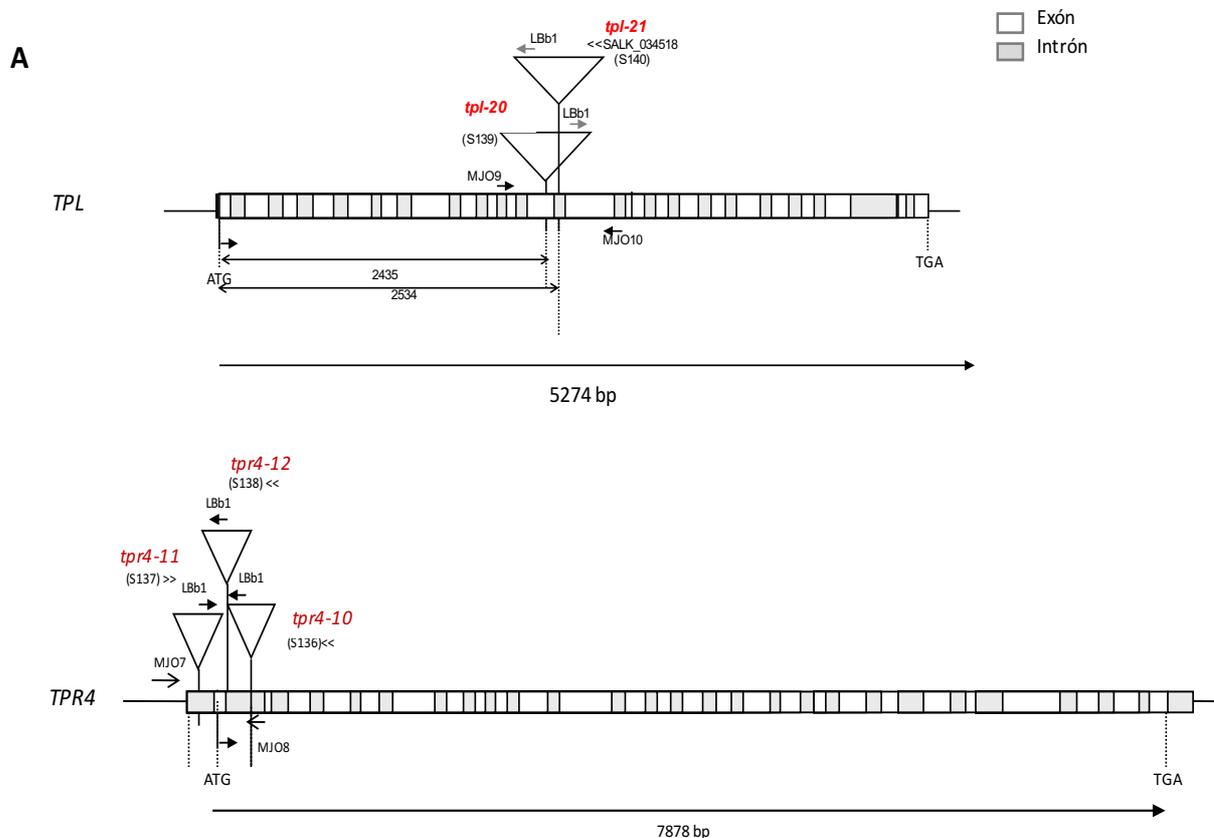


Figura R1.12. Efecto de la mutación de *tpl-1* en la expresión de los genes *ATHB2* y *SAUR15* en respuesta a sombra simulada. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas se crecieron tal y como se detalla en la Figura R1.10 **(B-C)** Niveles de mRNA de *ATHB2* **(B)** y *SAUR15* **(C)** en plántulas *Ler-0* y *tpl-1* cultivadas como se indica en **A**. Se representa las medias normalizadas a los niveles de transcrito del gen *UBQ10* y el SE de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre *tpl-1* y *Ler-0* para cada condición de luz (Prueba t de Student; *P<0,05).

Seguidamente quisimos comprobar si un mutante de pérdida de función por inserción mostraba respuestas más robustas para poder esclarecer el papel de TPL en respuesta a la sombra. Por este motivo se obtuvieron diversos mutantes de T-DNA de la colección Salk para *TPL* y *TPR4* **(Figura R1.13A)**. Seleccionamos por PCR mutantes en homocigosis utilizando los oligonucleótidos específicos correspondientes. Posteriormente se obtuvo el doble mutante *tpr4-10 tpr4-20* mediante el cruce de los dos mutantes simples **(Figura R1.13B)**, y se analizó el alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra simulada **(Figura R1.13C)**. Tanto los mutantes simples (*tpr4-10* y *tpr4-20*) como el doble mutante (*tpr4-10 tpr4-20*) presentaban hipocotilos igual de largos que las plantas silvestres en luz W, pero la respuesta a sombra simulada era significativamente menor en todos ellos. Estos resultados indicaban que TPL y TPR4 tendrían un papel positivo en la regulación del alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra simulada y actuaría como un represor transcripcional.

Las respuestas tanto de la sobreexpresión de TPL como del mutante *tpl-1* (dominante negativo), por lo que provoca una pérdida de función no eran muy claras y nos planteamos que la interacción *ATHB4* con TPL/TPRs no fuera la de mayor relevancia en la regulación del SAS.



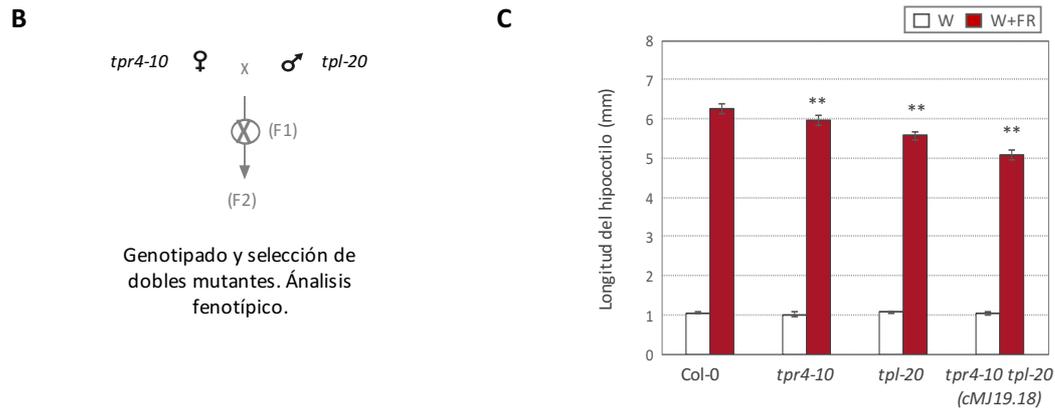


Figura R1.13. Longitud del hipocotilo de plántulas de pérdida de función en *TPL* y *TPR4* en respuesta a sombra simulada. (A) Esquema de la estructura genómica de *TPL* y *TPR4* y de distintas inserciones de T-DNA utilizadas en este estudio. Los oligonucleótidos usados para los genotipados están marcados con flechas y el nombre correspondiente. (B) Esquema del cruce realizado para la obtención del doble mutante *tpl-20 tpr4-10* (C) Longitud de los hipocotilos de plántulas silvestres Col-0, *tpr4-10*, *tpl-20* y *tpr4-10 tpl-20* cultivadas como se indica en la Figura R1.2. Las barras representan la media de la longitud y el SE de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas de los mutantes respecto a Col-0 para cada condición de luz (Prueba t de Student; ** P<0,01).

A continuación analizamos el papel de SEU, otro posible interactante de ATHB4 identificado en el mismo cribado de Y2H. SEU está descrito como una proteína que forma parte de complejos represores de la transcripción (Gregis et al. 2006; Pfluger and Zambryski 2004; Sridhar et al. 2004); no obstante, otros autores indican que SEU podría actuar como activador o represor dependiendo del contexto celular (Mannervik et al. 1999; Freiman and Tjian 2002; Pfluger and Zambryski 2004). Estas observaciones nos llevaron a profundizar en la interacción SEU-ATHB4, y si esta interacción tenía relevancia en la regulación del SAS. Con el objetivo de validar la interacción de ATHB4 con SEU repetimos la misma metodología que habíamos utilizado anteriormente. En primer lugar, mediante ensayos Y2H observamos crecimiento en medio SD-HLW de los controles positivos (combinaciones #1 y #5) y en el caso de la combinación BD-SEU y AD-Nt-ATHB4 (combinación #7), que indicaba que SEU interactuaba con Nt-ATHB4 (**Figura R1.14A**). En los ensayos BiFC detectamos fluorescencia sólo en núcleos de las células epidérmicas de *N. benthamiana* transformadas con la combinación YN-SEU + YC-ATHB4 (**Figura R1.14**), indicando que la forma entera de ATHB4 interactúa con la forma entera de SEU.

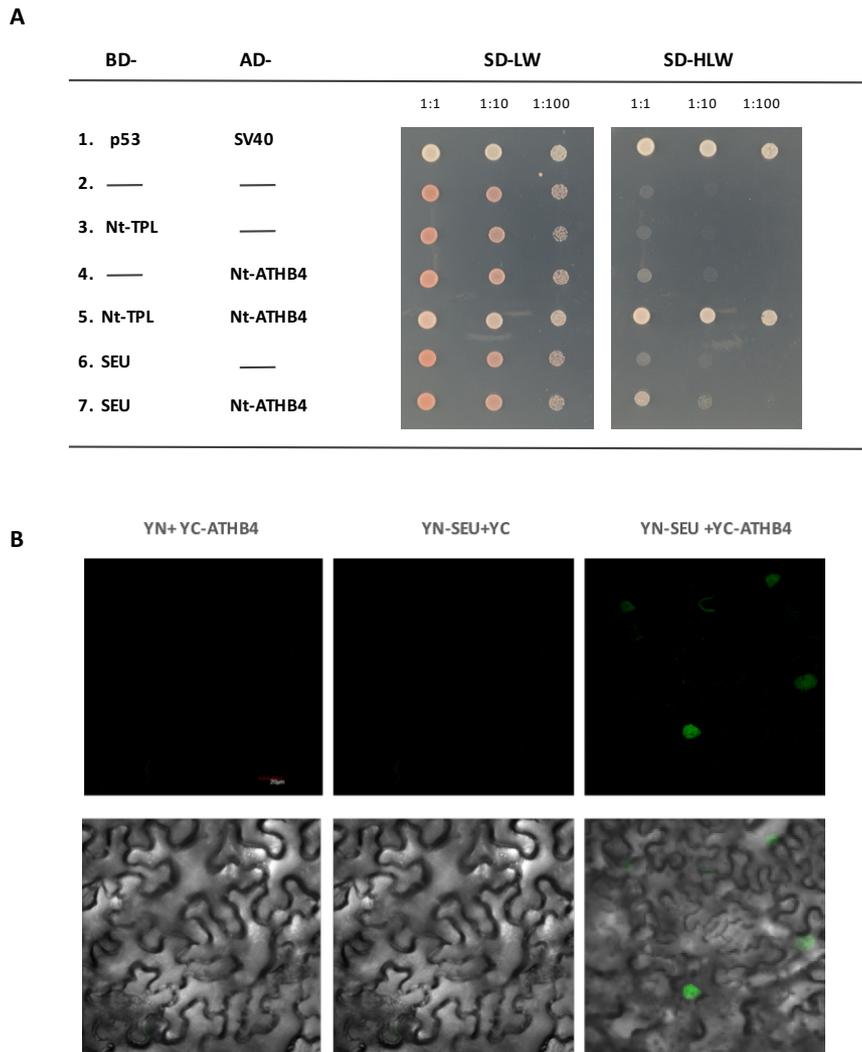


Figura R1.14. Análisis de interacción entre ATHB4 y SEU. (A) Ensayo de doble híbrido en levadura (Y2H). Experimento realizado como se detalla en Figura R1.8A. SD-LW y SD-HLW se refiere a los medios selectivos de transformación y de interacción entre las proteínas híbridas, respectivamente. Todos los ensayos se realizaron un mínimo de dos veces obteniendo resultados iguales. La combinación de las proteínas de fusión BD-p53 y AD-SV40 se usó como control positivo de interacción y los vectores vacíos, como negativos. Nt-ATHB4, aminoácidos 1-142 de ATHB4; SEU, proteína SEU entera. **(B)** Ensayo de BiFC en hojas de *N. benthamiana* tras 3 días de la agroinfiltración de las proteínas fusionadas a YN- y YC- indicadas. Se muestran imágenes de fluorescencia en confocal de células epidérmicas (paneles de arriba) e imágenes sobrepuestas de fluorescencia y campo claro (paneles de abajo). YN, parte Nt de la YFP; YC, parte Ct de la YFP; YN-SEU, YN fusionado a la proteína SEU entera; YC-ATHB4, YC fusionado a la proteína ATHB4 entera. Se utilizaron como controles negativos YN- (vacío) + YC-ATHB4 y YN- ATHB4 + YC- (vacío).

Obtuvimos un mutante de pérdida de función de SEU (*seu-3*) que contiene una mutación puntual que introduce un codón stop temprano en la secuencia de la proteína (**Figura R1.15A**). La respuesta de alargamiento del hipocotilo a sombra simulada estaba fuertemente atenuada en plántulas *seu-3* respecto las plántulas silvestres (**Figura R1.15C**).

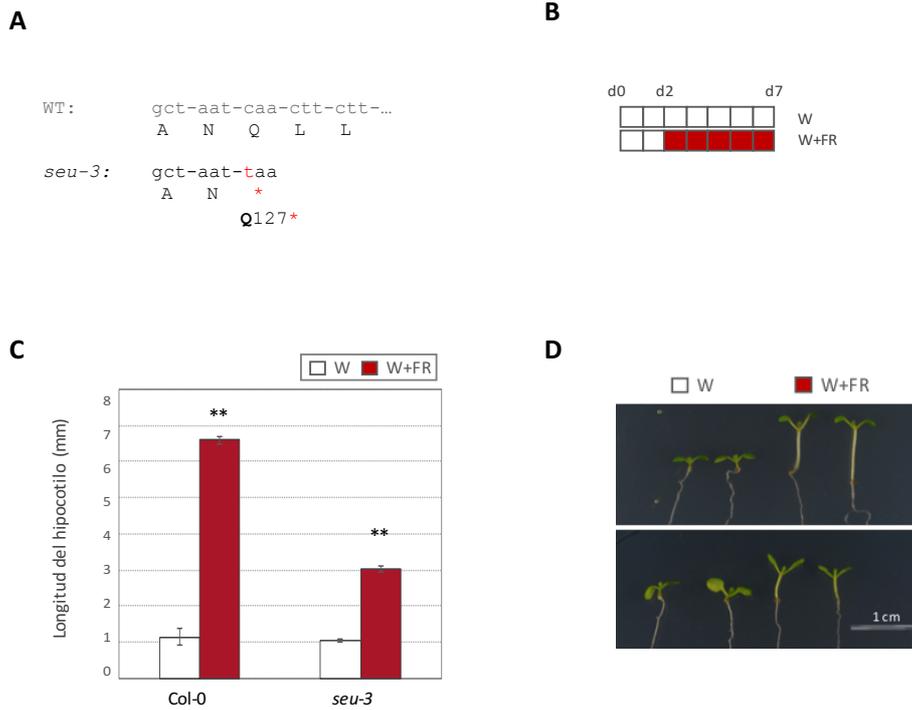


Figura R1.15. Efecto de la pérdida de función SEU en la longitud del hipocotilo en respuesta a sombra simulada. (A) Detalle de la secuencia de DNA donde se muestra la localización del cambio de nucleótido que contiene el mutante *seu-3* respecto al alelo WT. **(B,C)** Longitud de los hipocotilos de plántulas silvestres Col-0 y la línea *seu-3* cultivadas tal y como se detalla en la Figura R1.2. Las barras representan la media de la longitud y el SE de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre el mutante respecto a Col-0 para cada condición de luz (Prueba t de Student; ** P<0,01). **(D)** Aspecto de plántulas representativas de las medidas en C.

El análisis de la expresión inducida por sombra de *PIL1*, *ATHB2* y *SAUR15* en plántulas Col-0 y *seu-3* por RT-qPCR (**Figura R1.16**) mostraba que la inducción por sombra de todos estos genes estaba ligeramente disminuida en el mutante *seu-3* respecto a las plántulas silvestres tras 1h de tratamiento. En conjunto, estos experimentos indicaban que SEU tiene un rol positivo en la regulación del alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra simulada, y actuaría como un activador transcripcional de los genes de respuesta a sombra.

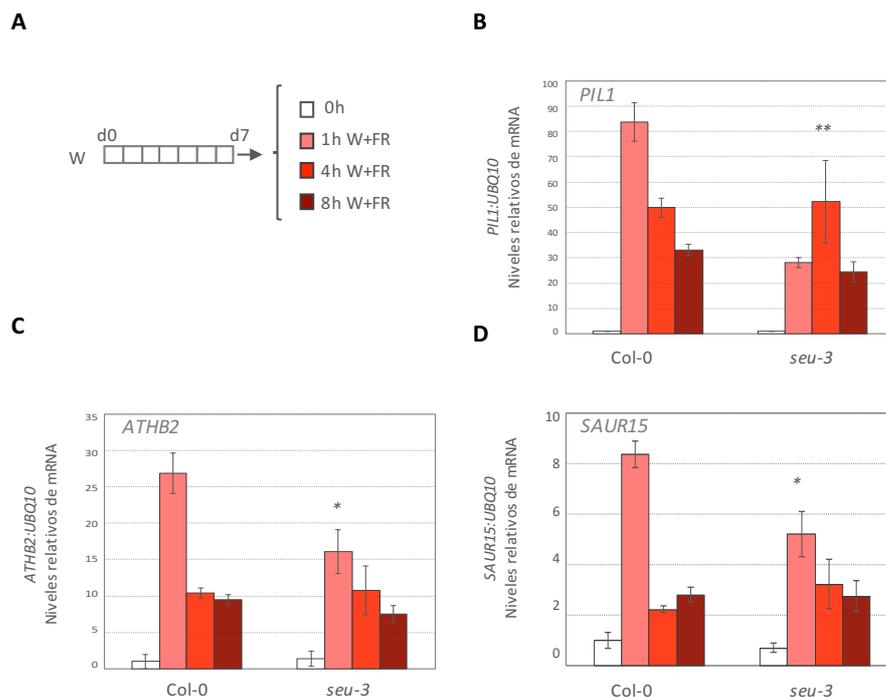
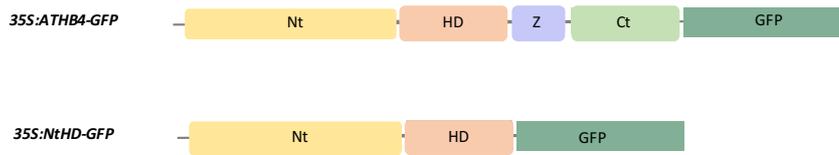


Figura R1.16. Efecto de la pérdida de función SEU en la expresión de *PIL1*, *ATHB2* y *SAUR15* en respuesta a sombra simulada. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas se crecieron tal y como se detalla en la Figura R1.10. (B-D) Niveles de mRNA de *PIL1* (B), *ATHB2* (C) y *SAUR15* (D), en plántulas Col-0 y *seu-3* cultivadas como se indica en A. Se representa la media, normalizada a los niveles de transcrito del gen *UBQ10*, y el SE de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas para cada condición de luz respecto a Col-0 (Prueba t de Student; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

1.2.2. Búsqueda de interactores vía el N-terminal de *ATHB4* por aproximación proteómica en plantas.

En paralelo, llevamos a cabo una aproximación proteómica para detectar nuevos interactores de Nt-*ATHB4* *in planta*. Esta aproximación se realizó durante una estancia de 4 meses en el laboratorio del Dr. Graf en el “*Max Planck Institute for Molecular Plant Physiology*” en Golm, Alemania. Utilizamos una línea pMG62 disponible en el laboratorio (Gallemí 2013) que sobreexpresaba los dominios N-terminal y HD de *ATHB4* fusionados a la GFP (*35S:NtHD-GFP*) (Figura R1.17A), que no había sido seleccionada ni caracterizada completamente. Primero analizamos la generación T2, en la que se identificaron un total de 8 líneas con una inserción de T-DNA, que en la generación T3 llevamos a homocigosis. Finalmente seleccionamos tres líneas independientes (#082, #163, y #205) para caracterizarlas molecular, genética y fisiológicamente. Este conjunto de experimentos los realizamos para finalmente escoger una línea en concreto para los posteriores experimentos de inmunoprecipitación. Tras seleccionar las líneas transgénicas, quisimos analizar los niveles de expresión de la GFP por RT-qPCR. Para ello se incluyeron como controles la línea silvestre Col-0 y la línea *35S:ATHB4-GFP* (Figura R1.17B). La comparación de los niveles de transcrito GFP de las líneas *35S:NtHD-GFP* respecto a los de las plántulas *35S:ATHB4-GFP* mostraba que en los tres casos eran del mismo orden.

A



B

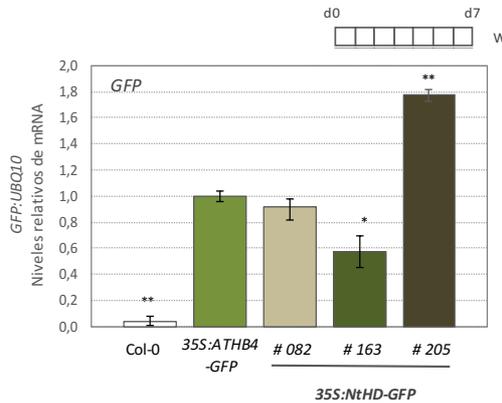


Figura R1.17. Comparación de los niveles de expresión de *ATHB4-GFP* y *NtHD-GFP*. (A) Esquema de las construcciones empleadas. (B) Niveles de mRNA de *GFP* en plántulas Col-0, *35S:ATHB4-GFP* y tres líneas *35S:NtHD-GFP* cultivadas como se indica sobre la gráfica. Se representa la media de tres réplicas biológicas normalizada a los niveles de transcrito del gen *UBQ10* y el SE. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas respecto a la línea *ATHB4-GFP* (Prueba t de Student; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

Tras comprobar que el *NtHD-GFP* se expresaba, quisimos estudiar si la sobreexpresión de esta forma truncada de *ATHB4* tenía actividad biológica. El análisis del alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra simulada en plántulas (**Figura R1.18**) mostró que las líneas *NtHD-GFP* presentaban una ligera atenuación en el alargamiento del hipocotilo en respuesta a W+FR en comparación de las plántulas silvestres, un fenotipo que recordaba al de las plántulas de la línea *35S:ATHB4-GFP* en W+FR, a pesar de la menor respuesta observada por la línea control *35S:ATHB4-GFP* si se compara con los resultados de la **Figura R1.2**.

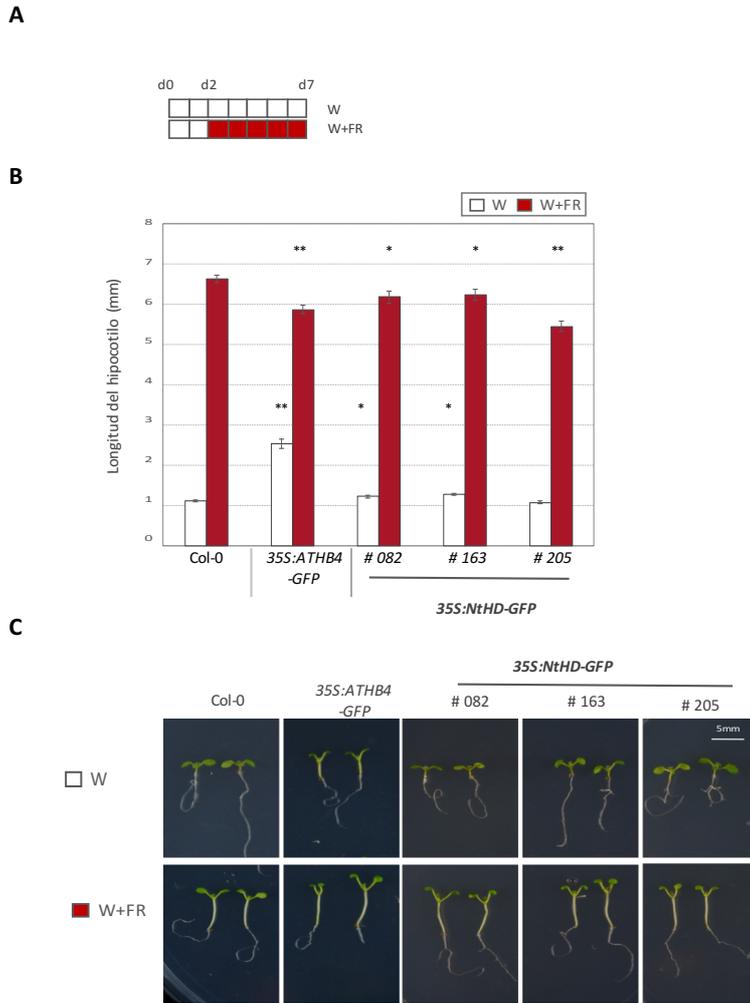
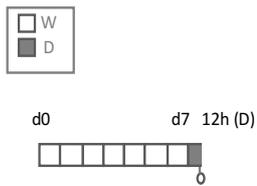


Figura R1.18. Efecto de la sobreexpresión de *ATHB4-GFP* y *NtHD-GFP* en el alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra simulada. (A) Las plantas se crecieron tal y como se detalla en la Figura R1.2. **(B)** Longitud de los hipocotilos de plántulas Col-0, *35S:ATHB4-GFP* y *35S:NtHD-GFP*, cultivadas como se indica en **A**. Las barras representan la media de la longitud y el SE de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre genotipos para cada condición de luz respecto a Col-0 (Prueba t de Student; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). **(C)** Aspecto de plantas representativas medidas en **B**.

Como las plántulas mostraban un fenotipo relativamente suave, quisimos detectar la proteína en las líneas de sobreexpresión *ATHB4-GFP* y *NtHD-GFP*, información fundamental para llevar a cabo el cribado proteómico. En primer lugar, analizamos la actividad GFP por microscopía confocal en plantas crecidas a 22°C durante d7 en W y tratadas con oscuridad durante 12h (**Figura R1.19**). Previamente habíamos observado que el tratamiento de 1-3h con W+FR parecía estabilizar la proteína *ATHB4-GFP*; como estos experimentos se iban a realizar en el laboratorio del Dr. A. Graf, que no disponía de cámaras para proporcionar las condiciones de W+FR, procedimos a dar un tratamiento de oscuridad sustitutorio porque observamos que tanto la proteína WT como la forma truncada eran más fácil de detectar cuando se mantenían las plántulas en estas condiciones. En la **Figura R1.19** se muestra la detección de la actividad GFP en los núcleos tanto de la línea transgénica *35S:ATHB4-GFP* como de *35S:NtHD-GFP*.

A



B

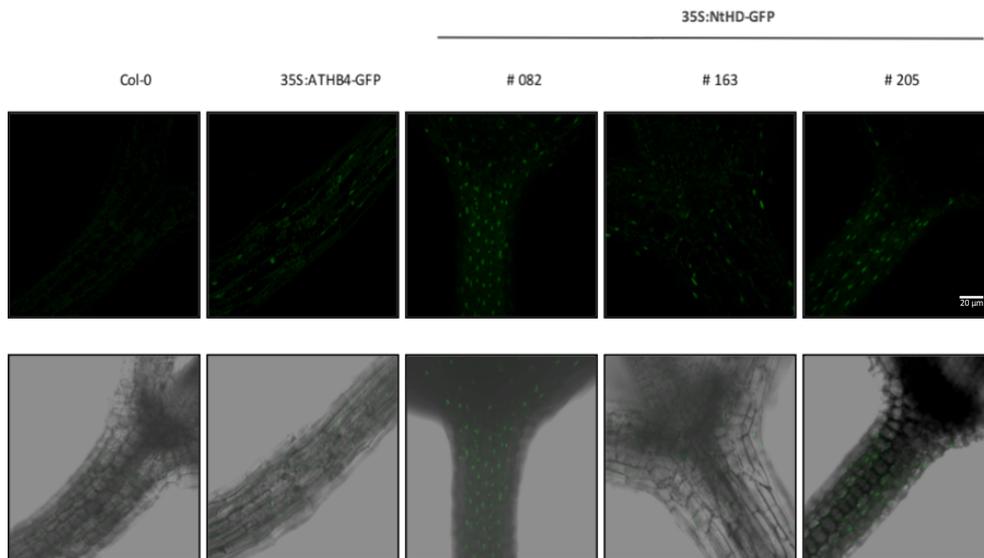


Figura R1.19. Detección de la actividad GFP de ATHB4-GFP y NtHD-GFP. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas crecieron a 22°C durante 7 días (d7) en luz blanca continua (W) y se trataron con oscuridad durante 12h. (B) Se muestran imágenes de fluorescencia confocal de hipocótilos de plántulas Col-0, ATHB4-GFP y NtHD-GFP (#082, #163, #205) (paneles de arriba) e imágenes sobrepuestas de fluorescencia y campo claro (paneles de abajo).

Tras estos análisis utilizamos la línea *35S:NtHD-GFP* #082 en el experimento de inmunoprecipitación. Como controles adicionales utilizamos además plántulas *35S:ATHB4-GFP* y una línea transgénica que sobreexpresa la proteína GFP sola (*35S:GFP*), también disponible en el laboratorio. En líneas generales, el experimento consistía en obtener extractos de proteínas de plántulas en condiciones nativas, aislar los complejos mediante inmunoprecipitación con anticuerpos comerciales anti-GFP (**Figura R1.20A**) e identificar los posibles interactores de ATHB4 mediante cromatografía líquida (LC), la cual separa los péptidos según la polaridad mediante una elución en gradiente que se conduce hacia dos espectrómetros de masas (MS/MS), que están acoplados a un sistema de detección muy sensible (LC-MS/MS) (**Figura R1.20B**).

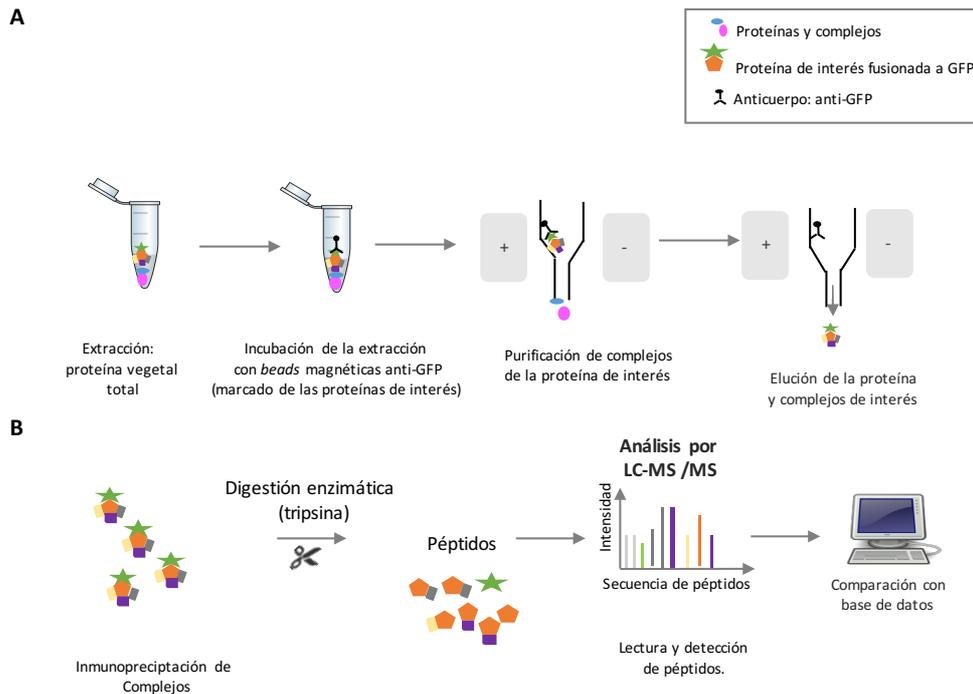
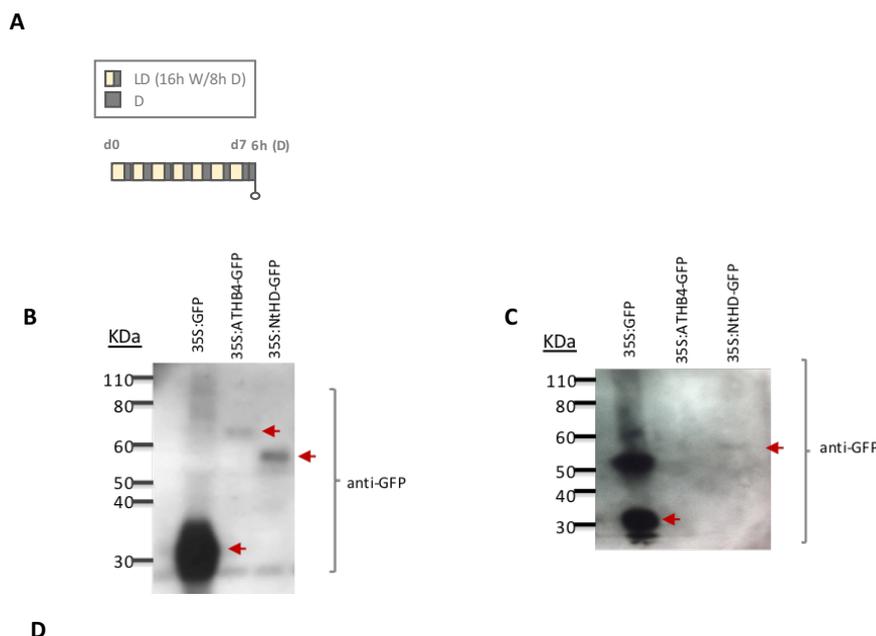


Figura R1.20. Esquema de la estrategia de inmunoprecipitación de complejos empleada para detectar interactivos de ATHB4 vía el dominio N-terminal. Esquema de la inmunoprecipitación para purificar complejos de la proteína de interés (A) y del procedimiento para la identificación de posibles interactivos partiendo de la solución inmunoprecipitada y enriquecida en las proteínas de interés. (B) LC-MS/MS, cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem.

Previamente se establecieron las condiciones de crecimiento: las plántulas de las líneas 35S:ATHB4-GFP, 35S:NtHD-GFP y 35S:GFP crecieron a 22°C en LD. En d7, se trataron durante 6h con oscuridad (Figura R1.21A). Tras ello, se realizó primero una extracción de proteína total en condiciones desnaturalizantes, que se separó mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) y se procedió a la detección de las proteínas por inmunoblot con anticuerpos anti-GFP (Figura R1.21B). Mientras que la forma 35S:GFP se detectaba sin problemas, las proteínas ATHB4-GFP y NtHD-GFP se detectaban con mayor dificultad. A continuación se crecieron plántulas en las mismas condiciones y se extrajeron proteínas totales, esta vez en condiciones nativas. Para la inmunoprecipitación, empleamos un kit comercial (μ MACS GFP Isolation Kit de *Macs molecular*) con columnas que contenían partículas magnéticas que retenían las *beads* magnéticas conjugadas con el anticuerpo anti-GFP. Esto permitió la purificación por elución de ATHB4-GFP, NtHD-GFP y la GFP sola, junto con las moléculas acomplejadas con estas proteínas. En estos eluidos, que constituyeron los extractos inmunoprecipitados, verificamos la presencia de las proteínas fusionadas a la GFP por inmunoblot (Figura R1.21C): la proteína GFP se detectaba sin problemas, ATHB4-GFP no se detectaba y NtHD-GFP se detectaba pero con dificultad. Procedimos a la digestión con tripsina de estos productos de elución y a la purificación de los péptidos mediante columnas de afinidad, y posteriormente las muestras generadas se inyectaron en el LC-MS/MS.



Código AGI	Nombre	Función molecular descrita	Respuestas a factores abióticos	Valoración
AT1G31440	SH3 DOMAIN CONTAINING PROTEIN BINDING	Unión de proteínas y dactrina		14,00
AT3G14210	EPITHIOSPECIFIER MODIFIER 1 (ESM1)	Actividad hidrolasa éster carboxílico		12,00
AT3G16470	JASMONATE RESPONSIVE 1 (JAR1)	Unión de proteínas y de carbohidratos	Hormonas (Ácido Jasmónico), salinidad, sequía y frío	7,85
AT5G08180	RIBOSOMAL PROTEIN L7Ae	Unión a RNA		6,00
AT2G45640	SIN3 ASSOCIATED POLYPEPTIDE 18 (SAP18)	Unión de proteínas	Hormonas (ABA y etileno), salinidad, sequía y frío	5,50
AT3G16440	Myrosinase-binding protein-like protein (AtMLP-300B) mRNA	Unión de carbohidratos		5,33
AT2G26250	3-KETOACYL-COA SYNTHASE 10 (KCS10)	Actividad transferasa y sintetasa		5,00
AT3G45780	PHOTOTROPIN 1 (PHOT1)	Unión de proteínas, mRNA y de flavinas mononucleóticas	Receptor de luz azul. Fototropismo.	5,00
AT1G26630	EUKARYOTIC ELONGATION FACTOR 5A-2 (ELF5A-2)	Unión a ribosomas. Factor de actividad de elongación.	Sequía	4,50
AT3G26560	ATP-dependent RNA helicase	Unión a ATP y mRNA		3,00
AT1G52400	BETA GLUCOSIDASE 18 (BGLU18)	Unión de proteínas	Salinidad, sequía y frío	2,95
AT2G44910	ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER PROTEIN 4 (ATHB4)	Unión a DNA	Hormonas (Auxinas y Brassinosteroides), respuesta a FR	2,67

Figura R1.21. Inmunoprecipitación e identificación de complejos proteicos que interactúan con las proteínas GFP, ATHB4-GFP y NtHD-GFP. (A) Esquema de las condiciones de crecimiento utilizadas para la obtención del material vegetal a inmunoprecipitar. Las plantas germinaron (día 0, d0) y crecieron a 22°C durante 7 días (d7) en día largo (Long Day, 16h W/8h D) y se transfirieron a oscuridad (D) durante 6h. **(B, C)** Detección por inmunoblot de las distintas fusiones a la proteína GFP en extractos totales obtenidos en condiciones desnaturalizantes. Se indica con una flecha roja las bandas que corresponderían a las proteínas detectadas tras la extracción total de proteína **(B)**, y en extractos de las proteínas inmunoprecipitadas. Se indica con una flecha roja las bandas que corresponderían a las proteínas detectadas tras la inmunoprecipitación con anti-GFP **(C)** separadas en electroforesis en gel de 10 % poliacrilamida con SDS (10% SDS-PAGE). Como control de la inmunoprecipitación se utilizó una línea transgénica sobreexpresora de la GFP (35S:GFP). Las proteínas se detectaron por inmunoblot usando anticuerpos comerciales contra la GFP (anti-GFP). **(D)** Tabla simplificada de los resultados obtenidos tras las lecturas del LC-MS/MS. Se muestran los putativos interactores por accesión, nombre, función molecular descrita, y respuestas a diferentes condiciones ambientales en las que se han implicado. La valoración asignada se detalla en la **tabla Tabla R1.1**.

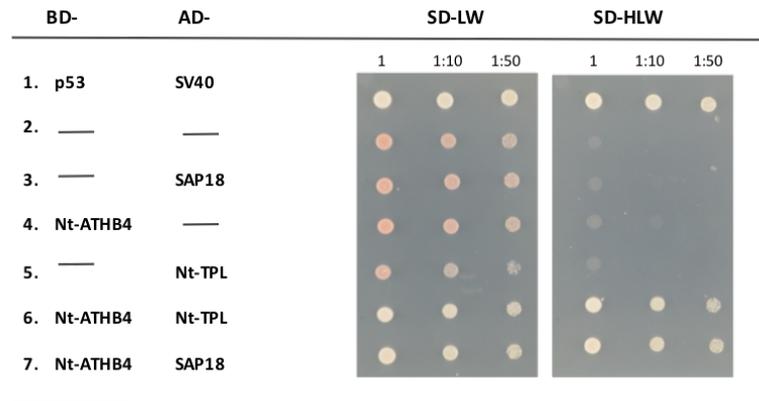
El análisis tras el LC-MS/MS de los diferentes extractos indicó que en ninguno de los tres inmunoprecipitados de las muestras ATHB4-GFP y sólo en uno de los tres de NtHD-GFP #082 se detectó ATHB4, con lo que posteriormente sólo se analizó esa réplica. Se detectaron un total de 68 proteínas. Esta lista de posibles interactores la simplificamos según una serie de parámetros (**Tabla R1.1**). Seleccionamos sólo los interactores cuyo valor total adjudicado era mayor al detectado para ATHB4 (At2g44910) y en las proteínas descritas con localización subcelular nuclear. En la **Figura R1.21D** mostramos los 11 interactores candidatos seleccionados detallando su código AGI, nombre, función molecular descrita, respuestas a diferentes condiciones ambientales en las que se han implicado y valoración (obtenida como se detalla en la **Tabla R1.1**). Se incluye ATHB4 como referencia (código AGI en rojo). De entre estos 11 putativos interactores nos focalizamos en SAP18 (SIN3-ASSOCIATED POLYPEPTIDE 18), descrito en la literatura como un factor que interactúa con proteínas que contienen motivos EAR (presentes en el Nt de ATHB4) (Hill, Wang, and Perry 2008).

Código AGI	Ab. Rel	PepCount (>2)	PepUniq (>2)	Ab. rel PepUniq	Total
AT1G31440	2	1	1	9,0	13,0
AT2G25980	1	1	1	9,2	12,2
AT3G14210	1	1	1	8,0	11,0
AT3G14220	2	1	1	4,2	8,2
AT4G32760	2	1	1	3,0	7,0
AT1G67730	2	1	1	3,0	7,0
AT3G62120	1	1	1	3,0	6,0
AT1G52100	2	1	1	3,8	7,8
AT3G16470	2	1	1	2,9	6,9
AT3G21370	2	1	1	2,7	6,7
AT3G16430	2	1	1	2,7	6,7
AT1G10200	1	1	1	2,0	5,0
AT2G26250	1	1	1	2,0	5,0
AT3G32980	1	1	1	1,0	4,0
AT2G34470	1	1	1	1,0	4,0
AT3G16440	1	1	1	1,3	4,3
AT5G26280	2	1	1	1,9	5,9
AT5G08180	2	1	1	1,0	5,0
AT4G36880	2	1	1	1,0	5,0
AT2G06850	1	1	1	1,0	4,0
AT5G64730	1	1	1	1,0	4,0
AT5G64100	2	1	1	1,3	5,3
AT3G45780	1	1	1	1,0	4,0
AT1G26630	1	1	1	1,5	4,5
AT5G14660	1	1	1	1,0	4,0
AT2G45640	1	1	1	1,5	4,5
AT1G24510	1	1	1	1	4,3
AT3G53740	2	1	0	1	3,5
AT3G26560	2	1	0	0	2,0
AT1G52400	1	1	0	1	2,8
AT4G18480	1	1	0	1	2,5
AT2G44910	*	1	1	0	1,7

Tabla R1.1. Resumen de los resultados obtenidos como posibles interactores de ATHB4 identificados mediante la estrategia de inmunoprecipitación en planta. Lista de los putativos interactores identificados por el código AGI. Se determinó la abundancia de cada proteína inmunoprecipitada con anti-GFP en una réplica biológica de extractos de plantas 35S:NtHD-GFP y dos réplicas de plantas 35S:GFP. **Ab. rel:** Para cada proteína se estimó la abundancia relativa obteniendo el ratio entre la abundancia en la muestra 35S:NtHD-GFP y cada una de las dos muestras 35S:GFP (*fold change* 1, FC1 y FC2). Si FC1>5 y FC2>5, se asigna un valor de 2; si el FC1>5 o FC2>5, se asigna un valor de 1; y si en ambas comparaciones el FC<5, se asigna un valor de 0. **PepCount>2:** Número de péptidos totales detectados por el cromatógrafo; se le otorga valor de 1 cuando se detectaron más de dos péptidos. **PepUniq>2:** Número de péptidos únicos detectados por el cromatógrafo; se otorga el valor 1 cuando se detectaron más de dos péptidos. **Ab. rel PepUniq:** número de péptidos únicos menos la proporción de péptidos únicos detectados y péptidos totales detectados. **Total:** Sumatorio de los valores anteriormente descritos. ATHB4 es At2g44910 (en color rojo). Se muestran aquellas proteínas cuyo valor total es superior al de ATHB4. El * indica que el valor **Ab. rel** es ∞ .

Mediante ensayos de Y2H, observamos crecimiento en medio SD-HLW en la combinación que expresa las proteínas BD-Nt-ATHB4 y AD-SAP18 (combinación #7) indicativo de que Nt-ATHB4 interactúa con SAP18 (**Figura R1.22A**). También realizamos un ensayo de BiFC entre la proteína SAP18 y la región Nt-ATHB4 (en estos ensayos utilizamos la forma Nt-ATHB4, debido a que los experimentos con la proteína entera la fluorescencia era muy tenue), que mostró fluorescencia sólo en núcleos de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con la combinación YN-Nt-ATHB4 + YC-SAP18 (**Figura R1.22B**).

A



B

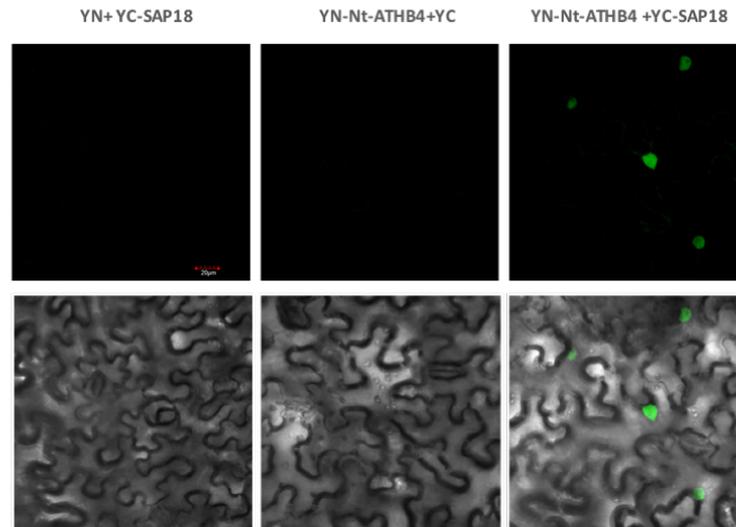


Figura R1.22. Análisis de interacción entre Nt-ATHB4 y SAP18. (A) Ensayo de doble híbrido en levadura (Y2H). Experimento realizado como se detalla en Figura R1.9.A. SD-LW y SD-HLW se refiere a los medios selectivos de transformación y de interacción entre las proteínas híbridas, respectivamente. Todos los ensayos se realizaron un mínimo dos veces obteniendo resultados iguales. La combinación entre las proteínas BD-p53 y AD-SV40 se usó como control positivo de interacción, y los vectores vacíos, como negativos. Nt-ATHB4, aminoácidos 1-142 de ATHB4; Nt-TPL, aminoácidos 1-242 de TPL; SAP18, proteína SAP18 entera. **(B)** Ensayo de BiFC en hojas de *N. benthamiana* tras 3 días de la agroinfiltración de las proteínas fusionadas a YN- y YC- indicadas. Se muestran imágenes de fluorescencia en confocal de células epidérmicas (paneles de arriba) e imágenes sobrepuestas de fluorescencia y campo claro (paneles de abajo). YN, parte Nt de la YFP; YC, parte Ct de la YFP; YN-Nt-ATHB4, YN fusionado al Nt-ATHB4; YC-SAP18: YC fusionado a SAP18 entero. Se utilizaron como controles negativos YN- (vacío) + YC-SAP18 y YN- Nt-ATHB4 + YC- (vacío).

Este conjunto de resultados nos indicaban que la región Nt de ATHB4 interaccionaba con SAP18. Tras estos resultados y con el objetivo de conocer el papel de SAP18 en el SAS, se obtuvo una línea mutante de inserción de T-DNA (colección GABI-KAT) que llamamos *sap18-10* (Figura R1.23A). Para comprobar si este alelo era de pérdida de función, localizamos la inserción de T-DNA y analizamos los niveles de expresión de *SAP18* por RT-qPCR utilizando dos pares de oligonucleótidos, uno antes (MJO71+MJO72) y otro después (MJO73+MJO74) del sitio de inserción del T-DNA (Figura R1.23B). Los resultados de las RT-qPCR junto con la información sobre el sitio de inserción del T-DNA sugerían que era un mutante de pérdida de función.

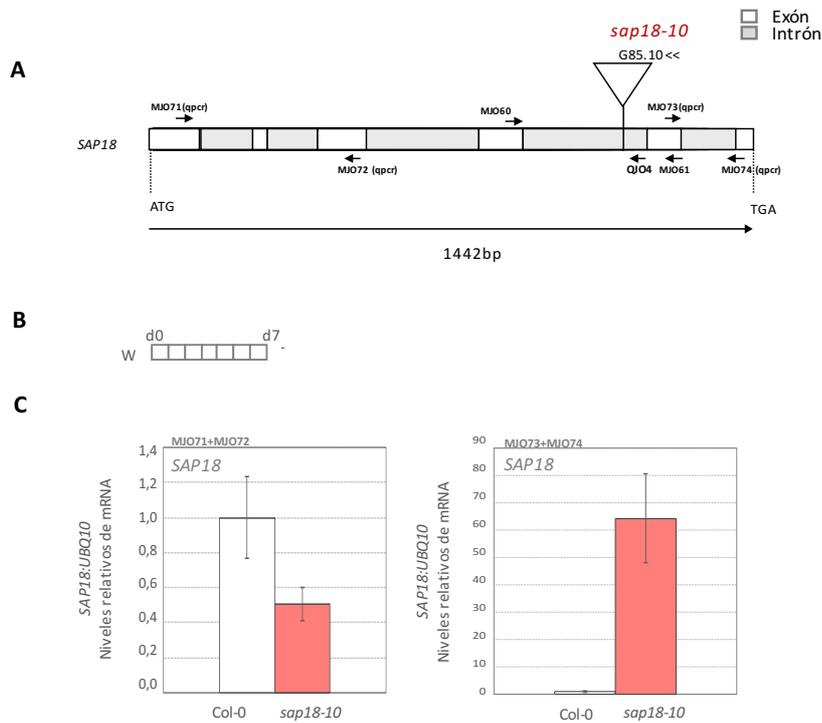


Figura R1.23. Análisis de los niveles de *SAP18* en plántulas de la línea mutante *sap18-10*. (A) Esquema de la estructura genómica de *SAP18* y de la inserción del T-DNA que hemos nombrado como *sap18-10*. Los oligonucleótidos usados para los genotipados y análisis de RT-qPCR están marcados con flechas y los nombres correspondientes. (B) Diseño experimental utilizado. Las plantas se crecieron tal y como se detalla en la Figura R1.17B. (C) Niveles de mRNA de *SAP18* en plántulas Col-0 y *sap18-10* cultivadas como se indica en B. Para los análisis por RT-qPCR, se utilizaron dos pares de oligonucleótidos, uno antes (MJO71+MJO72) y otro después (MJO73+MJO74) del sitio de inserción del T-DNA. Se representa la media, normalizada a los niveles de transcrito del gen *UBQ10*, y el SE de tres réplicas biológicas. Las diferencias de expresión de *sap18-10* respecto a Col-0 no son significativas según la Prueba t de Student.

El análisis del alargamiento del hipocotilo mostró que los hipocotilos de las plántulas *sap18-10* se alargaban ligera pero significativamente más en respuesta a W+FR que los silvestres (Figura R1.24), sugiriendo un papel negativo de *SAP18* en la regulación de esta respuesta.

Este conjunto de análisis indican que la región N-terminal de ATHB4 puede interaccionar con al menos los cofactores TPL, SEU y SAP18. Además, los análisis genéticos indican que TPL y SEU actuarían como reguladores positivos, y SAP18 como un regulador negativo de las respuestas del SAS.

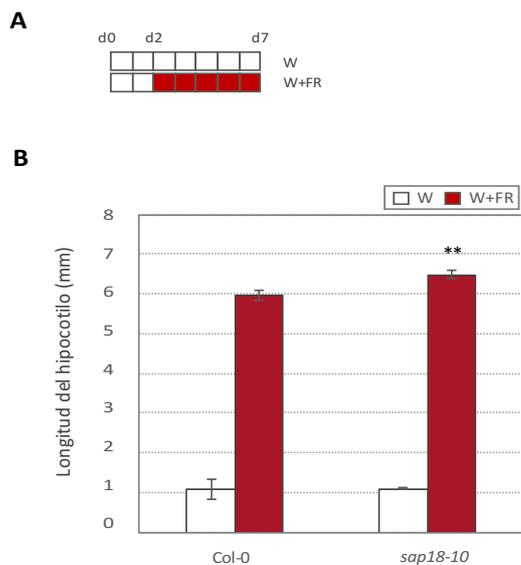


Figura R1.24. Efecto de la mutación *sap18-10* en la longitud del hipocotilo en respuesta a la sombra simulada. (A) Las plantas se crecieron tal y como se detalla en la Figura R1.2. **(B)** Longitud de los hipocotilos de plántulas Col-0 y *sap18-10*, cultivadas como se indica en A. Las barras representan la media de la longitud y el SE de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre genotipos para cada condición de luz respecto a Col-0 (Prueba t de Student; ** P<0,01).

Debido a la relevancia de la región N-terminal de ATHB4 y su función en la regulación del SAS, y tras comprobar que las interacciones entre ATHB4 con TPL, SEU y SAP18 tenían lugar a través de dicha región, nos propusimos profundizar en las posibles funciones de los motivos EAR.

1.3. Función de los motivos EAR de ATHB4.

La región Nt-ATHB4 contiene dos secuencias EAR: LxLxLxL (EAR1, E1) y LNLxL (EAR2, E2) (Figura R1.8). Realizamos una mutagénesis dirigida de estos residuos específicos y muy conservados. Los cambios que realizamos fueron la sustitución de tres Leucinas (L) del E1 y del E2 por Alaninas (A) (Figura R1.25), ya que sustituciones similares en otros motivos EAR resultaban en la abolición de la interacción con otras proteínas (Pauwels et al. 2010a; Ke et al. 2015). Estas mutaciones puntuales de los motivos EARs se introdujeron mediante PCR usando oligonucleótidos que contenían los cambios de bases necesarios, resultando en la forma mutada *ATHB4*_{E1E2m}. Tras la confirmación por secuenciación de *ATHB4*_{E1E2m}, lo clonamos en vectores para su expresión en levadura.

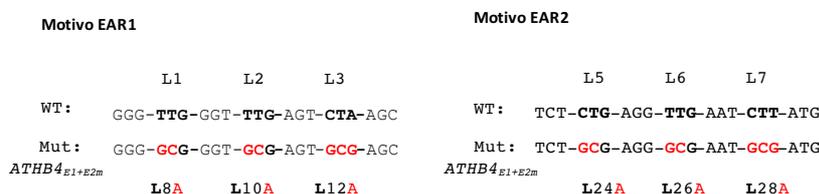


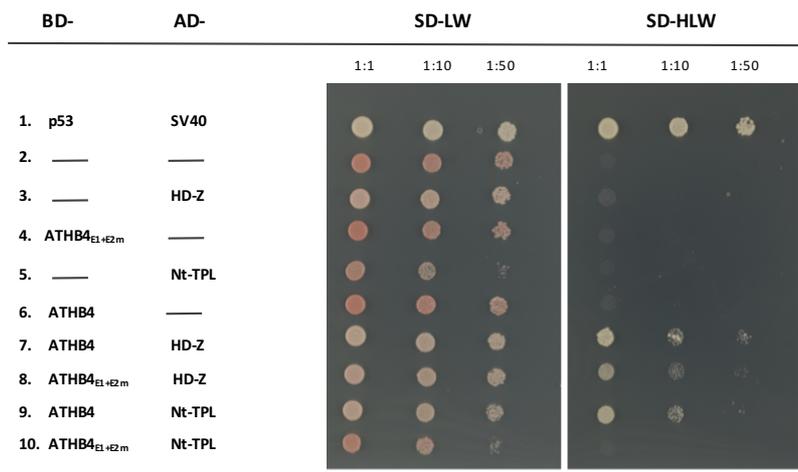
Figura R1.25. Cambios introducidos en los motivos EAR del gen *ATHB4*. Detalle de la secuencia silvestre (WT) de *ATHB4* (Col-0) los cambios de nucleótidos introducidos para mutagenizar los dos motivos EAR (llamado *ATHB4*_{E1+E2m}). La secuencia de aminoácidos predicha se muestra debajo de cada triplete de DNA.

Realizamos ensayos de Y2H para estudiar si la interacción con TPL y SAP18 estaba afectada por la mutación de los motivos EAR (SEU no se muestra debido a problemas técnicos con el ensayo Y2H). Observamos crecimiento en medio SD-HLW en las combinaciones que expresaban las

proteínas BD-ATHB4 y AD-HDZ (#7), y en las BD-ATHB4_{E1E2m} y AD-HDZ (#8), lo que indicaba que la mutación de los motivos EAR no altera la homodimerización de ATHB4 a través del dominio Zip. Por el contrario, observamos crecimiento en las combinaciones que expresaban las proteínas BD-ATHB4 y AD-Nt-TPL (#9) pero no cuando se coexpresaban las proteínas BD-ATHB4_{E1E2m} y AD-Nt-TPL (#10) (Figura R1.26A). Empleando el mismo procedimiento para SAP18 (Figura R1.26B), observamos crecimiento en las combinaciones que expresan las proteínas BD-Nt-ATHB4 y AD-SAP18 (combinación #4) y BD-ATHB4 y AD-SAP18 (#7), pero no con las proteínas BD-ATHB4_{E1E2m} y AD-SAP18 (#10).

Estos resultados indicaban que ATHB4 interacciona con TPL y SAP18 vía los motivos EAR.

A



B

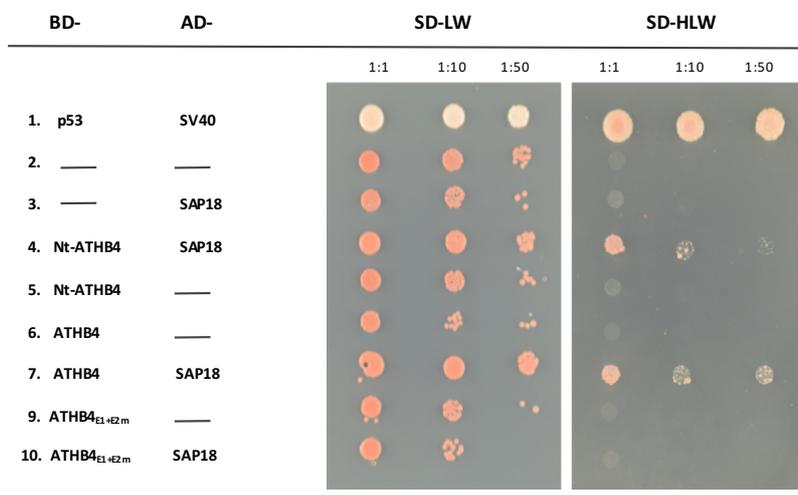
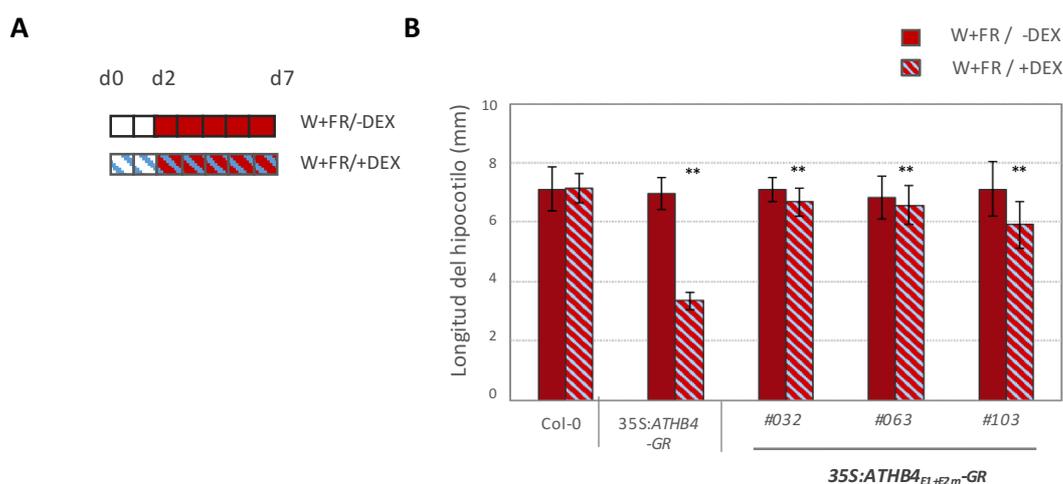


Figura R1.26. Análisis de papel de los motivos EAR de ATHB4 en la interacción con TPL y SAP18. (A, B) Ensayos de Y2H para estudiar el efecto de la mutación de los motivos EAR en la interacción ATHB4 con TPL (A) y SAP18 (B). A la derecha se muestran las diluciones de cultivos crecidos a partir de colonias resultantes del *mating*, como se describe en la figura R1.8A. SD-LW y SD-HLW se refiere a los medios selectivos de transformación y de interacción entre las proteínas híbridas, respectivamente. Todos los ensayos se realizaron un mínimo dos veces obteniendo resultados similares. La combinación entre las proteínas BD-p53 y AD-SV40 se usó como control positivo de interacción y los vectores vacíos, como negativos. Nt-ATHB4, aminoácidos 1-142 de ATHB4; HD-Z, aminoácidos 143-263 (forma truncada de ATHB4 que contiene el HD y el Zip); ATHB4_{E1+E2m} (proteína entera pero con las Leucinas de los motivos EAR cambiados a Alanina); Nt-TPL aminoácidos, 1-242 de TPL, ATHB4 proteína entera ; SAP18 proteína

entera. En el ensayo **A**, se añadió en el medio 10 mM de 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) para evitar la autoactivación de la forma truncada de ATHB4 (HD-Z).

Tras estos resultados nos planteamos si los motivos EAR eran claves para la función biológica de ATHB4 en las respuestas del SAS. Por ello, fusionamos *ATHB4_{E1E2m}* al dominio GR para ser expresado bajo el promotor constitutivo 35S (*35S:ATHB4_{E1E2m}-GR*; *pMJ91*). Transformamos plantas de *A. thaliana* con esta construcción, obteniendo un total de 24 plantas transgénicas independientes (transformantes primarios, T1). En la generación T2 se determinó que un total de 5 líneas tenían 1 inserción de T-DNA, que en la generación T3 se llevaron a homocigosis. Caracterizamos molecular y fisiológicamente tres de ellas (#032, #063, #103). A continuación, analizamos el alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra simulada de plántulas silvestres, *35S:ATHB4-GR* y *35S:ATHB4_{E1E2m}-GR* (Figura R1.27). Basándonos en experimentos anteriores, y ya que la aplicación de DEX no afectaba significativamente el alargamiento del hipocotilo cuando las plantas crecían en W (Gallemi et al. 2017), se simplificaron los experimentos estudiando el efecto de la DEX en plantas crecidas en W+FR. Las plantas se germinaron en medio suplementado sin (-DEX) o con DEX (+DEX), se crecieron a 22°C en W durante d2 y posteriormente se transfirieron a W+FR hasta d7 (Figura R1.27A). Las plántulas Col-0 presentaban hipocotilos largos en respuesta a sombra independientemente del tratamiento con DEX. En cambio, los hipocotilos de la línea *35S:ATHB4-GR* mostraban una disminución en la longitud del hipocotilo en sombra simulada dependiente de la aplicación de DEX, tal como está descrito (Sorin et al. 2009). Los hipocotilos de las líneas *35S:ATHB4_{E1E2m}-GR* eran similares a los Col-0 en ausencia de DEX y eran ligera pero significativamente más cortos tras la aplicación de DEX.

Estos resultados sugerían que los motivos EARs son claves para la función biológica de ATHB4 en la inhibición de la longitud del hipocotilo en respuesta a sombra simulada, si bien sería necesario comparar los niveles de expresión del transgen en las plántulas de las líneas *35S:ATHB4-GR* y *35S:ATHB4_{E1E2m}-GR*.



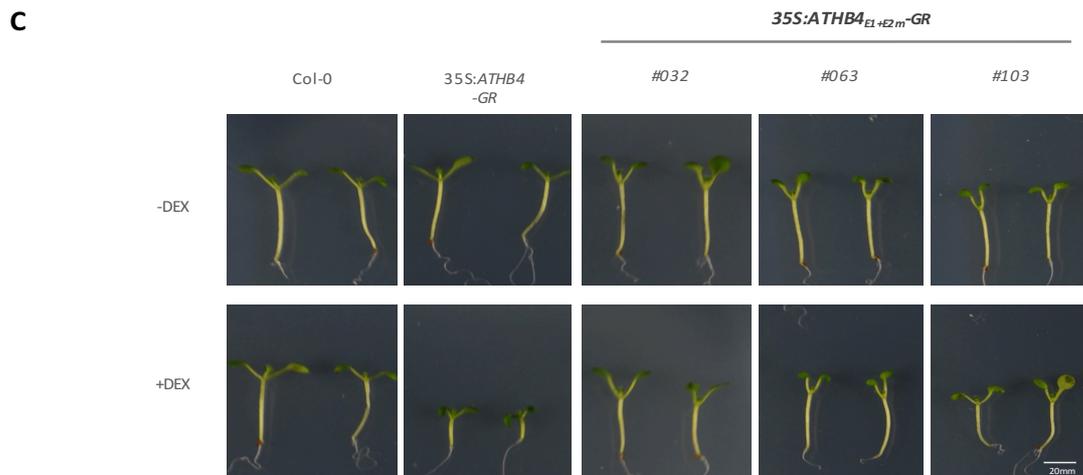


Figura R1.27. Longitud del hipocotilo de plántulas que sobreexpresan *ATHB4_{E1+E2m}-GR* en respuesta a la sombra simulada. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas germinaron (día 0, d0) y crecieron a 22°C durante 2 días (d2) en W, posteriormente se transfirieron a W+FR hasta el día 7 (d7) en ausencia (-DEX) o presencia de DEX (+DEX). **(B)** Longitud de los hipocotilos de plántulas Col-0, *35S:ATHB4-GR* y 3 líneas *35S:ATHB4_{E1+E2m}-GR* cultivadas como se indica en **A**. Las barras representan la media de la longitud y el SE de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas para cada condición de luz respecto a Col-0 (Prueba t de Student; ** P<0,01). **(C)** Aspecto de plantas representativas medidas en **B**.

En el trabajo realizado previamente en el laboratorio por Marçal Gallemí se había observado que una forma truncada de la proteína ATHB4 que carecían de los primeros 142 aminoácidos (toda la región Nt) (*Δ142ATHB4*) y que estaba fusionada al GR (*35S:Δ142ATHB4-GR*, pMG27) presentaba una actividad biológica atenuada (respuesta del hipocotilo a la sombra simulada), pero no tenía afectada la expresión génica, lo que corroboraba la idea de la doble acción de ATHB4 con necesidad de unión o no al DNA (dependiendo de la respuesta) (Gallemí 2013).

Durante su trabajo generó esta misma forma truncada pero fusionada a la GFP (*35S:Δ142ATHB4-GFP*, pMG58) la cual en estadio adulto presentaba hojas curvadas hacia abajo (Gallemí et al. 2017), mostrando actividad biológica. Tras el estudio del doble modo de acción de ATHB4, nos planteamos si la presencia o no del Nt de la proteína podría modificar la detección de esta. Tras ver que esta línea transgénica tenía actividad biológica la incorporamos en nuestros análisis de inmunoblot, donde el objetivo principal era comprobar si existían diferencias entre las formas que contenían el Nt y la que no. Los resultados de los análisis por inmunoblot mostraron que en plántulas sobreexpresoras de ATHB4-GFP y crecidas en W la proteína entera no se detectaba mientras que en plántulas con una forma truncada sin el Nt en estas mismas condiciones de crecimiento, se podía detectar la proteína. Estos resultados sugerían que la región Nt de ATHB4 reduciría la estabilidad de la proteína en luz W (**Figura R1.28**).

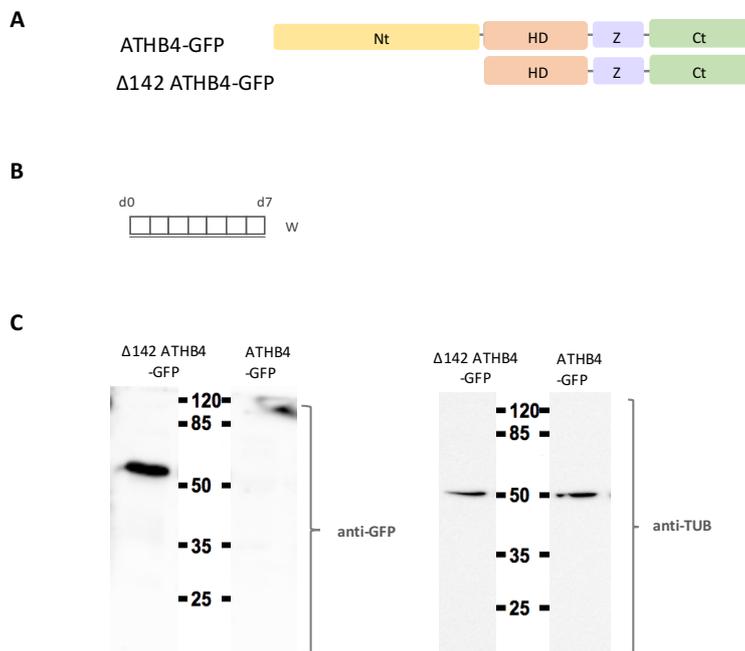
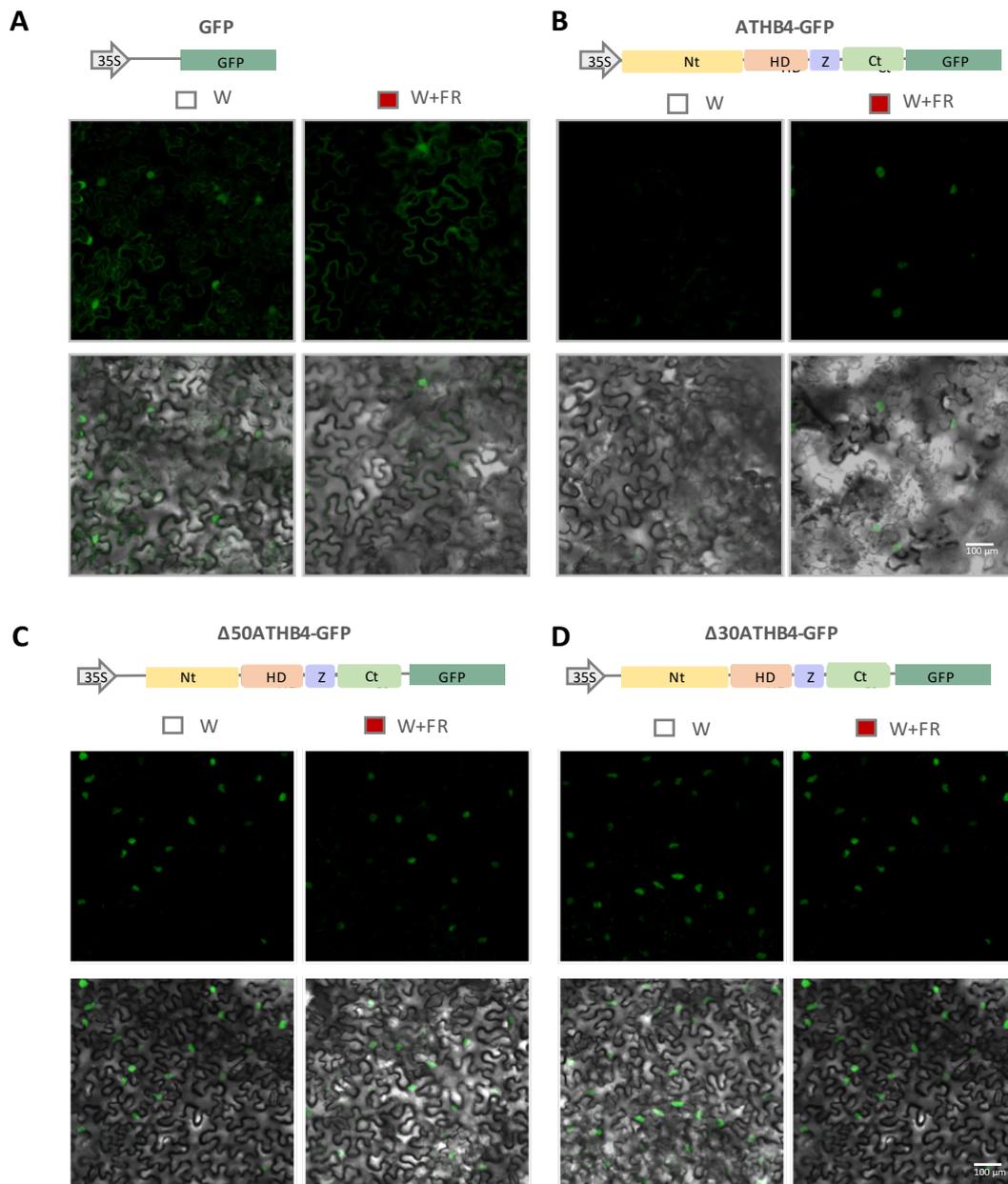


Figura R1.28. Detección de la proteína ATHB4 y $\Delta 142$ ATHB4. (A) Esquema de las diferentes regiones de ATHB4 de las líneas ATHB4 y $\Delta 142$ ATHB4. (B) Esquema de las condiciones de crecimiento utilizadas para la obtención del material vegetal. Las plantas se crecieron tal y como se detalla en la Figura R1.17B. (C) Detección por inmunoblot de las distintas fusiones a la proteína GFP en extractos totales obtenidos en condiciones desnaturalizantes. Las proteínas se detectaron usando anticuerpos comerciales contra la GFP (anti-GFP) y TUB (anti-TUB), que se usó como control de carga.

Posteriormente, analizamos el posible papel del Nt de ATHB4 en la estabilidad de la proteína. Utilizamos inicialmente las construcciones *35S:GFP* y *35S:ATHB4-GFP*, disponibles en el laboratorio, para agroinfiltrar hojas de *N. benthamiana*, que crecieron en LD a 22°C. Tras 3 días de la agroinfiltración se mantuvieron en W o se transfirieron a W+FR durante 1 hora. Los resultados que obtuvimos tras el tratamiento con W o 1 h de W+FR indicaban que en el caso de la GFP ni la localización ni la intensidad de la fluorescencia variaban debido a los distintos tratamientos de luz; en cambio, en las hojas transformadas con *35S:ATHB4-GFP* la intensidad de la fluorescencia era muy baja en W pero tras 1h en sombra simulada la fluorescencia era detectable y se localizaba en el núcleo (**Figura R1.29A,B**). Estos resultados se repitieron más de dos veces y obtuvimos resultados similares. Hipotetizamos que la parte Nt de ATHB4 podría ser la responsable de estos cambios. Para estudiar esta posibilidad, fusionamos a la GFP *ATHB4_{E1E2m}* y dos formas truncadas de *ATHB4* que carecían de los primeros 30 ($\Delta 30$ ATHB4) o 50 ($\Delta 50$ ATHB4) aminoácidos de ATHB4, y los clonamos bajo el control del promotor 35S (construcciones *35S:ATHB4_{E1E2m}-GFP*, *35S: $\Delta 30$ ATHB4-GFP* y *35S: $\Delta 50$ ATHB4-GFP*) (**Figura R1.29C-E**). En esta nueva transformación también se agroinfiltraron plantas con *35S:GFP* y *35S:ATHB4-GFP* como controles, repitiendo el mismo experimento (**Figura R1.29C-E**). En las hojas transformadas con las construcciones *35S:GFP*, *35S: $\Delta 50$ ATHB4-GFP*, *35S: $\Delta 30$ ATHB4-GFP* y *35S:ATHB4_{E1E2m}-GFP* el

tratamiento con W o 1 h de W+FR no alteraba la localización ni la intensidad de la fluorescencia; en cambio, en las plantas transformadas con *35S:ATHB4-GFP* la intensidad de la fluorescencia era muy baja en W pero tras 1h en sombra simulada la fluorescencia era detectable y se localizaba en el núcleo, tal como habíamos visto anteriormente (**Figura R1.29B**). Como las tres construcciones carentes de los motivos EAR (por eliminación o por mutaciones puntuales dirigidas) no presentaban cambios en la fluorescencia entre el tratamiento de W y de W+FR, postulamos que los motivos EAR participarían en la estabilidad de la proteína en respuesta a sombra simulada. Este conjunto de resultados nos indica que los motivos EAR participan en la interacción de ATHB4 con TPL y SAP18. Además, estos motivos parecen importantes para la función biológica de ATHB4 en la inhibición del alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra y también para la estabilidad de la proteína ATHB4 en sombra simulada.



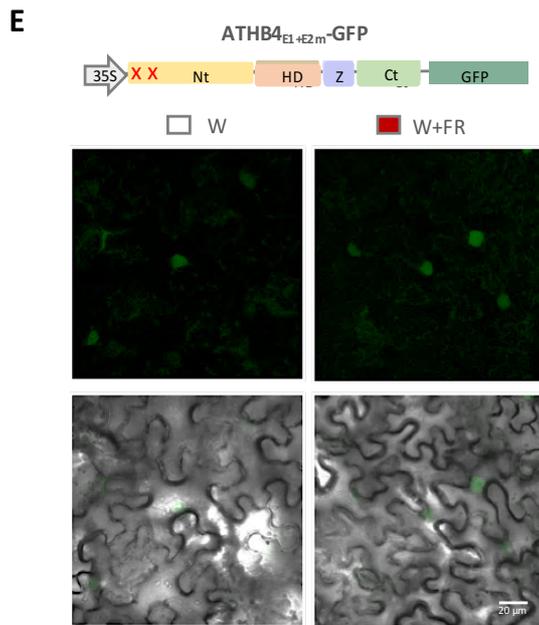


Figura R1.29. Localización subcelular de ATHB4-GFP, $\Delta 50$ ATHB4-GFP, $\Delta 30$ ATHB4-GFP y ATHB4_{E1+E2m}-GFP en respuesta a la sombra simulada. Las proteínas se expresaron transitoriamente en hojas de *N. benthamiana*. Las plantas crecieron en LD a 22°C. A los 3 días de la agroinfiltración, se mantuvieron en W o se transfirieron a W+FR durante 1 hora en una cámara a 22°C. Se muestra la localización subcelular de GFP (A), ATHB4-GFP (B), $\Delta 50$ ATHB4-GFP (C), $\Delta 30$ ATHB4-GFP (D) y ATHB4_{E1+E2m}-GFP (E). Se muestran imágenes de fluorescencia confocal de células epidérmicas (paneles de arriba) e imágenes sobrepuestas de fluorescencia y campo claro (paneles de abajo).

Capítulo II. Estudio de los componentes genéticos y mecanismos moleculares que regulan la tolerancia a la proximidad vegetal.

Tolerancia a la sombra, una estrategia alternativa en respuesta a la proximidad vegetal.

A pesar de que muchas plantas optan por el SAS como estrategia a la proximidad vegetal, otras han desarrollado tolerancia a la vegetación vecina. La tolerancia a la sombra se refiere a la capacidad de las plantas a vivir en condiciones con bajos niveles de luz, como aquellas que se encuentran en zonas sombreadas por otras plantas de mayor porte. Se asume que las especies tolerantes perciben los cambios de R:FR, pero el alargamiento de sus órganos está atenuado. En el laboratorio habíamos visto que el hipocotilo de *Cardamine hirsuta*, una brasicéa emparentada con *A. thaliana*, no se alargaba en respuesta a la exposición a sombra simulada (Hay et al. 2014). No obstante, al inicio de este proyecto no existía información disponible sobre los mecanismos y los componentes genéticos que participan o regulan la tolerancia a la sombra. Por ello, propusimos un análisis comparativo entre estas dos especies que emplean diferentes estrategias frente a la sombra (*A. thaliana* que la evita, y *C. hirsuta* que la tolera) para diseccionar las bases genéticas y moleculares de estas diferencias.

2.1. Respuestas a la sombra de plántulas de *A. thaliana* y *C. hirsuta*.

Se comparó la respuesta del alargamiento del hipocotilo en sombra simulada (W+FR) respecto a luz continua (W) en plántulas silvestres de cada una de las especies. Las plantas germinaron (día 0, d0) y crecieron a 22°C en W. Aunque las semillas de *C. hirsuta* (ecotipo Oxford, de ahora en adelante, Ox) germinaban menos sincrónicamente que las de *A. thaliana*, observamos que a los 3 días de exposición a W (d3) todas las semillas habían comenzado a germinar. Por tanto, a partir de este día las plántulas se mantuvieron en W o se transfirieron a W+FR hasta el día 7 (d7) (**Figura R2.1A**). En el capítulo anterior, el tratamiento con W+FR se aplicó a partir del d2 desde la germinación, (**Figura R1.2**). En este capítulo el tratamiento W+FR ha simulado la **sombra por dosel**, donde se recrean las condiciones de sombra vegetal, mientras que en el anterior capítulo se emplearon las condiciones de **sombra por proximidad**, donde se simulaban las condiciones de proximidad vegetal. A pesar de estas diferencias, las plántulas de *A. thaliana* (ecotipo Columbia-0, de ahora en adelante Col-0) tratadas con sombra simulada mostraban hipocotilos más largos que las mantenidas en W. En el caso de *C. hirsuta* (Ox) la longitud del hipocotilo no difería significativamente entre los dos tratamientos, en claro contraste con *A. thaliana* (**Figura R2.1B, C**).

Estos resultados indicaban que los hipocotilos en ambas especies responden diferente al mismo estímulo.

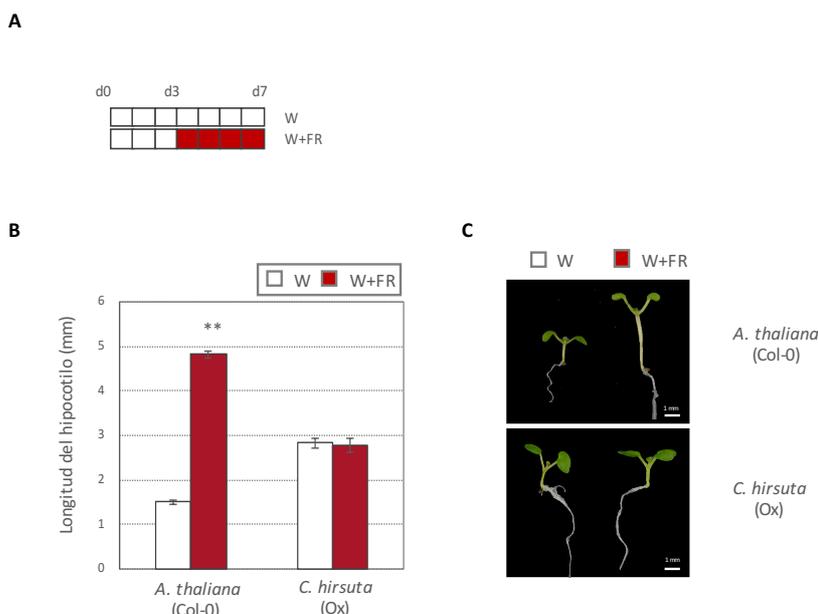


Figura R2.1. Longitud del hipocotilo de plántulas de *A. thaliana* y *C. hirsuta* en respuesta a sombra simulada. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas germinaron (día 0, d0) y crecieron durante 3 días (d3) en W; posteriormente se mantuvieron en W o se transfirieron a W+FR hasta el día 7 (d7) a 22°C. **(B)** Longitud del hipocotilo de plántulas de *A. thaliana* y *C. hirsuta* cultivadas como se indica en A. Las barras representan la media de la longitud y el error estándar (SE). Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre plántulas crecidas en W+FR respecto a W para cada especie (Prueba t de Student; ** P<0,01). **(C)** Aspecto de plántulas representativas de *A. thaliana* y *C. hirsuta* medidas en B.

A continuación nos planteamos si las plántulas de *C. hirsuta* eran capaces de percibir la sombra. Para comprobarlo analizamos otras respuestas a la proximidad vegetal, como la acumulación de pigmentos fotosintéticos o cambios rápidos en la expresión génica.

Se sabe que en plántulas de *A. thaliana* crecidas en W+FR los niveles de los pigmentos fotosintéticos carotenoides (CRT) y clorofilas (CHL) se reducen (Roig-Villanova et al. 2006; Bou-Torrent et al. 2015). En colaboración con el grupo del Dr. M. Rodríguez-Concepción (CRAG), estudiamos el efecto de la sombra simulada en los niveles de CRT y CHL (cuantificados por HPLC) de plántulas de *A. thaliana* y *C. hirsuta* (**Figura R2.2**). En las gráficas se muestran los niveles relativos de cada pigmento, tomando como 100% los de plantas de cada especie crecidas en W. Los niveles de CRT y CHL se redujeron significativamente en respuesta a sombra simulada tanto en *A. thaliana* (un 20%) como en *C. hirsuta* (un 10%).

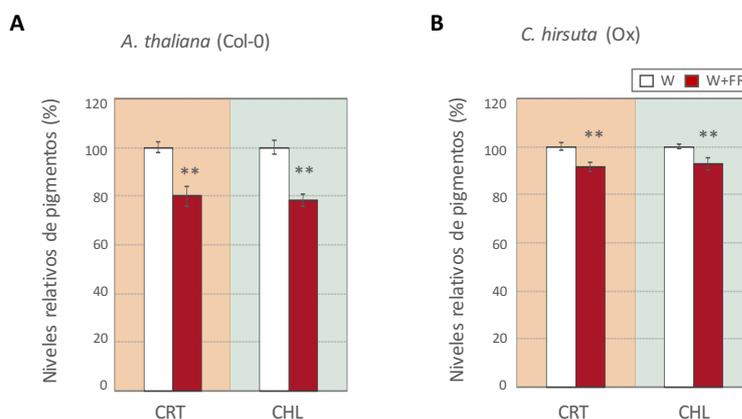


Figura R2.2. Acumulación de pigmentos en plántulas de *A. thaliana* y *C. hirsuta* en respuesta a sombra simulada. Niveles relativos (en %) de carotenoides (CRT), clorofilas (CHL) y tocoferoles (TOC) en plántulas silvestres de **(A)** *A. thaliana* (Col-0) y **(B)** *C. hirsuta* (Ox) crecidas en W y W+FR. Las plántulas crecieron como se indica en la Figura R2.1A. Se representa la media y la desviación estándar (SD). Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con W y W+FR (Prueba t de Student; ** P<0,01).

Por otro lado, la expresión de genes marcadores de sombra, como *PIL1* y *ATHB2*, estaba rápidamente inducida tanto en plántulas de *A. thaliana* como de *C. hirsuta* (Christiane Then, comunicación personal; ver **Figura R2.19B**, datos para Ox).

En conjunto, estos resultados indicaban que *C. hirsuta* era capaz de percibir la sombra y responder molecularmente a ella, si bien los hipocotilos no se alargaban (en contraste con *A. thaliana*). Basándonos en estos análisis comparativos, hipotetizamos que en *C. hirsuta* la tolerancia a la sombra ocurre por (1) una alteración en la percepción de la proximidad vegetal (por ejemplo, por cambios en la actividad de los fotorreceptores fitocromos), y/o (2) cambios en componentes de la señal aguas abajo.

2.2. PhyA y la tolerancia a la sombra en *C. hirsuta*.

Analizamos estas posibilidades estudiando el papel del phyA, descrito en *A. thaliana* como regulador negativo de las respuestas del SAS del hipocotilo. Así, plántulas de *A. thaliana* con niveles reducidos o incrementados de *PHYA* responden más o menos a diferentes condiciones de sombra simulada, respectivamente (Johnson et al. 1994a; Roig-Villanova et al. 2006; Martínez-García et al. 2014a). Estas observaciones sugerían que niveles altos de phyA podrían resultar en tolerancia a la sombra. A continuación, estudiamos la respuesta a las condiciones de sombra simulada utilizadas en el laboratorio de una línea de *A. thaliana* que sobreexpresa el *PHYA* de avena, *35S:AsPHYA* (AOX) (Boylan & Quail 1991), disponible en el laboratorio (**Figura R2.3**). Las plántulas silvestres (ecotipo Nossen-0, de ahora en adelante No-0) presentaban un hipocotilo significativamente más largo que las plántulas de AOX en W. Al tratar con sombra simulada, las plántulas No-0 mostraban hipocotilos más largos que las mantenidas en W, respuesta que estaba atenuada en las plántulas AOX.

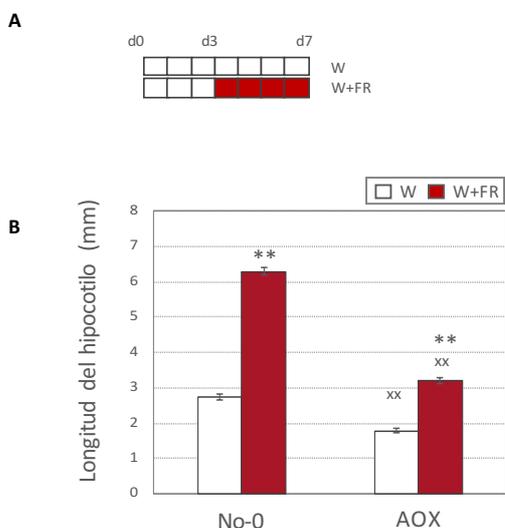


Figura R2.3. Longitud del hipocotilo de plántulas de *A. thaliana* sobreexpresantes de *PHYA* (AOX) en respuesta a sombra simulada. **(A)** Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas crecieron tal y como se detalla en la Figura R2.1A. **(B)** Longitud de los hipocotilos de plántulas silvestres No-0 y AOX (*35S:AsPHYA*) cultivadas como se indica en **A**. Las barras representan la media de la longitud y el SE de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con W y W+FR para cada genotipo (Prueba t de Student; ** P<0,01). Las cruces indican las diferencias estadísticamente significativas entre los dos genotipos.

Además, se analizó por RT-qPCR el efecto de la sobreexpresión de *PHYA* sobre la inducción por sombra simulada de los genes *PIL1* y *ATHB2* (Figura R2.4). Observamos que la expresión de estos genes se inducía significativamente por el tratamiento de sombra simulada (respecto al W) pero que sólo era significativamente menor en las plántulas AOX respecto a las No-0 en el caso del gen *PIL1*.

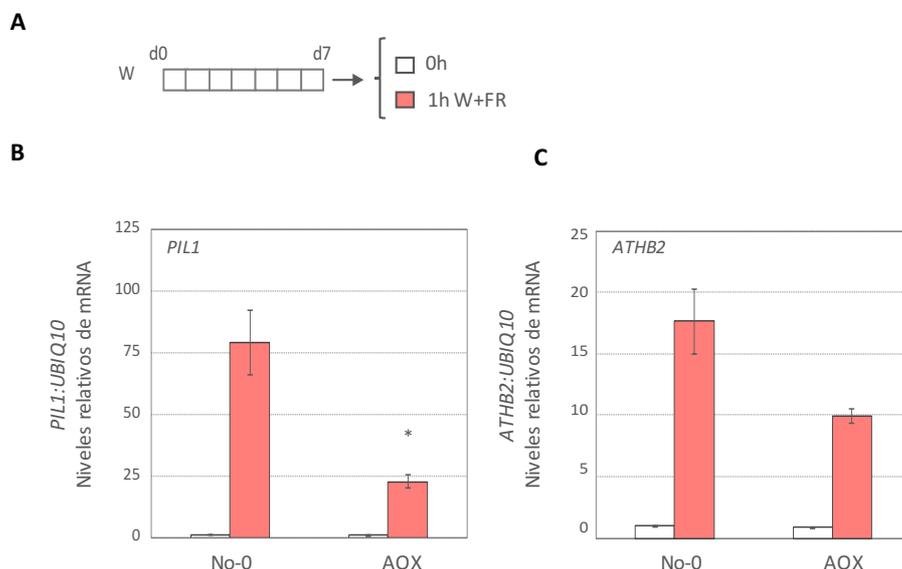


Figura R2.4. Efecto de la sobreexpresión de *PHYA* sobre la expresión de los genes *PIL1* y *ATHB2* en plántulas de *A. thaliana* en respuesta a sombra simulada. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas crecieron en W durante 7 días (d7) a 22°C. Se recolectaron muestras antes (0h, cuadrado blanco) y después de una hora de W+FR (1h, cuadrado rojo) tal y como se indica en la figura R1.3. **(B-C)** Niveles de mRNA de *PIL1* **(B)** y *ATHB2* **(C)** de plántulas silvestres (No-0) y AOX cultivadas como se describe en A. Se representa la media de tres réplicas biológicas normalizada a los niveles de transcrito del gen *UBQ10* y el SE. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas para cada condición de luz respecto a No-0 (Prueba t de Student; *P<0,05).

Estos resultados, junto con otros disponibles del mutante deficiente en *PHYA* realizados en nuestras mismas condiciones de luz y crecimiento (Martínez-García et al. 2014a), indicaban que el incremento en la actividad *phyA* reducía la respuesta a la sombra tanto a nivel de alargamiento del hipocotilo como de regulación rápida de la expresión génica.

Nos planteamos la posibilidad de que *C. hirsuta* pudiera tener aumentados los niveles de *phyA* y esto contribuir a la falta de respuesta del hipocotilo a la sombra simulada. Por este motivo comparamos los niveles de transcrito *PHYA* y de proteína *PHYA* en plántulas silvestres de las dos especies comparando los días 3, 5 y 7 de desarrollo. La cuantificación de los niveles de transcrito de *PHYA* por RT-qPCR se llevó a cabo utilizando oligonucleótidos específicos en una secuencia compartida de ambas especies, lo que permitía comparar directamente los niveles de expresión entre ambos genes (Figura R2.5), y se normalizó con el gen de referencia *ELONGATION FACTOR 1-ALPHA* (*EF1 α*) de cada especie.

<i>A. thaliana</i> PHYA	ATGTCAGGGCTCTAGGCCGAGTCAGTCCCTCTGAGGGCTCAAGGCGATCAAGGCACAGGCTAGGATCATTCGCGAGACCACCTGTAGATGCGAA	92
<i>C. hirsuta</i> PHYA	ATGTCAGGGCTCTAGGCCGAGTCAGTCCCTCTGAGGGCTCAAGGCGATCAAGGCACAGGCTAGGATCATTCGCGAGACCACCTGTAGATGCGAG	
<i>A. thaliana</i> PHYA	CTCCATGCTGATTTTGGAGAGTCAGGCAGCTCCCTTTGATTACTCAACCTCAGTGCCTGTCAGTGGCCCCTTTGGAGAAACAGCCACCACAG	185
<i>C. hirsuta</i> PHYA	CTCCATGCTGATTTTGGAGAGTCAGGCAGCTCCCTTTGATTACTCAACCTCAGTGCCTGTCAGTGGCCCCTTTGGAGAAACAGCCACCACAG	
<i>A. thaliana</i> PHYA	GTCTGACAAAGTTTACCACGACTTATCTTCATCATAACAGAGGGAAAGCTGATTCAGCCCTTCGGTGTGTTCTTCCCTTGGATGAGAAGA	277
<i>C. hirsuta</i> PHYA	GTCTGACAAAGTTTACCACGACTTATCTTCATCATAACAGAGGGAAAGCTGATTCAGCCCTTCGGTGTGTTCTTCCCTTGGATGAGAAGA	
<i>A. thaliana</i> PHYA	CTTCAAAGTATTGCATACAGCGAGAATGCACTCTGAGCTGTGACAATGGCAGTTCATGCAGTTCCTAGTGTGGCGAAACCCCTGTTCTTA	369
<i>C. hirsuta</i> PHYA	CTTCAAAGTATTGCATACAGCGAGAATGCACTCTGAGCTGTGACAATGGCAGTTCATGCAGTTCCTAGTGTGGCGAAACCCCTGTTCTTA	
<i>A. thaliana</i> PHYA	GGCATTGGGACAGATATAAGGAGTCTTTTCACTGCTCCTAGTGCCTCTGCAATGCAGAAAGCCCTTGGATTGGAGATGTCCTCTTTTGA	461
<i>C. hirsuta</i> PHYA	GGCATTGGGACAGATATAAGGAGTCTTTTCACTGCTCCTAGTGCCTCTGCAATGCAGAAAGCCCTTGGATTGGAGATGTCCTCTTTTGA	
<i>A. thaliana</i> PHYA	CCCATCTCTGTGCACTGCAGGACTTCTCGAAAGCCCTTTTATGCAATTTCCACAGGGTTACAGGGAGCATCATATGTCAGTCTTGAACCCG	553
<i>C. hirsuta</i> PHYA	CCCATCTCTGTGCACTGCAGGACTTCTCGAAAGCCCTTTTATGCAATTTCCACAGGGTTACAGGGAGCATCATATGTCAGTCTTGAACCCG	
<i>A. thaliana</i> PHYA	TGAAGCCTTATGAAGTCCCATGACAGCTGCTGGTGCCTTACAATCATAAAGCTCGCTGGCCAAAGCAATCCTAGGTCGCACTCTTCCC	645
<i>C. hirsuta</i> PHYA	TGAAGCCTTATGAAGTCCCATGACAGCTGCTGGTGCCTTACAATCATAAAGCTCGCTGGCCAAAGCAATCCTAGGTCGCACTCTTCCC	
<i>A. thaliana</i> PHYA	AGCGGGATATGGAAAGGCTTTGTGATACATAGTTTCAAGAGGTTTGAACACAGGGTATGACAGGGTATGCGCTTATAGTTTCATGA	737
<i>C. hirsuta</i> PHYA	AGCGGGATATGGAAAGGCTTTGTGATACATAGTTTCAAGAGGTTTGAACACAGGGTATGACAGGGTATGCGCTTATAGTTTCATGA	
<i>A. thaliana</i> PHYA	AGATGATCAGGTTGAGGTTCTCTCCAGGTTACAAAACCTGGCTGGAGCCATATCTTGGGCTGCATATCCCGCCACCGACATCCCTCAAG	829
<i>C. hirsuta</i> PHYA	AGATGATCAGGTTGAGGTTCTCTCCAGGTTACAAAACCTGGCTGGAGCCATATCTTGGGCTGCATATCCCGCCACCGACATCCCTCAAG	
<i>A. thaliana</i> PHYA	CAGCCCGTTTTCTGTTTATGAAGAAACAGGTCGGATGATAGTTGATGCAATGCAAAACATGCTAGGGTCTTCAAGATGAAAAGCTTTCC	921
<i>C. hirsuta</i> PHYA	CAGCCCGTTTTCTGTTTATGAAGAAACAGGTCGGATGATAGTTGATGCAATGCAAAACATGCTAGGGTCTTCAAGATGAAAAGCTTTCC	
<i>A. thaliana</i> PHYA	TTTGAACCTTACCTGTGTGGCTCCACCTTAGAGCACCGCACAGCTGCCATTTGCAGTACATGGCCAAACATGGATTCAATTCATCTCTGGT	1013
<i>C. hirsuta</i> PHYA	TTTGAACCTTACCTGTGTGGCTCCACCTTAGAGCACCGCACAGCTGCCATTTGCAGTACATGGCCAAACATGGATTCAATTCATCTCTGGT	
<i>A. thaliana</i> PHYA	TATGGCGTGTAGTTAACGAGGAAGATGGAAAGGGGATGCTCCTGATCTACTACACAGCCCTAAAAGAGAAGAGACTATGGGGTTTAG	1105
<i>C. hirsuta</i> PHYA	TATGGCGTGTAGTTAACGAGGAAGATGGAAAGGGGATGCTCCTGATCTACTACACAGCCCTAAAAGAGAAGAGACTATGGGGTTTAG	
<i>A. thaliana</i> PHYA	TGTTTTGTCATAACACTCTCCAGGTTTGTTCCTTTTCCCTCAGGATGCTGAGTGTGAGTTCTTAGCTCAAGTGTGCCATACACGTCAT	1197
<i>C. hirsuta</i> PHYA	TGTTTTGTCATAACACTCTCCAGGTTTGTTCCTTTTCCCTCAGGATGCTGAGTGTGAGTTCTTAGCTCAAGTGTGCCATACACGTCAT	
<i>A. thaliana</i> PHYA	AAGCAGGTGGAAGTGCATTAACAGATGTTGGAGAAAGCAATTTTCCGCAACAGACACTCTTGTGGATATGCTGATGCTGATGCTCCACT	1289
<i>C. hirsuta</i> PHYA	AAGCAGGTGGAAGTGCATTAACAGATGTTGGAGAAAGCAATTTTCCGCAACAGACACTCTTGTGGATATGCTGATGCTGATGCTCCACT	
<i>A. thaliana</i> PHYA	GGGTATTGTGTCCAAAGCCCAACATAATGGACCTTTGTGAATGTGATGGAGCAGCTCTCTGTATAAAGACAAGATATGGAACCTGGGAA	1381
<i>C. hirsuta</i> PHYA	GGGTATTGTGTCCAAAGCCCAACATAATGGACCTTTGTGAATGTGATGGAGCAGCTCTCTGTATAAAGACAAGATATGGAACCTGGGAA	
<i>A. thaliana</i> PHYA	CAACTCCAAGTGAATCCACTGCGAGAGATAGCTTCATGTTGTGTGAATACACATGGATTCAACGGGTTTGGAGCAGTATAGTTTGCAT	1473
<i>C. hirsuta</i> PHYA	CAACTCCAAGTGAATCCACTGCGAGAGATAGCTTCATGTTGTGTGAATACACATGGATTCAACGGGTTTGGAGCAGTATAGTTTGCAT	
<i>A. thaliana</i> PHYA	GAGCGGGGTTTCCAGGCTCTATCTCTGGGGATGCTGATGTGGGATGGCAGCTGTGAGGATATCTCCAAAGACATGATTTCTGGTT	1565
<i>C. hirsuta</i> PHYA	GAGCGGGGTTTCCAGGCTCTATCTCTGGGGATGCTGATGTGGGATGGCAGCTGTGAGGATATCTCCAAAGACATGATTTCTGGTT	
<i>A. thaliana</i> PHYA	CCGTTCTCATACCGCTGGTGAAGTGAAGTGGGAGGTCGAAGCATGATCCAGATGATAGGGATGATGCAAGGAGAAATGCCAAGGTCAT	1657
<i>C. hirsuta</i> PHYA	CCGTTCTCATACCGCTGGTGAAGTGAAGTGGGAGGTCGAAGCATGATCCAGATGATAGGGATGATGCAAGGAGAAATGCCAAGGTCAT	
<i>A. thaliana</i> PHYA	CGTTCAAGGCTTTCCCTGAAGTGGTCAAGACAAGGAGTTTACCTTGAAGGACTATGAGATGGATGCCATACACTCCTTGAACCTTATTGT	1749
<i>C. hirsuta</i> PHYA	CGTTCAAGGCTTTCCCTGAAGTGGTCAAGACAAGGAGTTTACCTTGAAGGACTATGAGATGGATGCCATACACTCCTTGAACCTTATTGT	
<i>A. thaliana</i> PHYA	AGGAATGCTTCAAGGATAGTGAAGTACTGATGTGAATACAAAGTCAATTTACTCGAAGCTAAATGATCTAAAATGATGGTATACAAGA	1841
<i>C. hirsuta</i> PHYA	AGGAATGCTTCAAGGATAGTGAAGTACTGATGTGAATACAAAGTCAATTTACTCGAAGCTAAATGATCTAAAATGATGGTATACAAGA	
<i>A. thaliana</i> PHYA	ACTAGAAGCTGTGACCAGTGAATGGTTCGTTTAAATGAGACTGCTACGGTCCAAATATTTGGCGGTTGATTTCTGATGGAATGGTAAATGGCT	1933
<i>C. hirsuta</i> PHYA	ACTAGAAGCTGTGACCAGTGAATGGTTCGTTTAAATGAGACTGCTACGGTCCAAATATTTGGCGGTTGATTTCTGATGGAATGGTAAATGGCT	
<i>A. thaliana</i> PHYA	GGAAACGAAAATGCTGAGCTGACTGGTCTTCCGTTGATGAAGCAATCGGGAAGCATTTCCCTCACACTGTTGATGGAATGTTTAAATGGCT	2025
<i>C. hirsuta</i> PHYA	GGAAACGAAAATGCTGAGCTGACTGGTCTTCCGTTGATGAAGCAATCGGGAAGCATTTCCCTCACACTGTTGATGGAATGTTTAAATGGCT	
<i>A. thaliana</i> PHYA	ATCGTTAAAGGATCTAGAGAAAGCATTAGAAGAAACAGGAGCAGAAATGCCAATTTGAGATCAAGACACATCTGTCAGGGCTGTATGC	2117
<i>C. hirsuta</i> PHYA	ATCGTTAAAGGATCTAGAGAAAGCATTAGAAGAAACAGGAGCAGAAATGCCAATTTGAGATCAAGACACATCTGTCAGGGCTGTATGC	
<i>A. thaliana</i> PHYA	TGGCCAATAAGTTAGTTGTAATGCAATGCGCAGTAGAGATCTCCATGAAAACGTTGGTGGGTGTGTTTTGTAGCCATGATCTTACTG	2209
<i>C. hirsuta</i> PHYA	TGGCCAATAAGTTAGTTGTAATGCAATGCGCAGTAGAGATCTCCATGAAAACGTTGGTGGGTGTGTTTTGTAGCCATGATCTTACTG	
<i>A. thaliana</i> PHYA	GCCAGAAGACTGTGATGGACAAGTTTACCGGATGAAAGTGTATACAAGCAATCATCCAAAACCCAAAACCCGCTGATCCCGCCATATTT	2301
<i>C. hirsuta</i> PHYA	GCCAGAAGACTGTGATGGACAAGTTTACCGGATGAAAGTGTATACAAGCAATCATCCAAAACCCAAAACCCGCTGATCCCGCCATATTT	
<i>A. thaliana</i> PHYA	GGTACGATGAGTTGGATGGTGCACAGATGGAATCCAGCAATGTCAAAGTTAACCGGTTTGAAGCGGAGGAAGTGAATGACAAAATGCT	2393
<i>C. hirsuta</i> PHYA	GGTACGATGAGTTGGATGGTGCACAGATGGAATCCAGCAATGTCAAAGTTAACCGGTTTGAAGCGGAGGAAGTGAATGACAAAATGCT	
<i>A. thaliana</i> PHYA	CTTAGGAGAAGTATTTGGGACCCAGAAGTCTTGTTCGCTTAAAGAATCAAGAAGCCTTTGTAACCTTGGGATGTGCTGAACAATGCTG	2485
<i>C. hirsuta</i> PHYA	CTTAGGAGAAGTATTTGGGACCCAGAAGTCTTGTTCGCTTAAAGAATCAAGAAGCCTTTGTAACCTTGGGATGTGCTGAACAATGCTG	
<i>A. thaliana</i> PHYA	TGACCAGTCAAGATCCAGAGAAAGTTCCTTTGCTTCTTACAAGAGGTTGCAAGTATATCGAGTGTCTTTGTGTGTGATGAAAGAACTG	2577
<i>C. hirsuta</i> PHYA	TGACCAGTCAAGATCCAGAGAAAGTTCCTTTGCTTCTTACAAGAGGTTGCAAGTATATCGAGTGTCTTTGTGTGTGATGAAAGAACTG	
<i>A. thaliana</i> PHYA	GACAGGGAAAGTGTAGTGACAGGCTCTCTCTGTTTCTGCAACTTGCAGCCATGAGCTGCAGCAAGCCCTCCATGTTCAACCTTTAGCTGA	2669
<i>C. hirsuta</i> PHYA	GACAGGGAAAGTGTAGTGACAGGCTCTCTCTGTTTCTGCAACTTGCAGCCATGAGCTGCAGCAAGCCCTCCATGTTCAACCTTTAGCTGA	
<i>A. thaliana</i> PHYA	GCGAAGCGACTGAAGAGACTAAAAGCCTCTGCAATACATAAAAAGACAGATCAGGAATCCGCTATCTGGGATCTTTACAGGAAAATGA	2761
<i>C. hirsuta</i> PHYA	GCGAAGCGACTGAAGAGACTAAAAGCCTCTGCAATACATAAAAAGACAGATCAGGAATCCGCTATCTGGGATCTTTACAGGAAAATGA	
<i>A. thaliana</i> PHYA	TGAGGGCTACTGAATTAGGACCAGAGCAAGAGCGATTTTGCAAAATAGCCGCTTATGTCAGAAGCAACTAGCAAGTCTCTGATGATCC	2853
<i>C. hirsuta</i> PHYA	TGAGGGCTACTGAATTAGGACCAGAGCAAGAGCGATTTTGCAAAATAGCCGCTTATGTCAGAAGCAACTAGCAAGTCTCTGATGATCC	
<i>A. thaliana</i> PHYA	GATCTTGAAGCATCATGAAAGGCTTTGGATGTTGAAATGAAAGATTTACCTTAAATGAAGTGTACTGCTTCCACAAGTCAAGTAAT	2945
<i>C. hirsuta</i> PHYA	GATCTTGAAGCATCATGAAAGGCTTTGGATGTTGAAATGAAAGATTTACCTTAAATGAAGTGTACTGCTTCCACAAGTCAAGTAAT	
<i>A. thaliana</i> PHYA	GATGAAGAGTAAAGGAAAGAGCTTCGGATAACAAATGAGACTGGAGAAGAAGTATGCTGTGACTTTGTATGGAGACAGTATTAGGCTTC	3037
<i>C. hirsuta</i> PHYA	GATGAAGAGTAAAGGAAAGAGCTTCGGATAACAAATGAGACTGGAGAAGAAGTATGCTGTGACTTTGTATGGAGACAGTATTAGGCTTC	
<i>A. thaliana</i> PHYA	AACAAGTCTTGGCAGATTTTATGCTGATGCTTCAAACCTTACACCATCCGAGGTCAGCTAACTGTTCCAGTCTTCCAGGAAAGATCAG	3129
<i>C. hirsuta</i> PHYA	AACAAGTCTTGGCAGATTTTATGCTGATGCTTCAAACCTTACACCATCCGAGGTCAGCTAACTGTTCCAGTCTTCCAGGAAAGATCAG	
<i>A. thaliana</i> PHYA	CTGGGCTCTCTGTGATCTTGTCTTATCTAGAGATCAGGTTAACGCATACCCGAGCTGGGATACCAGTTTTTCTAAAACCAATGTTTGG	3221
<i>C. hirsuta</i> PHYA	CTGGGCTCTCTGTGATCTTGTCTTATCTAGAGATCAGGTTAACGCATACCCGAGCTGGGATACCAGTTTTTCTAAAACCAATGTTTGG	
<i>A. thaliana</i> PHYA	GACGAGGAAGATGTGTGAGAAAGGATGAGCTTATGGTTAGCCGAAACTGGTGAAGCTGATGAATGGAGATGTTGAGTCTTGGAGAC	3313
<i>C. hirsuta</i> PHYA	GACGAGGAAGATGTGTGAGAAAGGATGAGCTTATGGTTAGCCGAAACTGGTGAAGCTGATGAATGGAGATGTTGAGTCTTGGAGAC	
<i>A. thaliana</i> PHYA	AAGCTGGCAAAATCAGTTTCATTATCACTGCGCAACTCGCTGCAGCAACCAAGTAG	3369
<i>C. hirsuta</i> PHYA	AAGCTGGCAAAATCAGTTTCATTATCACTGCGCAACTCGCTGCAGCAACCAAGTAG	

94,4% de similitud entre PHYA de *A. thaliana* y *C. hirsuta*

Figura R2.5. Alineamiento de las secuencias de cDNA de PHYA de *A. thaliana* y *C. hirsuta*. En gris marcan las bases que difieren entre las dos especies. En rojo se indican los oligos (MJO75+MJO76) empleados para la comparación y cuantificación de los niveles de PHYA entre estas dos especies mediante RT-qPCR.

Debido a que la expresión de *PHYA* se reprime por luz, y la proteína *PHYA* es fotolábil, es decir, se degrada en presencia de luz (Clough & Vierstra 1997; Bauer et al. 2004; Seo et al. 2004), las plántulas crecieron y se recogieron en oscuridad (**Figura R2.6A**, plántulas etioladas, caracterizadas por mostrar los cotiledones cerrados, sin expandir y el hipocotilo muy largo). Se observó que los niveles de *PHYA* para las dos especies eran similares en el día 3 (d3), apenas cambiaban con la edad de la plántula en *A. thaliana* y aumentaban significativamente en *C. hirsuta* a partir del día 5 (d5) (**Figura R2.6B**). Para cuantificar los niveles de proteína *PHYA* (**Figura R2.6C, D**), se realizó una extracción total de proteínas en condiciones desnaturalizantes, que se separaron por electroforesis. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se detectó el *PHYA* con un anticuerpo monoclonal específico (anti-phyA 0.73D) (Quail et al. 1995); como control de carga se utilizó un anticuerpo monoclonal comercial contra la TUBULINA (anti-TUB). La comparación de niveles de *PHYA*:TUB se llevó a cabo entre muestras de plántulas de las dos especies de la misma edad. En d3 los niveles de *PHYA*:TUB eran similares entre especies mientras que en d5 y d7 eran significativamente más altos en *C. hirsuta*, resultados que estaban de acuerdo con la tendencia que se había observado en los niveles relativos de expresión del *PHYA*.

Conjuntamente, estos resultados indicaban que en *C. hirsuta* la acumulación de transcrito y de proteína *PHYA* en plántulas etioladas es mayor que en *A. thaliana*, sugiriendo que este incremento podría contribuir a las diferencias de respuesta del hipocotilo a la proximidad vegetal entre las dos especies.

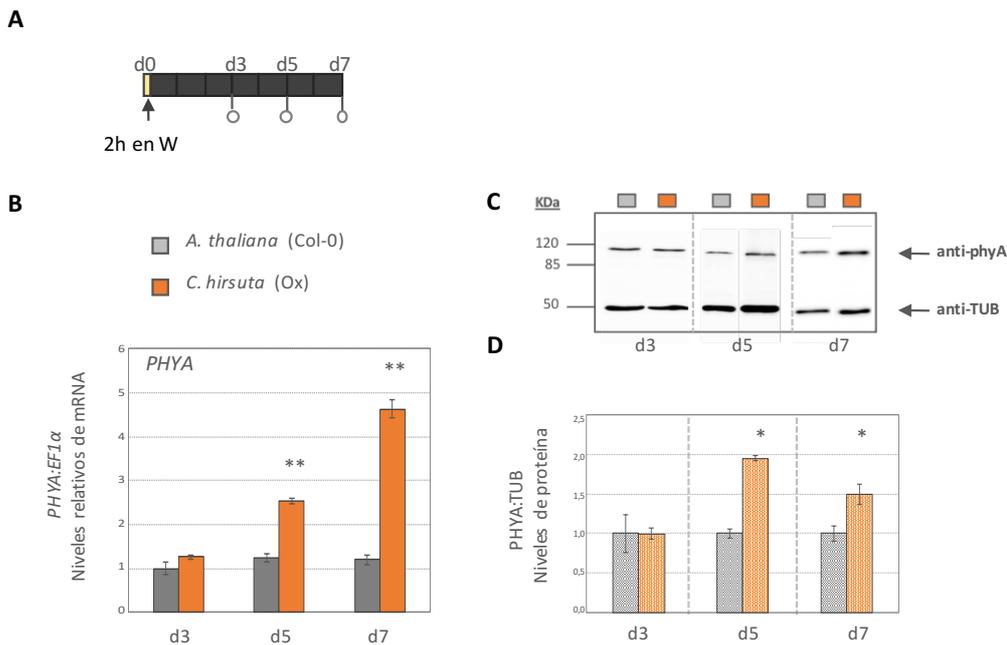


Figura R2.6. Niveles de transcrito *PHYA* y proteína *PHYA* en *A. thaliana* y *C. hirsuta* en oscuridad. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Tras la estratificación durante 4 días a 4°C, la germinación de semillas se indujo transfiriendo las placas a 22°C e irradiándolas 2 horas con luz W (d0, indicado con una flecha). A continuación, las placas se mantuvieron en oscuridad a 22°C y se recolectó el material a los 3 (d3), 5 (d5) y 7 (d7) días (indicado con un círculo). **(B)** Niveles relativos de mRNA de *PHYA* en plántulas crecidas en las condiciones descritas en **A** para cada especie. Las barras representan la media normalizada a los niveles de transcrito del gen *EF1α* y el SE de tres réplicas biológicas. **(C)** Detección de las proteínas *PHYA* (banda superior) y tubulina (TUB, banda inferior) en extractos de plántulas crecidas como se indica en **A**. Las bandas se detectaron por inmunoblot usando anticuerpos específicos contra las proteínas *PHYA* (anti-phyA) y TUB (anti-TUB), que se usó como control de carga. **(D)** Niveles de proteína relativizados a los

del PHYA de *A. thaliana* (normalizados con los de TUB). En **B**, los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas para cada día y especie (datos relativos al nivel de PHYA de *A. thaliana* en d3). En **D**, los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre especies para cada día (Prueba t de Student; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

2.3. Estrategias para el análisis comparativo entre especies.

2.3.1. Estrategia directa: Identificación y caracterización de líneas transgénicas de *C. hirsuta* con niveles reducidos de fitocromo A (phyA).

Con el fin de estudiar la hipótesis de que niveles altos o bajo de phyA podrían resultar en la diferencia de estrategia de tolerancia o en la huida de la sombra, se generaron y analizaron líneas de *C. hirsuta* con niveles reducidos de phyA mediante sobreexpresión de un RNAi (en inglés, *RNA interference*) dirigido contra el gen que codifica el PHYA de *C. hirsuta* (*RNAi:ChPHYA*) (plásmido pCT31 generado por C. Then). Tras la transformación de plantas de *C. hirsuta* con este plásmido, se obtuvieron un total de 25 plantas transgénicas independientes (transformantes primarios, T1). En la generación T2 se determinó que un total de 9 líneas tenían 1 inserción de T-DNA, que en la generación T3 llevamos a homocigosis. Finalmente seleccionamos tres líneas *RNAi:ChPHYA* (#0532, #0865 y #134) para caracterizarlas molecular, genética y fisiológicamente. El análisis de los niveles de expresión de *ChPHYA* por RT-qPCR en plántulas etioladas de 4 días mostró que en las diferentes líneas analizadas los niveles de *ChPHYA* estaban significativamente reducidos (un 80%) respecto a los de la línea Ox silvestre (**Figura R2.7A, B**). Asimismo, la proteína PHYA no se detectaba en análisis de inmunoblot (experimentos realizados por E. Botterweg) (**Figura R2.7A, C**). Estos resultados indicaban que el RNAi dirigido contra el gen *ChPHYA* había funcionado y había resultado en plantas con niveles reducidos de fotorreceptor.

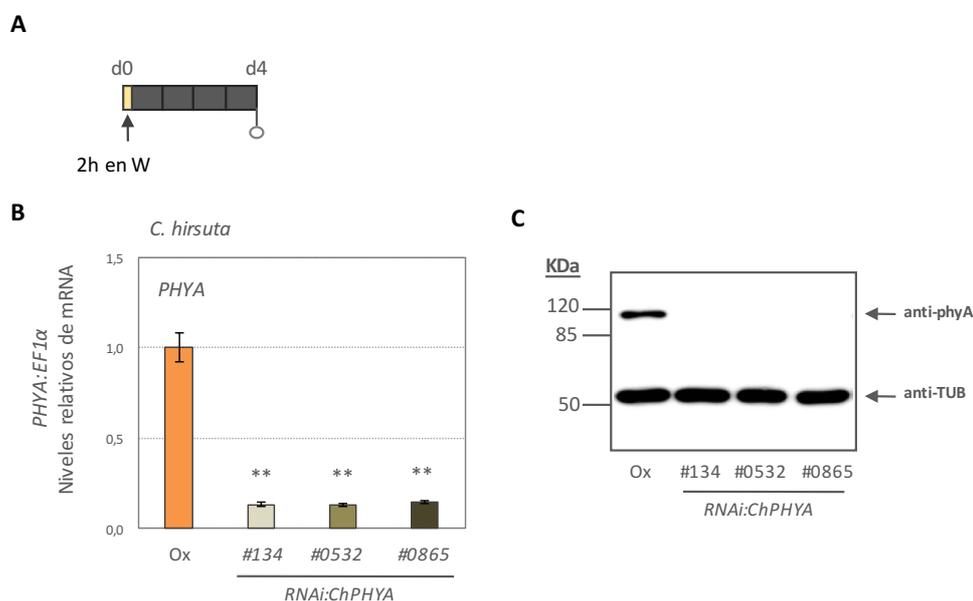


Figura R2.7. Niveles de PHYA y phyA en plántulas etioladas de líneas transgénicas *RNAi:PHYA* de *C. hirsuta*. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas crecieron tal y como se detalla en la Figura R2.6A, y el material biológico se recogió en día 4 (d4). (B) Cuantificación de los niveles de mRNA de PHYA de plántulas crecidas en las condiciones descritas en A. Las barras representan la media normalizada a los niveles de transcrito del gen *EF1α* y el SE de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas para cada línea *RNAi:ChPHYA* respecto a la silvestre (Ox) (Prueba t de Student; ** $P < 0,01$). (D) Detección por análisis inmunoblot de proteína PHYA y TUB en extractos de plántulas crecidas como se indica en A. Las bandas se detectaron usando anticuerpos específicos anti-phyA y anti-TUB.

El análisis del alargamiento del hipocotilo (**Figura R2.8**) mostró que las plántulas *RNAi:ChPHYA* se alargaban significativamente más en respuesta a sombra simulada que las Ox, tal y como se observaba en los mutantes *phyA* en *A. thaliana* respecto al Col-0 (Martínez-García et al. 2014). El conjunto de estos resultados indicaba que la reducción de los niveles de *ChPHYA* resultaba en plántulas que respondían a sombra simulada alargando sus hipocotilos, tal como habíamos postulado. Esto sugería que el *phyA* inhibe el alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra simulada en *C. hirsuta*.

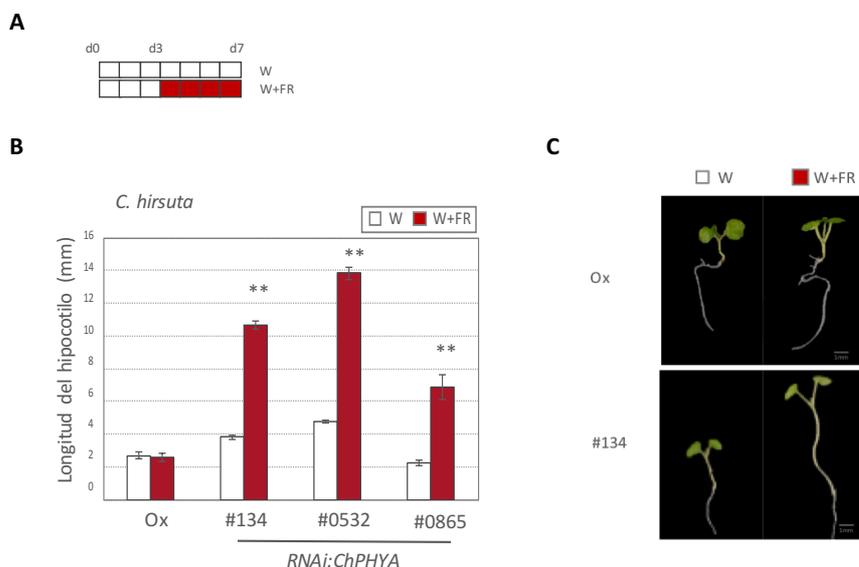


Figura R2.8. Longitud del hipocotilo de plántulas de líneas transgénicas *RNAi:PHYA* de *C. hirsuta* en respuesta a sombra simulada. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas crecieron tal y como se detalla en la Figura R2.1A. **(B)** Longitud de los hipocotilos de plántulas de *C. hirsuta* silvestres (Ox) y *RNAi:ChPHYA* cultivadas como se describe en A. Se representa la media de la longitud y el SE. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con W y W+FR para cada genotipo (Prueba t de Student; ** $P < 0,01$). **(C)** Aspecto de plántulas representativas medidas en B.

2.3.2. Estrategia indirecta: Cribado genético para la identificación de mutantes en *C. hirsuta*.

Como estrategia complementaria para identificar componentes implicados en la tolerancia a la sombra en *C. hirsuta* se realizó un cribado genético de una población mutagenizada con *MetanoSulfonato de Etilo* (EMS, del inglés *Ethyl MethaneSulfonate*,) de *C. hirsuta* (población cedida por el Prof. M. Tsiantis, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Colonia, Alemania).

En colaboración con C. Then se sembraron 100 semillas de cada una de las 200 familias de la generación M2 disponibles. Cada familia M2 provenía de 5 plantas de la generación M1 (**Figura R2.9A**). En total se sembraron unos 20.000 individuos que crecieron en sombra simulada hasta d7 (**Figura R2.9B**). Debido a la edad de las semillas, la tasa de germinación fue baja y el aspecto de las plántulas era muy heterogéneo. No obstante, se determinó como parámetro de selección que la longitud del hipocotilo fuera mayor que 6 mm, debido a que las plantas Ox en W+FR raramente alcanzaban tal longitud en nuestras condiciones del laboratorio (ver **Figura R2.1**). Con este criterio, se midió la longitud de los hipocotilos de todas las plántulas totalmente germinadas

en las condiciones descritas, se identificaron y seleccionaron mutantes putativos. Los mutantes encontrados se nombraron como sigue: “*mx.y*”, donde “*m*” indica que se trata de un mutante, “*x*” es el número de la familia (1 a 200), e “*y*” un número correlativo que identificaba cada individuo encontrado en dicha familia. Así *m181.2* indicaría que se trataba del segundo mutante de la familia 181 con un hipocotilo mayor de 6 mm de longitud. Inicialmente se encontraron 37 posibles mutantes que se pasaron a tierra y crecieron en W para obtener la siguiente generación (M3) (**Figura R2.9B**). De estas plantas, 26 sobrevivieron, llegaron a estadio adulto y produjeron semillas. En la generación M3 se confirmaron los resultados incorporando al experimento placas donde las plántulas crecían tanto en W como en W+FR (por ejemplo, **Figura R2.1A**), experimento que nos permitió establecer si el alargamiento de las plántulas en sombra simulada era significativamente mayor que cuando crecían en W.

A Material de partida:

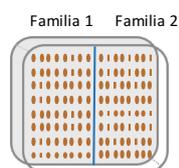
- Semillas de *C. hirsuta* mutagenizadas con EMS.
- 200 familias (generación M2).
- Cada familia procede de 5 plantas M1.



B

Condiciones del cribado genético:

1. Siembra equidistante de ~100 semillas de cada una de las 200 familias (M2).
2. Condiciones de crecimiento.



3. Identificación y selección de plántulas con hipocotilo con una longitud > 6 mm (M2): mutantes putativos.
4. Crecimiento y producción de semillas (M3) de los mutantes putativo: Comprobación del fenotipo mutante.

C

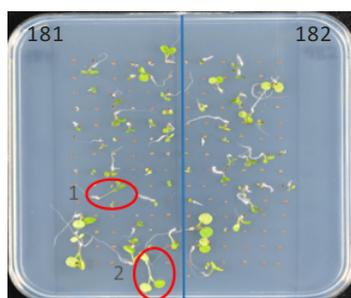


Figura R2.9. Esquema del cribado genético para la identificación de mutantes de *C. hirsuta* que evitan la sombra. (A) Se partió de 200 familias de semillas de *C. hirsuta* mutagenizadas con EMS (generación M2). **(B)** Condiciones del cribado genético: (1) siembra de unas 100 semillas de cada una de las 200 familias M2; (2) esquema de las condiciones de crecimiento para el cribado (3) identificación y selección de posibles mutantes en base a la longitud del hipocotilo; (4) comprobación del fenotipo mutante en la generación M3. **(C)** Aspecto de una placa con dos familias M2 (181 y 182) tras el cribado genético; los círculos rojos señalan los dos individuos seleccionados en la familia 181, denominados *m181.1* y *m181.2*.

Los 26 mutantes se clasificaron en dos tipos generales: (1) con hipocotilos más largos que los silvestres en W+FR pero que apenas se alargaban en W (14 mutantes; p.ej., *m10.2*); y (2) con hipocotilos largos tanto en W+FR como en W (12 mutantes; p. ej., *m8.3*). De éstos, nos interesaban los mutantes del grupo (1), ya que buscábamos mutantes que hubieran recuperado la capacidad de responder a sombra en contraste con las plántulas Ox, que mostraban un crecimiento del hipocotilo similar en ambas condiciones (**Figura R2.1B**). De los 14 mutantes obtenidos, nos centramos en los que mostraban fenotipos más fuertes, es decir, aquellos cuyos hipocotilos eran más largos en W+FR. Además, con la finalidad de caracterizar las respuestas dependientes de fitocromos de los mutantes encontrados, se realizaron experimentos en luz monocromática FR continua (FRc, percibida por phyA) y R continua (Rc, percibida principalmente por phyB). Se resumen los resultados en la **Tabla R2.1**.

Como resultado de estos estudios, seleccionamos los mutantes *m10.2*, *m31.2*, *m181.1*, *m181.2* (marcados con una flecha), que compartían los siguientes fenotipos: hipocotilos más largos que los silvestres en W+FR pero iguales o algo más largos en luz W, hipocotilos etiolados (ciegos) en FRc e hipocotilos con fenotipo silvestre en Rc. Debido al fenotipo tan alargado de los hipocotilos observado en sombra simulada, estos mutantes se renombraron como *slender in shade (sis)*.

M3, M4 y M5				
Mutantes	Respuesta del hipocotilo			Germinación y semillas
	W+FR	FRc	Rc	
<i>m8.3</i>	-	WT	WT	
→ <i>m10.2</i>	++	Ciega	WT	
<i>m31.1</i>	-	Na	Na	
→ <i>m31.2</i>	++	Ciega	WT	
<i>m33.1</i>	-	Na	Na	
<i>m37.1</i>	-	Na	Na	
<i>m39.1</i>	-	Na	Na	
<i>m39.2</i>	+	Na	Na	Sin semillas
<i>m55.1</i>	+	WT	WT	
<i>m66.1</i>	+	Na	Na	Sin semillas
<i>m70.1</i>	++?	WT	?	Problemas de germinación
<i>m74.1</i>	++	WT	Na	Problemas de germinación
<i>m77.1</i>	++	Na	Na	Sin semillas
<i>m91.1</i>	++	Na	Na	Sin semillas
<i>m96.1</i>	++?	WT	WT	
<i>m104.2</i>	-	WT	?	Problemas de germinación
<i>m110.3</i>	-	WT	?	Problemas de germinación
<i>m116.1</i>	++	Hiposensible	Hiposensible	
<i>m126.2</i>	-	Na	Na	
<i>m133.1</i>	-	WT	Hiposensible	
<i>m143.4</i>	-	Na	Na	
→ <i>m147.1</i>	++	Ciega	Ciega	Problemas de germinación
→ <i>m181.1</i>	++	Ciega	WT	
<i>m181.2</i>	++	Ciega	WT	
<i>m194.1</i>	-	WT	Ciega	
<i>m199.1</i>	-	Na	Na	

Tabla R2.1. Resumen de los fenotipos analizados de los putativos mutantes de *C. hirsuta* que evitan la sombra encontrados en el cribado genético. Para cada mutante identificado (primera columna izquierda) se indica la respuesta del hipocotilo cuando crecieron en W+FR, en luz monocromática FRc y Rc. En W+FR, las plantas crecieron tal como se indica en la Figura 2.1A. Se indica si el alargamiento en W y W+FR es significativamente diferente (+, P<0,05; y ++, P<0,01, prueba t de Student). Para los experimentos en FRc y Rc, tras la estratificación durante 4 días a 4°C se indujo la germinación de semillas de Col-0 y Knox-18 transfiriendo las placas a 22°C e irradiándolas 2 horas con luz W (d0, indicado con una flecha). A las 24 h del inicio de la inducción de la germinación, las placas se mantuvieron en oscuridad (Dark, D) o se irradiaron con distintas intensidades FRc o Rc hasta el día 4 (d4). Se indica si las plántulas mostraban hipocotilos etiolados (**Ciega**), más largos (**Hiposensible**) o iguales a los de las línea silvestre (**WT**) en las condiciones de luz indicadas; **N.a.**, No analizada; **?**, si los resultados no eran concluyentes por poblaciones

pequeñas o resultados contradictorios. Las observaciones detalladas en la columna de la derecha indican aspectos relacionados con el mantenimiento y análisis de las líneas. Las flechas señalan los mutantes que se seleccionaron para su caracterización posterior.

Utilizando semillas de las generaciones M4 y M5 se repitieron los experimentos de respuesta del hipocotilo a sombra simulada, a FRc y a Rc para las líneas específicas indicadas. Excluimos el mutante *m181.2* de estos análisis debido a que en estadio adulto las plantas presentaban un aspecto poco saludable y nos proporcionaron semillas más tarde.

El conjunto de análisis fenotípicos realizados con las semillas de las diferentes generaciones disponibles de *m10.2*, *m31.2*, *m181.1* confirmó que (1) en sombra simulada las plántulas mutantes presentan hipocotilos más largos que los silvestres (**Figura R2.10A**), (2) en FRc eran etiolados (**Figura R2.10B**) y (3) en Rc tenían un fenotipo silvestre (**Figura R2.10C**). La similitud de respuestas de *m10.2*, *m31.2*, *m181.1* nos llevó a pensar que podrían ser mutantes para el mismo gen; además, la ceguera de estas plántulas específicamente a FRc recordaba el fenotipo por el que se encontró el mutante de *phyA* en *A. thaliana* (Whitelam et al. 1993), lo que sugería que podía tratarse de mutantes de *PHYA* o de alguno de los componentes de su vía de señalización.

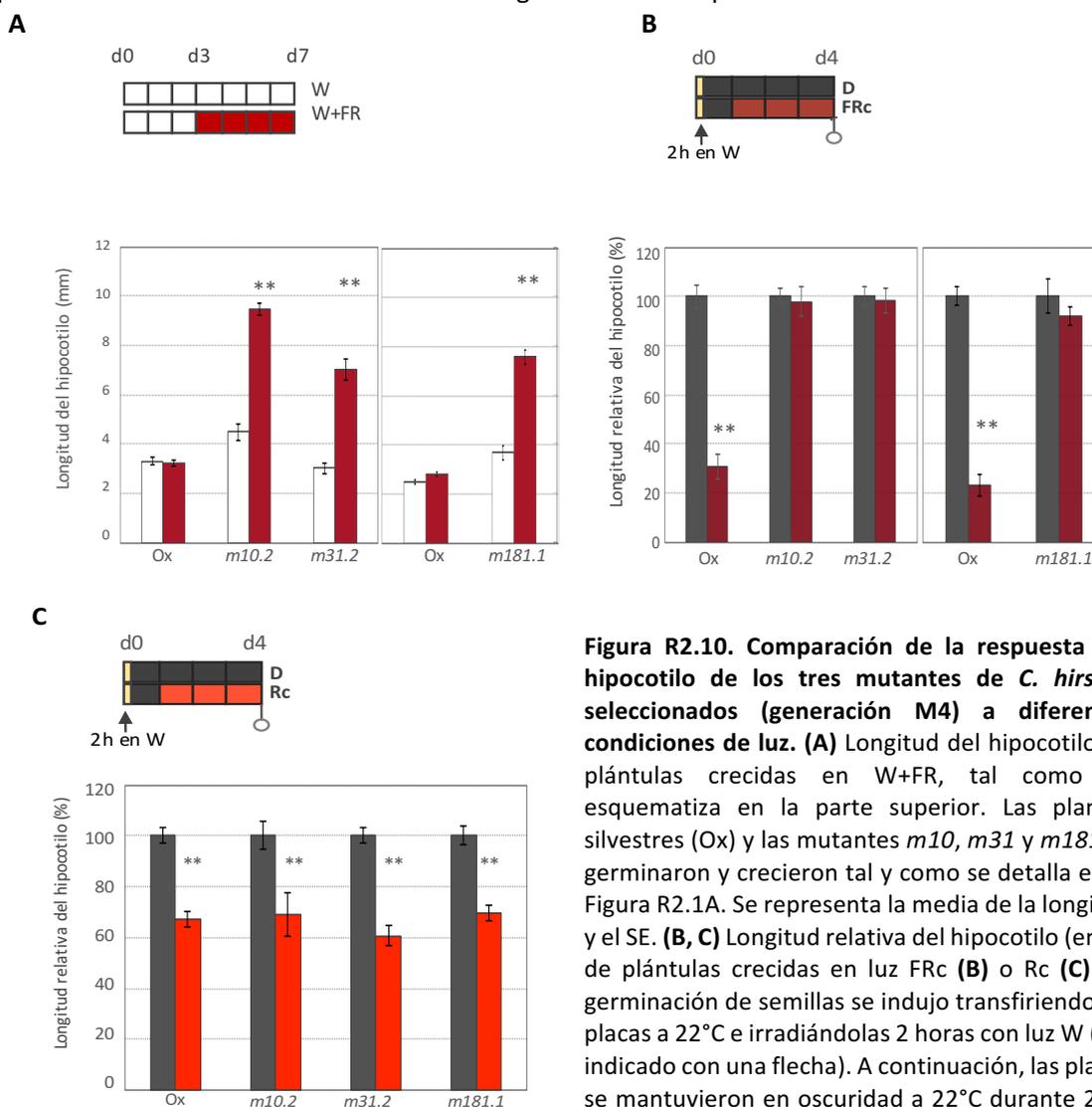


Figura R2.10. Comparación de la respuesta del hipocotilo de los tres mutantes de *C. hirsuta* seleccionados (generación M4) a diferentes condiciones de luz. (A) Longitud del hipocotilo de plántulas crecidas en W+FR, tal como se esquematiza en la parte superior. Las plantas silvestres (Ox) y las mutantes *m10*, *m31* y *m181* se germinaron y crecieron tal y como se detalla en la Figura R2.1A. Se representa la media de la longitud y el SE. (B, C) Longitud relativa del hipocotilo (en %) de plántulas crecidas en luz FRc (B) o Rc (C). La germinación de semillas se indujo transfiriendo las placas a 22°C e irradiándolas 2 horas con luz W (d0, indicado con una flecha). A continuación, las placas se mantuvieron en oscuridad a 22°C durante 24h; posteriormente se mantuvieron en D o se transfirieron a FRc (B), o Rc (C) hasta el día 4 (d4) a 22°C. Como se indica en la parte superior de cada gráfica. En B y C se representa la media y el SE. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente

Figura R2.10. Comparación de la respuesta del hipocotilo de los tres mutantes de *C. hirsuta* seleccionados (generación M4) a diferentes condiciones de luz. (A) Longitud del hipocotilo de plántulas crecidas en W+FR, tal como se esquematiza en la parte superior. Las plantas silvestres (Ox) y las mutantes *m10*, *m31* y *m181* se germinaron y crecieron tal y como se detalla en la Figura R2.1A. Se representa la media de la longitud y el SE. (B, C) Longitud relativa del hipocotilo (en %) de plántulas crecidas en luz FRc (B) o Rc (C). La germinación de semillas se indujo transfiriendo las placas a 22°C e irradiándolas 2 horas con luz W (d0, indicado con una flecha). A continuación, las placas se mantuvieron en oscuridad a 22°C durante 24h; posteriormente se mantuvieron en D o se transfirieron a FRc (B), o Rc (C) hasta el día 4 (d4) a 22°C. Como se indica en la parte superior de cada gráfica. En B y C se representa la media y el SE. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente

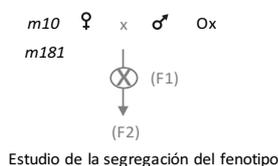
significativas (prueba t de Student; ** P<0,01) entre W y W+FR (A) , FRc y D (B) y Rc y D (C) para cada genotipo.

2.3.2.1. Análisis genéticos.

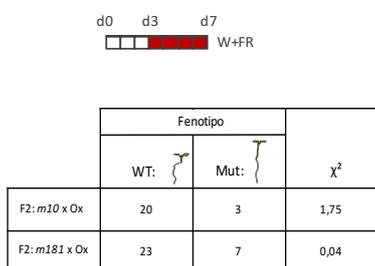
Los mutantes *m10.2* y *m181.1* (de ahora en adelante *m10* y *m181*, respectivamente) se cruzaron con Ox y en la F2 se determinó la proporción de plántulas con fenotipo mutante y silvestre (Figura R2.11A). En el momento de realizar estos cruces no disponíamos de semillas de *m31.2* por lo que se continuó el proceso sin este mutante.

Los análisis de segregación se realizaron en sombra simulada donde se observó que los datos se ajustaban a la proporción 1:3 y la prueba Chi-cuadrado (χ^2) realizada daba un valor menor a 3,84 (valor presente en las tablas de Chi-cuadrado, para probabilidad mayor o igual a 0,05 y un grado de libertad) (Figura R2.11B) indicando que el fenotipo *sis* estaba causado por una mutación monogénica y recesiva. A la vez se realizaron análisis de segregación en FRc, condición de crecimiento en que las plantas mutantes son etioladas y las silvestres desetioladas. En las plantas de la generación F2 de los cruces *m10* x Ox y *m181* x Ox, el fenotipo mutante (etiolado en FRc) y el silvestre también segregaban en una proporción 1:3 (Figura R2.11C), confirmando los resultados obtenidos en los análisis de segregación en sombra simulada. Una vez dispusimos de esta información, ambos mutantes se cruzaron una vez más (un total de dos veces) con la línea silvestre Ox y en la F2 se volvieron a seleccionar los individuos mutantes. Este proceso se llevó a cabo para eliminar otras mutaciones que pudieran existir y que no tuvieran relación con el fenotipo *sis* pero que pudieran alterar la viabilidad de la planta y/o interferir en el fenotipo analizado.

A



B



C

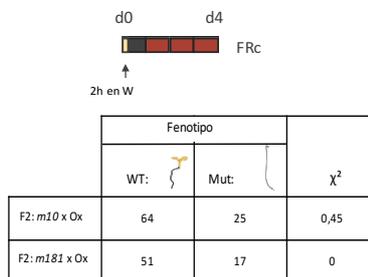


Figura R2.11. Cruce entre los mutantes (*m10* y *m181*) y la línea silvestre (Ox) para el análisis de segregación del fenotipo. (A) Esquema de los cruces realizados. Las semillas de las generación F2 germinaron y crecieron sombra simulada (B) o en luz FRc (C), tal como se indica en la parte superior y se detalla en la Figura R2.1A y Figura R2.10 respectivamente. En B y C, las tablas muestran el número de plántulas F2 con fenotipo silvestre (WT) y mutante (Mut) para cada cruce y el resultado del test Chi-cuadrado (χ^2) realizado.

La similitud de los fenotipos mostrados por los mutantes *m10* y *m181* (Figuras R2.10, R2.11) sugería que las mutaciones podrían afectar al mismo gen (es decir, que se trataba de mutaciones alélicas) o de componentes diferentes pero de la misma vía de señalización (mutaciones no alélicas). Por tanto, se cruzaron entre ellos para llevar a cabo un test de alelismo. Tras el cruce entre plantas *m10* y *m181*, se analizó el fenotipo mutante en la generación F2 (Figura R2.12B) (aunque la prueba de alelismo se puede realizar en la generación F1, tuvimos problemas de germinación con esta generación y analizamos sólo las plántulas de la F2). Se observó que el 100% de la población tenía fenotipo mutante tanto cuando crecían en sombra simulada (Figura R2.12B) como en FRc (Figura R2.12C). Estos datos indicaban que los dos mutantes eran alélicos, es decir, que correspondían a dos mutaciones independientes en el mismo gen, que se denominó *SIS1*. Así, se les renombró como mutantes *sis1-1* (*m181*) y *sis1-2* (*m10*).

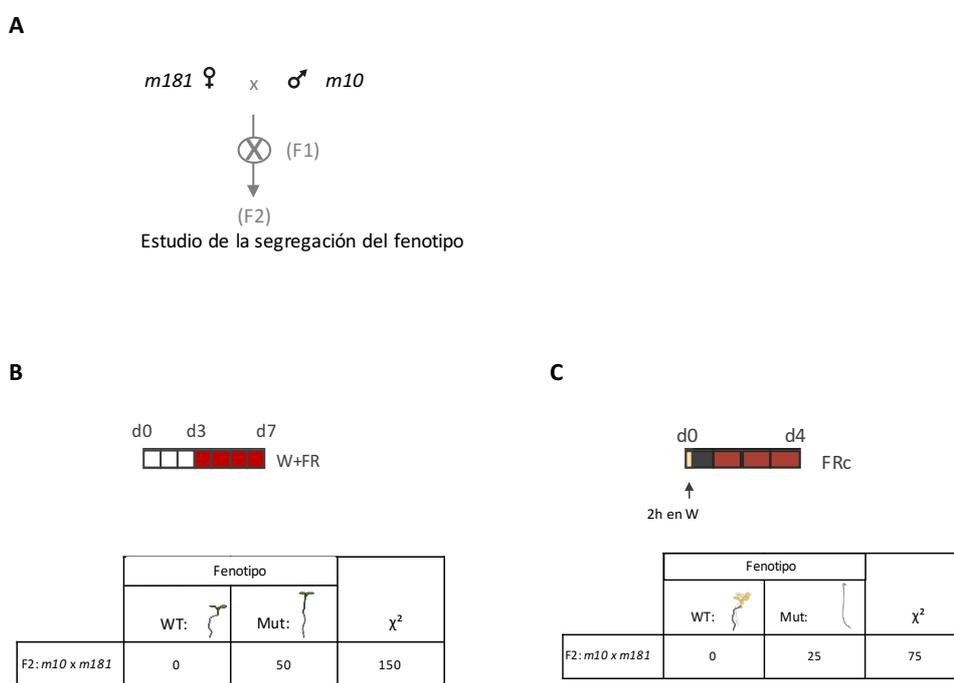


Figura R2.12. Test de alelismo de los mutantes *m10* y *m181*. (A) Esquema de los cruces realizados. (B) Las semillas de las generación F2 germinaron y crecieron en sombra simulada (B) o luz FRc (C), tal como se indica en la parte superior y como se detalla en la Figuras R2.1A y Figura R2.10 respectivamente. Las tablas muestran el número de plántulas F2 con fenotipo silvestre y mutante para cada cruce y el resultado del test chi cuadrado (χ^2) realizado.

2.3.2.2. Identificación de las mutaciones en *sis1*.

Como ya se ha mencionado, en base a los fenotipos que se han descrito previamente en *A. thaliana*, el comportamiento de los mutantes *sis1* se asemejaba al de los mutantes deficientes en *phyA* o en componentes de su vía de señalización, lo cual sugería que podrían ser mutantes para alguno de estos componentes en *C. hirsuta* (Casal 1996; Johnson et al. 1994b; Hiltbrunner et al. 2005; Martínez-García et al. 2014a). Para analizar esta posibilidad, se clonó, secuenció y comparó la secuencia del gen de *ChPHYA* de los mutantes *sis1-1* (*m181*), *sis1-2* (*m10*) y *m31* con la secuencia silvestre. Estos estudios se realizaron en colaboración con dos miembros del laboratorio, M. Bevilaqua y E. Botterweg. En el caso del mutante *m31*, se postuló que podría afectar al mismo gen, ya que tenía el fenotipo de respuesta del hipocotilo a sombra y a FRc muy similar al de *sis1-1* y *sis1-2*; por este motivo se incorporó en estos análisis. El material de partida para los clonajes fue DNA genómico de plántulas, del que amplificamos dos fragmentos manejables con oligonucleótidos específicos. El gen *ChPHYA* tiene un tamaño de 3355 pares de bases (*base pair*; bp) y amplificamos dos fragmentos de 2400 bp y 1700 bp que compartían una secuencia de solapamiento de unos 400 bp. Estos productos de PCR se purificaron y subclonaron en un vector pCRII-TOPO para la posterior secuenciación de los insertos.

Los resultados de la secuenciación mostraron que en cada uno de los mutantes *sis1* había una mutación puntual en la secuencia genómica del *ChPHYA* (**Figura 2.13A**). Además, el mutante *m31* también mostraba una mutación en el gen *ChPHYA*, lo que confirmaba que se trataba de otro alelo mutante de *sis1*, por lo que de ahora en adelante se nombrará como *sis1-3*. En el caso de *sis1-1* y *sis1-3*, las mutaciones puntuales introducían un codón stop temprano en la secuencia de la proteína PHYA correspondiente, mientras que el mutante *sis1-2* resultaba en un cambio de aminoácido con característica apolar (Gly, G) a uno con carga negativa (Glu, E). Además, alineamientos realizados en el laboratorio del gen de *PHYA* de diferentes especies vegetales (alineamiento no mostrado) se observó que esta G era un residuo conservado tanto en miembros de la familia de las brassicáceas como de otras familias más lejanas filogenéticamente. La inmunodetección de la proteína PHYA en plántulas etioladas mostró que en los extractos del mutante *sis1-2* y de la línea Ox se detectaba una banda que correspondería a una proteína de tamaño similar mientras que en los de los mutantes *sis1-1* y *sis1-3* no se detectaba ninguna banda (**Figura 2.13B**).

Estos resultados los interpretamos como: mientras que los alelos mutantes *sis1-1* y *sis1-3* no producían proteína PHYA, el alelo mutante *sis1-2* producía una proteína PHYA que no era funcional. Así pues, los análisis a nivel proteico *ChPHYA* en los distintos mutantes *sis1* eran consistentes con las lesiones moleculares en la secuencia genómica que identificamos por secuenciación, evidenciando que *SIS1* codificaba el gen *ChPHYA* e indicando que los mutantes *sis1* identificados eran mutantes de pérdida de función (*knock-out*) para este fitocromo.

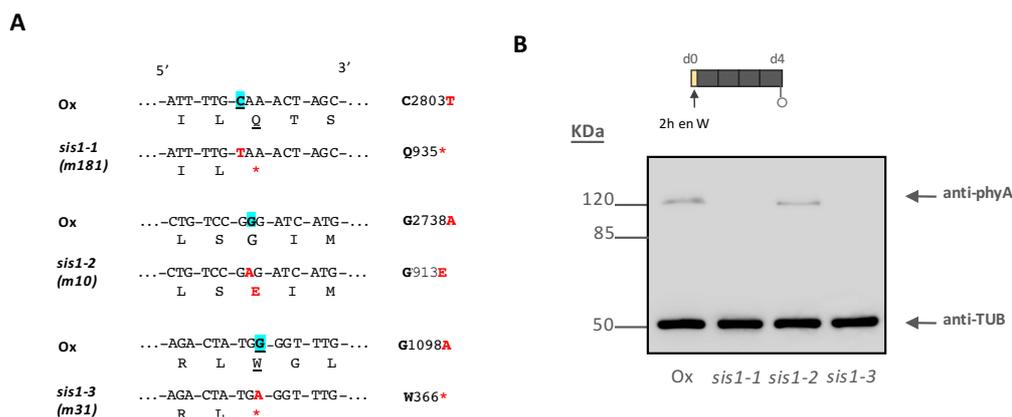


Figura R2.13. Cambios en la secuencia del gen *ChPHYA* en los mutantes *sis1*. (A) Detalles de la secuencia de DNA de *ChPHYA* donde se muestra la ubicación de los cambios de los mutantes (*sis1-1*, *sis1-2* y *sis1-3*) respecto a la secuencia del WT (Ox). La secuencia de aminoácidos predicha se muestra debajo de cada triplete de DNA. (B) Análisis inmunoblot de la proteína PHYA en las plantas WT (Ox), *sis1-1*, *sis1-2* y *sis1-3* realizado tal y como se detalla en la Figura R2.6A. Las plantas para análisis de inmunoblot crecieron como se detalla sobre la figura y como se detalla en la Figura R2.6A, y el material biológico se recogió en día 4 (d4).

A continuación, nos centramos en la caracterización de los mutantes *sis1* y su comparación con mutantes de pérdida de función del *phyA* en *A. thaliana*.

2.4. Estudio fisiológico de los mutantes *sis1*.

Como el mutante *sis1-3* se caracterizó más tarde, no llegamos a cruzarlo con la línea Ox. Por esta razón sólo caracterizamos en profundidad los mutantes *sis1-1* y *sis1-2* y comparamos sus respuestas con las del mutante de *A. thaliana phyA-501*, alelo disponible y caracterizado en el laboratorio (Martínez-García et al. 2014).

2.4.1. Comparación de las respuestas a la luz entre especies.

Tal como se ha comentado al inicio del capítulo, los tratamientos de W+FR empleados para las plántulas de *C. hirsuta* simulaban la sombra producida por un dosel vegetal (que resulta en R:FR muy bajas, <0,05). Nos planteamos realizar un análisis de la respuesta del hipocotilo en mutantes de *A. thaliana (phyA-501)* y *C. hirsuta (sis1-1, sis1-2)* en diferentes razones de R:FR, que simulan condiciones naturales con las que las plantas lidian en sus hábitats: desde sombra producida por un dosel vegetal (R:FR muy bajas, de ~0,03) a sombra por proximidad de vegetación (R:FR bajas o intermedias, 0,05-0,09). La condición sin sombra vegetal, W, se describe como R:FR alta (>1,5). Las plántulas silvestres de *A. thaliana (Col-0)* tratadas con cualquier tipo de sombra simulada (R:FR 0,03 a 0,09) mostraban hipocotilos más largos que las mantenidas en W (R:FR >1,5). Los hipocotilos de las plántulas *phyA-501* crecidas en condiciones de sombra producida por dosel (R:FR 0,03) eran significativamente más largos que los de Col-0. Esta diferencia de elongación del hipocotilo entre *phyA-501* y Col-0 se atenuaba (R:FR 0,05) y desaparecía (R:FR 0,09) en condiciones de proximidad vegetal, como habíamos descrito en (Martínez-García et al. 2014) (Figura R2.14B).

Las plántulas silvestres de *C. hirsuta* (Ox) no presentaban cambios sustanciales en el alargamiento del hipocotilo en ninguna de las condiciones de sombra aplicadas respecto a las crecidas sin sombra vegetal (R:FR >1.5). En cambio, las plántulas mutantes *sis1-1* y *sis1-2* presentaban hipocotilos más largos que las plántulas silvestres en todas las condiciones de sombra estudiadas (Figura R2.14C).

En resumen, tanto las plántulas de *phyA-501* de *A. thaliana* como las de *sis1-1* y *sis1-2* de *C. hirsuta* presentaban hipocotilos más largos que las plántulas silvestres cuando crecían en condiciones de sombra con razón R:FR muy bajo o bajo. Sin embargo, los mutantes *sis1-1* y *sis1-2* presentaban hipocotilos más largos que las plántulas silvestres en todas las condiciones de sombra estudiadas.

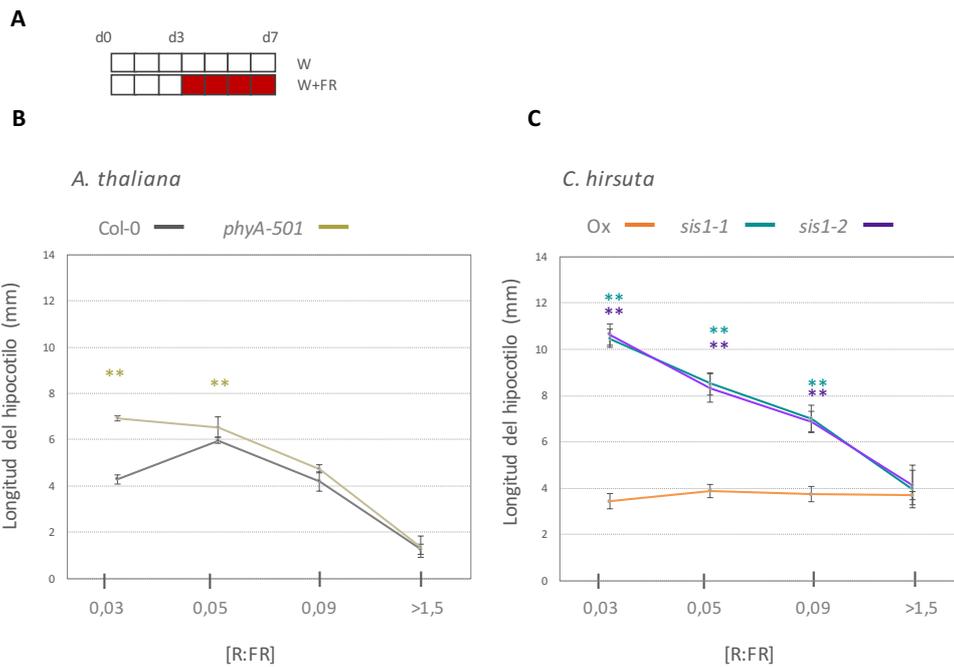


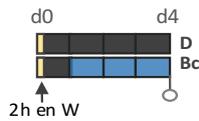
Figura R2.14. Longitud del hipocotilo de plántulas mutantes en PHYA de *A. thaliana* y *C. hirsuta* en respuesta a diferentes razones de R:FR. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas crecieron tal y como se detalla en la Figura R2.1A. **(B)** Longitud de los hipocotilos de plántulas silvestres y mutantes en PHYA de *A. thaliana* (*phyA-501*) y **(C)** *C. hirsuta* (*sis1-1* y *sis1-2*) cultivadas como se indica en A. La razón R:FR variaba de muy baja (0,03), baja (0,05), intermedia (0,09) a alta (> 1,5). Se representa la media de la longitud de los hipocotilos para cada razón R:FR aplicada y el SE. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre plántulas mutantes respecto a las WT para cada especie crecidas en la misma razón R:FR (Prueba t de Student; ** P<0,01).

Además analizamos las respuestas de estas líneas mutantes en la desetiología en luz monocromática de diferentes colores. En este tipo de experimentos, tras la estratificación durante 4 días a 4°C se indujo la germinación de las semillas transfiriendo las placas a 22°C e irradiándolas 2 horas con luz W (d0). A las 24 h del inicio de la inducción de la germinación, las placas se mantuvieron en oscuridad (Dark, D) o se irradiaron con distintas intensidades de luz monocromática azul continua (Blue continuous; Bc, percibida mayormente por los criptocromos) (Figura R2.15A), Rc (percibida principalmente por phyB) (Figura R2.16A) o FRc (percibida por phyA) (Figura R2.17A).

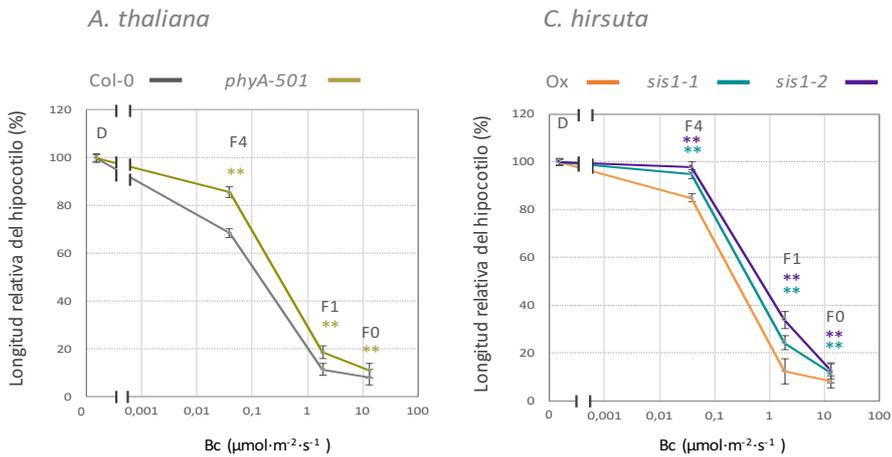
La respuesta de las plántulas mutantes se estimó midiendo la longitud del hipocotilo en las diferentes intensidades de luz aplicada (representadas como F4, F2/F1 y F0), experimentos que dieron lugar a curvas dosis-respuesta para los tres colores de luz y para las dos especies. En estos experimentos se observa que la longitud del hipocotilo de las plántulas silvestres disminuye a medida que aumenta la intensidad de luz aplicada, tal como estaba descrito para *A. thaliana*. Los hipocotilos de las plántulas *phyA-501* de *A. thaliana* y las *sis1-1* y *sis1-2* de *C. hirsuta* eran ligeramente más largos que los de las plántulas silvestres en todas las intensidades de luz Bc empleadas (**Figuras R2.15B, C**).

Estos resultados indicaban que la ausencia de *phyA* provoca una cierta hiposensibilidad a Bc en ambas especies, indicando que *phyA* se comporta igual en *A. thaliana* y *C. hirsuta* en la respuesta de desetiología en Bc.

A



B



C

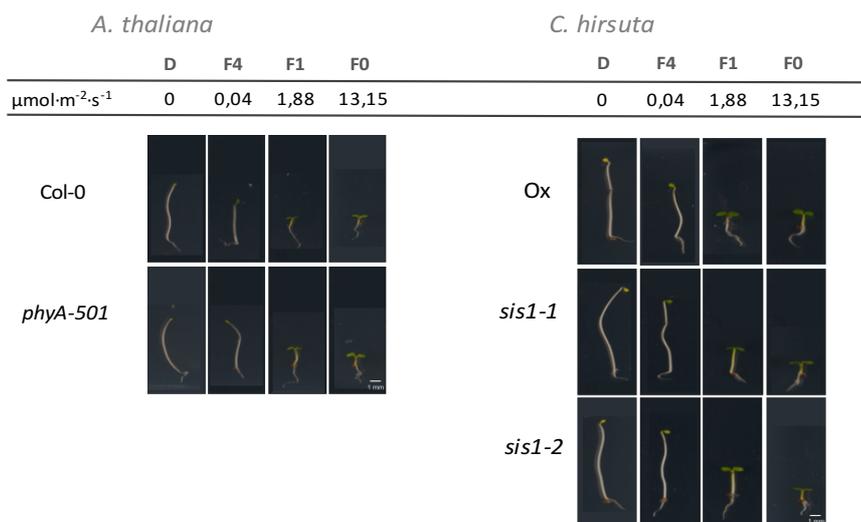


Figura R2.15. Longitud del hipocotilo de plántulas mutantes en *PHYA* de *A. thaliana* y *C. hirsuta* crecidas en luz monocromática azul (Bc). (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas crecieron tal

y como se detalla en la Figura R2.10 pero en luz monocromática Bc. **(B)** Longitud relativa de los hipocotilos crecidos en distintas intensidades de luz Bc obtenidas mediante la utilización de filtros (F0, F1 y F4) y relativizada a las crecidas en D de cada genotipo, siendo éstas el 100%. Se representa la media y el SE. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre plántulas mutantes respecto a las WT para cada intensidad de luz (Prueba t de Student; ** $P < 0,01$). **(C)** Aspecto de plántulas representativas de *A. thaliana* y *C. hirsuta* medidas en **B**. Debajo de cada filtro empleado se detalla la intensidad de luz Bc resultante.

En los experimentos con Rc se incorporaron como control adicional plántulas del alelo mutante *phyB-9* de *A. thaliana*, deficiente en phyB, que son prácticamente ciegas a luz Rc. Se observó que los hipocotilos del mutante *phyB-9* eran más largos que los de Col-0 y *phyA-501* en todas las intensidades de Rc aplicadas, de acuerdo con la información publicada (Reed et al. 1993). Además, los hipocotilos mutantes *phyA-501* eran ligeramente más largos que las plántulas silvestres en la mayoría de las intensidad testadas (**Figura R2.16B, C**); los mutantes *sis1* mostraban hipocotilos más largos que las plántulas silvestres pero sólo en las intensidades más altas de Rc empleadas (F1 y F0) (**Figura R2.16, panel de la derecha**).

Estos resultados indicaban que en ambas especies la ausencia de phyA provocaba una cierta hiposensibilidad a Rc (**Figura R2.16-panel de la izquierda**).

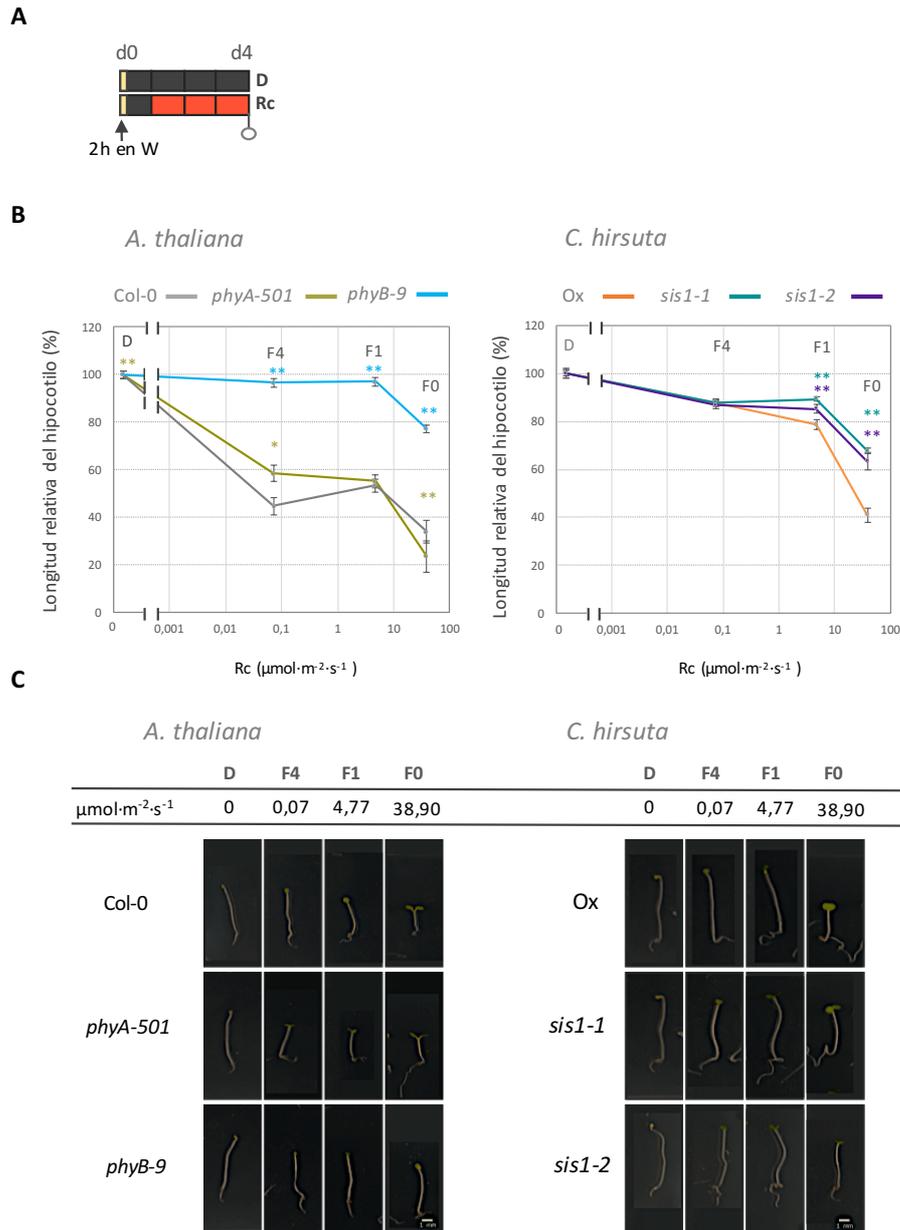


Figura R2.16. Longitud del hipocotilo de plántulas mutantes en *PHYA* de *A. thaliana* y *C. hirsuta* crecidas en luz monocromática Rc. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas crecieron tal y como se detalla en la Figura R2.10C. **(B)** Longitud relativa de los hipocotilos crecidos en distintas intensidades de Rc obtenidas mediante la utilización de filtros (F0, F1 y F4) y relativizada a las crecidas en D de cada genotipo, siendo éstas el 100%. Se representa la media y el SE. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre plántulas mutantes respecto a las WT para cada condición de luz (Prueba t de Student; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). **(C)** Aspecto de plántulas representativas de *A. thaliana* y *C. hirsuta* medidas en B. Debajo de cada filtro empleado se detalla la intensidad de luz Rc resultante.

En los experimentos con FRc, los hipocotilos de *phyA-501* eran mucho más largos que los de Col-0 en todas las intensidades de luz aplicadas, y mostraban un aspecto etiolado similar al de las plántulas crecidas en D (Figura R2.17B, C), de acuerdo con la información publicada (Cantón & Quail 1999). Los mutantes *sis1* de *C. hirsuta* también presentaban los hipocotilos largos y un fenotipo etiolado en todas las intensidades de FRc aplicadas (Figura R2.17B, C).

Estos resultados indicaban que los mutantes deficientes en *phyA* de ambas especies no son capaces de percibir FRc.

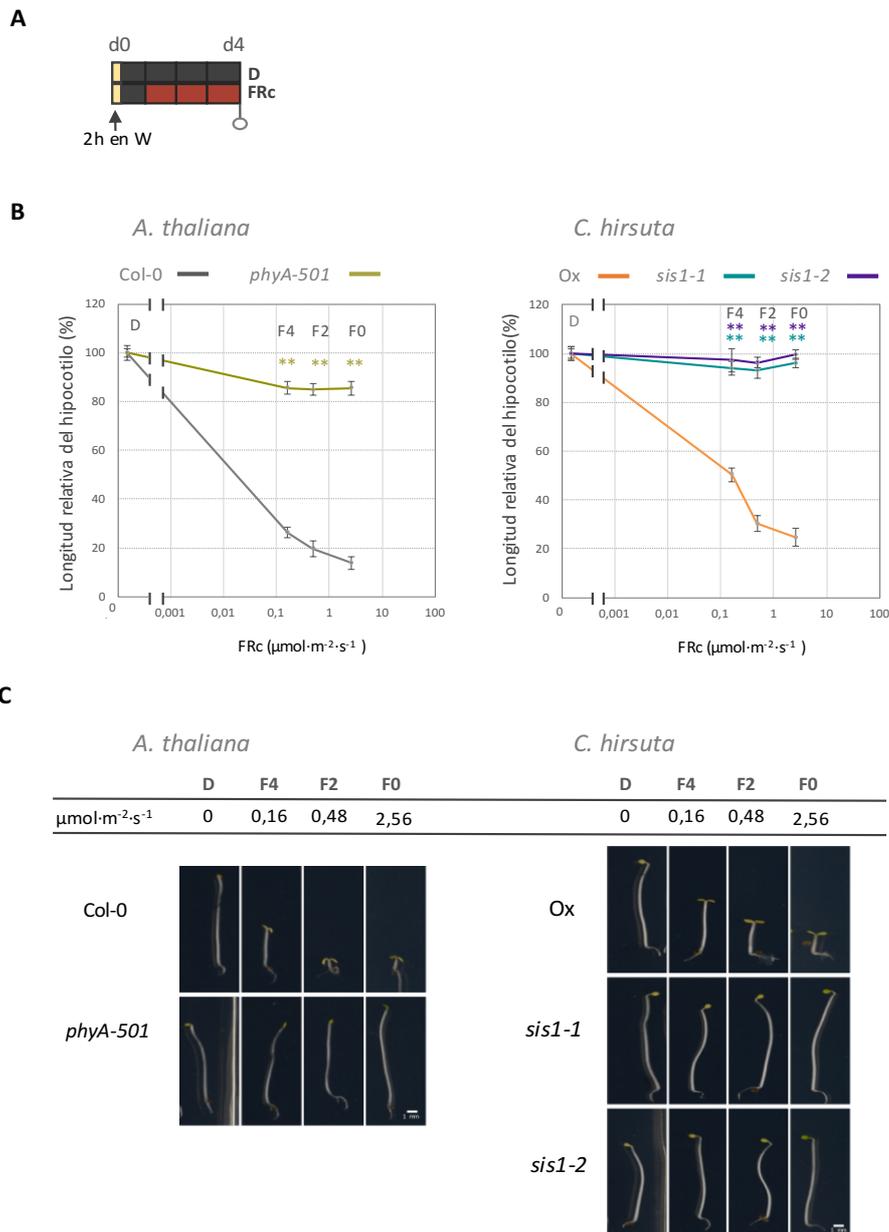


Figura R2.17. Longitud del hipocotilo de plántulas mutantes en *PHYA* de *A. thaliana* y *C. hirsuta* crecidas en luz monocromática FRc. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas crecieron tal y como se detalla en la Figura R2.10B. **(B)** Longitud relativa de los hipocotilos crecidos en distintas intensidades de FRc obtenidas mediante la utilización de filtros (F0, F2 y F4) respecto a las crecidas en D de cada genotipo, siendo éstas el 100%. Se representa la media y el SE. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre plántulas mutantes respecto a las WT para cada intensidad de luz (Prueba t de Student; ** $P < 0,01$). **(C)** Aspecto de plántulas representativas de *A. thaliana* y *C. hirsuta* medidas en B. Debajo de cada filtro empleado se detalla la intensidad de luz FRc resultante. En resumen, los experimentos de desetiología mostraron que los mutantes deficientes en *phyA* de *A. thaliana* y *C. hirsuta* son ligeramente hiposensibles a Bc y Rc y ciegos a FRc, indicando que el papel de *phyA* en la percepción de las diferentes luces monocromáticas es similar en ambas especies.

Tras estos experimentos nos planteamos si la ausencia de *phyA* podría alterar la acumulación de pigmentos fotosintéticos en respuesta a la sombra simulada. Los niveles de CRT y CHL se redujeron significativamente en respuesta a sombra simulada tanto en plántulas silvestres de *A. thaliana* (reducción del ~15-20%) como en *C. hirsuta* (reducción del ~10%), tal como se describió previamente (**Figuras R2.2, R2.18**). Tanto las plantas de *phyA-501* como las de *sis1-1* y *sis1-2* presentaban una mayor reducción de los niveles de CRT respecto a Col-0 y Ox, respectivamente, en respuesta a sombra (reducción del ~ 30% en *phyA-501* y del ~ 25-30% en *sis1*) (**Figura R2.18B**). Por lo que respecta a los niveles de CHL, los patrones de acumulación era muy similares a los observados para los CRT. Tanto las plantas *phyA-501* como las *sis1-1* y *sis1-2* presentaban una mayor reducción de los niveles de CRT respecto a las plántulas silvestres en respuesta a sombra simulada (reducción del ~ 30% tanto en *phyA-501* como en *sis1*) (**Figura R2.18C**). En general, los mutantes *sis1-1* y *sis1-2* de *C. hirsuta* presentaban una disminución muy similar para ambos pigmentos fotosintéticos (CRT y CHL), que siempre era sustancialmente mayor en las plántulas Ox (**Figura R2.18B, C**).

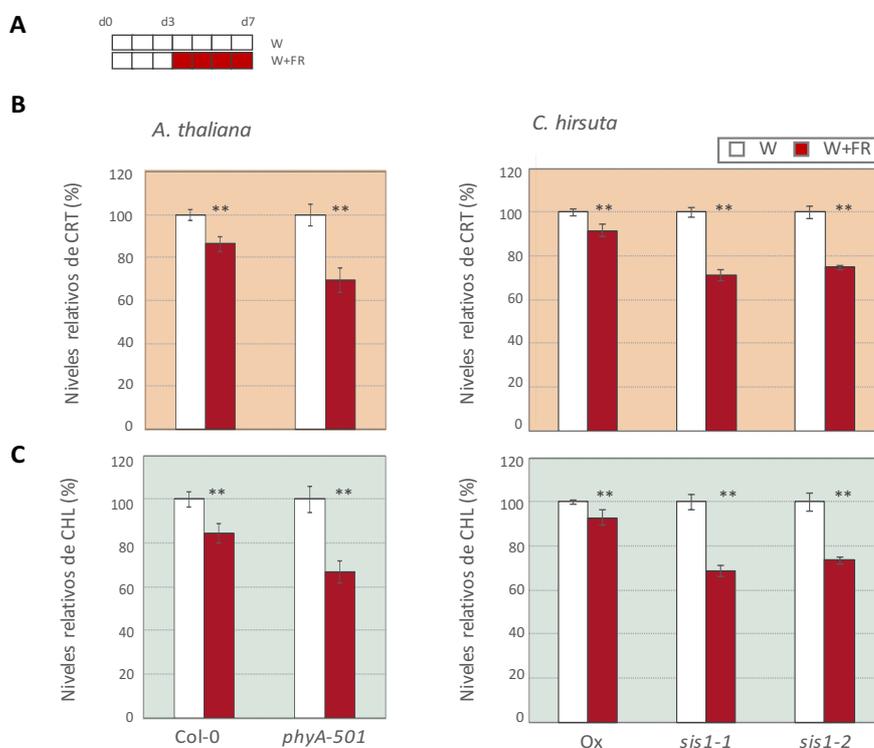


Figura R2.18 Acumulación de pigmentos en plántulas mutantes para *PHYA* de *A. thaliana* y *C. hirsuta* en respuesta a sombra simulada. **(A)** Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas crecieron tal y como se detalla en la Figura R2.1A. **(B,C)** Niveles relativos y el SD (en %) de carotenoides (CRT) **(B)** y clorofilas (CHL) **(C)** en plántulas de *A. thaliana* (Col-0 y *phyA-501*) y *C. hirsuta* (Ox y *sis1-1*, *sis1-2*) crecidas como se indica en **A**. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre plántulas crecidas en W+FR respecto a W (Prueba t de Student; ** P<0,01).

Al inicio del capítulo se mencionó que la expresión de genes marcadores de sombra, como *PIL1* o *ATHB2*, estaba rápidamente inducida tanto en plántulas de *A. thaliana* como de *C. hirsuta*. En

este punto nos planteamos si *phyA* tenía un papel en la inducción de estos genes en respuesta a sombra simulada (0 a 8h) en *C. hirsuta*. Observamos que en Ox la expresión de *PIL1* y *ATHB2* se inducía significativamente a partir de 1h del inicio del tratamiento con sombra simulada. En los mutantes *sis1-1* y *sis1-2* la inducción de ambos genes era significativamente más fuerte que en el silvestre a las 4-8h del tratamiento con sombra simulada (**Figura R.19**).

Estos resultados indican que *phyA* de *C. hirsuta* inhibe la inducción tardía por sombra simulada de los genes *PIL1* y *ATHB2*, al igual que está descrito para *phyA* en *A. thaliana* (Ciolfi et al. 2013)

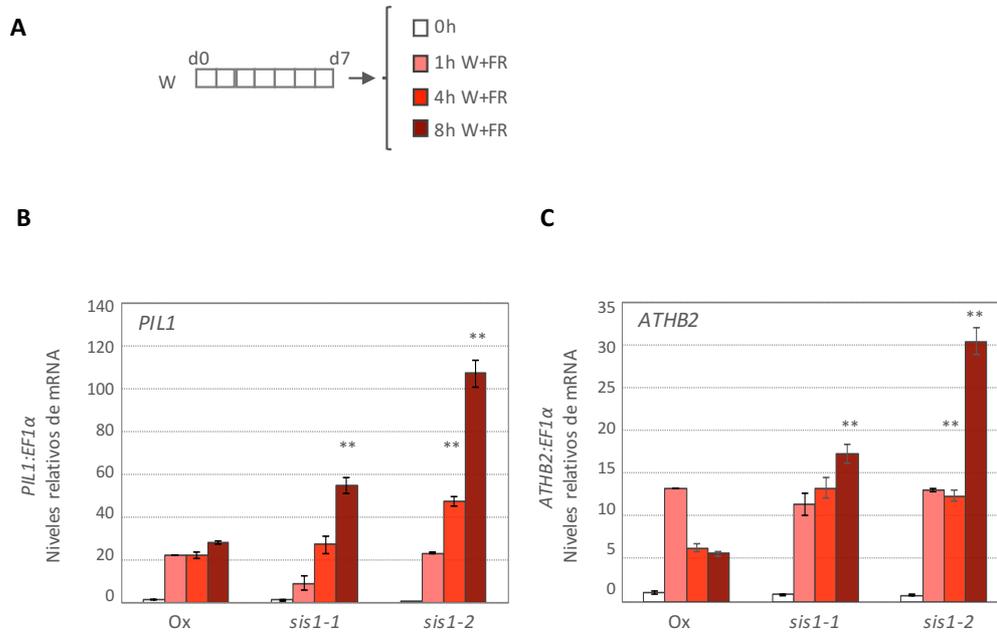
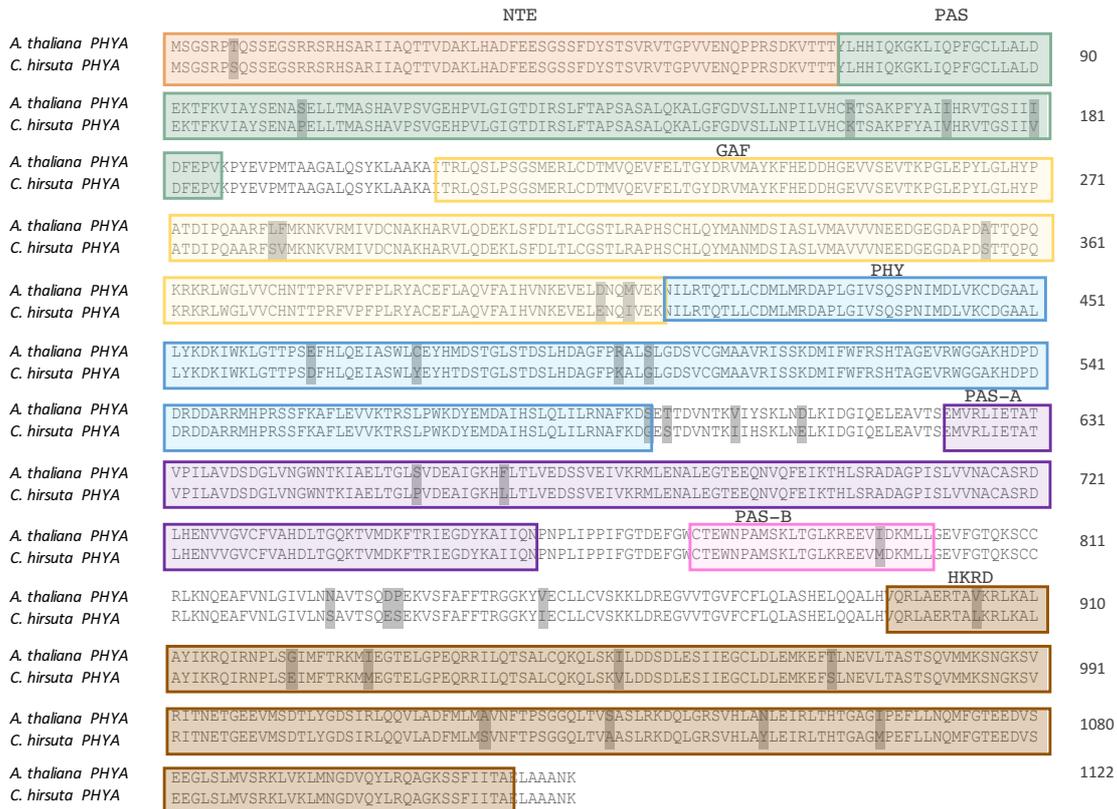


Figura R2.19. Efecto de la pérdida de función de *PHYA* en la expresión de los genes *PIL1* y *ATHB2* en plántulas de *C. hirsuta* en respuesta a sombra simulada. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas crecieron tal como se indica en la Figura R2.4A. Se recolectaron muestras antes (0h) y después de una (1h), cuatro (4h) y ocho horas (8h) de W+FR. (B-C) Niveles de mRNA de *PIL1* (B) y *ATHB2* (C) de plántulas Ox, *sis1-1* y *sis1-2* cultivadas como se describe en A. Se representa la media de tres réplicas biológicas normalizada a los niveles de transcrito del gen *EF1α* y el SE. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas para cada condición de luz respecto a Ox (Prueba t de Student; ** P<0,01).

En conjunto, hemos observado que en las dos especies estudiadas la ausencia de *phyA* conduce a fenotipos similares como una menor acumulación de pigmentos fotosintéticos (carotenoides y clorofilas) y un incremento en la inducción tardía de la expresión de *ATHB2* o *PIL1* en respuesta a la sombra simulada. Encontramos diferencias en el alargamiento de los hipocotilos en respuesta a sombra simulada, ya que mientras los hipocotilos de las plantas *phyA-501* de *A. thaliana* se diferenciaban de los silvestres principalmente cuando crecían en condiciones de R:FR muy bajo o bajo, las plantas *sis1-1* y *sis1-2* presentaban hipocotilos más largos que las plántulas silvestres en todas las condiciones de sombra estudiadas. Estas diferencias de respuestas de los mutantes *phyA-501* y *sis1-1* y *sis1-2* nos indujeron a pensar que podrían existir diferencias específicas entre estas dos especies en componentes aguas abajo en la señalización de *phyA* que estarían implicados en la supresión del alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra.

2.5. Complementación de plantas deficientes en *phyA* de *A. thaliana* con las construcciones *pPHYA:PHYA* y *pPHYA:SIS1*.

Tras comparar la secuencia aminoacídica del PHYA de *A. thaliana* con el de *C. hirsuta*, no se observaron diferencias obvias entre la estructura primaria de ambos phyA (**Figura R2.20**) lo que sugería la posibilidad de que ambos fitocromos fueran completamente intercambiables, y que las diferencias observadas en el papel de phyA entre *A. thaliana* y *C. hirsuta* se debieran a componentes de la señalización de las respuestas a la proximidad vegetal aguas abajo del PHYA.



96,8% de similitud entre PHYA de *A. thaliana* y *C. hirsuta*

Figura R2.20. Alineamiento de las secuencias de la proteína PHYA de *A. thaliana* y *C. hirsuta*. En gris se marcan los aminoácidos que difieren entre las dos especies. Se resaltan las diferentes regiones y dominios delimitados de phyA en *A. thaliana* (Li et al. 2011) (dominios descritos en la introducción): Extensión del N-terminal (NTE, 1-69; naranja), el dominio PER-ARNT-SIM (PAS, 70-185; verde), una FOSFODIESTERASA CGMP-ESPECÍFICA ADENIL CICLASA Y FHLa (GAF, 218-412; amarillo) dominio PHYTOCHROME (PHY, 413-591; azul), dominio PER-ARNT-SIMa (PAS-A, 621-735; lila), dominio PER-ARNT-SIMb (PAS-B, 750-873; rosa) y el dominio de HISTIDINAS-KINASAS (HKRD, 750-873; marrón).

Para estudiar esta posibilidad planteamos experimentos de complementación, en los que generamos plásmidos binarios para transformar las plantas mutantes *phyA-501* de *A. thaliana* con el gen *PHYA* de *A. thaliana* (**Figura R2.21A**) o con el de *C. hirsuta*, que para diferenciarlo fácilmente del de *A. thaliana* nombraremos como *SIS1* (**Figura R2.21B**), bajo el control del promotor endógeno de *A. thaliana* (*pPHYA*), plásmidos que denominamos *pPHYA:PHYA* (*pMJ86*) y *pPHYA:SIS1* (*pMJ84*), respectivamente.

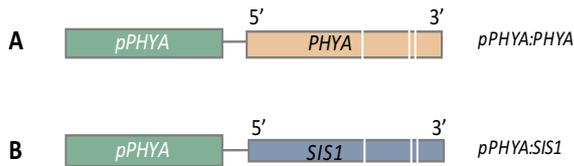


Figura R2.21. Construcciones usadas en los ensayos de complementación de plantas mutantes *phyA-501* de *A. thaliana*. Esquema de las construcciones para expresar el gen *PHYA* de *A. thaliana* (*PHYA*) (A) y *C. hirsuta* (*SIS1*) (B) bajo el control del promotor endógeno de *PHYA* de Arabidopsis: *pPHYA:PHYA* y *pPHYA:SIS1*, respectivamente.

Tras la transformación de plantas *phyA-501* de *A. thaliana* con el plásmido *pPHYA:PHYA* se obtuvieron un total de 25 plantas transgénicas independientes (transformantes primarios, T1). En la generación T2 se determinó que un total de 8 líneas tenían 1 inserción de T-DNA, que en la generación T3 llevamos a homocigosis. Se analizó el fenotipo de desetiología en FRc en la generación T2 (en la que el transgen está segregando), condición que permite distinguir las plantas mutantes etioladas de las silvestres desetiologadas, que nos llevó a seleccionar 5 líneas homocigotas en la T3 que tenían diferentes grados de complementación del fenotipo silvestre, líneas que nombramos como *pPHYA:PHYA* (*phyA-501*). Posteriormente, en la T3 medimos la respuesta de alargamiento del hipocotilo durante la desetiología en FRc (**Figura R2.22**) de las 5 líneas homocigotas independientes *pPHYA:PHYA* (*phyA-501*) #02F1, #06F5, #093, #11F2 y #232, donde observamos que las líneas seleccionadas tenían diferente longitud del hipocotilo (relativa a D) lo que nos indicaba que existían diferentes niveles de complementación debido a probablemente a la variabilidad del sitio de inserción del T-DNA y a los diferentes niveles de expresión de las líneas.

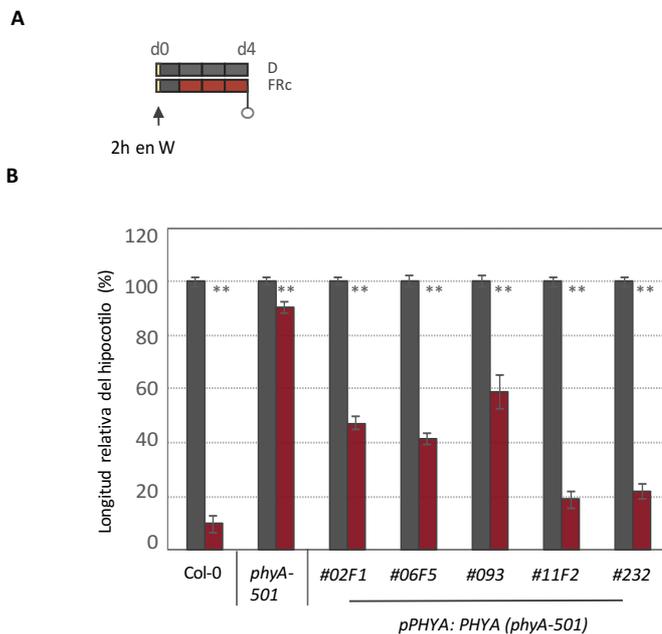


Figura R2.22. Longitud del hipocotilo de plántulas *pPHYA:PHYA* (*phyA-501*) crecidas en luz monocromática FRc. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas crecieron tal y como se detalla en la Figura R2.10B. (B) Longitud relativa de los hipocotilos de cada genotipo crecidos en FRc, tomando como 100% los crecidos en D. Se representa la media y el SE de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre la longitud del hipocotilo en FRc respecto a D para cada genotipo analizado (Prueba t de Student; ** P<0,01).

A continuación, analizamos la respuesta del hipocotilo a sombra simulada de las mismas líneas (Figura R2.23), que se representó como la diferencia de la longitud media de los hipocotilos crecidos en W+FR y en W. Este experimento mostró que las plántulas de las diferentes líneas *pPHYA:PHYA* (*phyA-501*) obtenidas se alargaban significativamente más que la línea silvestre pero menos que las plántulas *phyA-501* cuando crecían en W+FR.

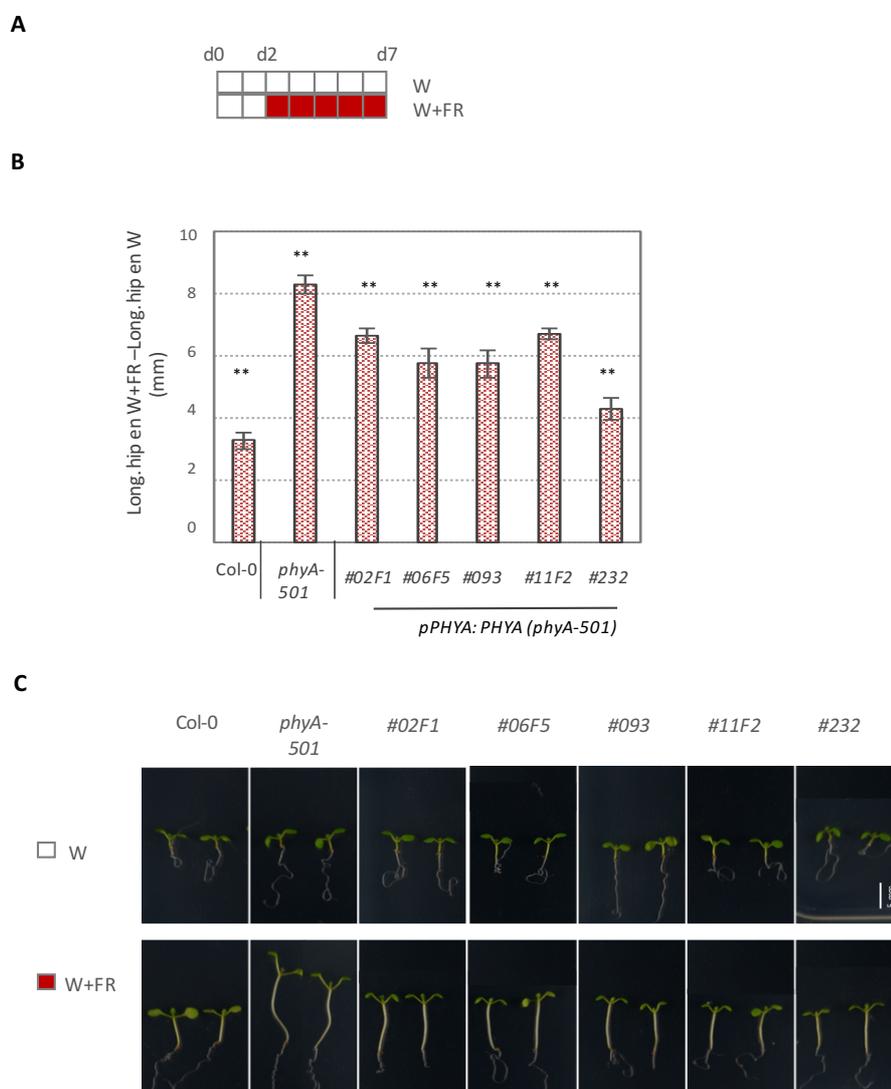


Figura R2.23. Respuesta del hipocotilo de plántulas *pPHYA:PHYA* (*phyA-501*) crecidas en sombra simulada. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas germinaron tal y como se detalla en la Figura R1.2. **(B)** La respuesta del hipocotilo se representa como la diferencia entre las medias de la longitud de los hipocotilos de las plántulas crecidas en W+FR y en W; las barras representan la media de valor y el SE de cuatro experimentos independientes. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre la longitud del hipocotilo de plántulas crecidas en W+FR respecto a W (Prueba t de Student; ** $P < 0,01$). **(C)** Aspecto de plántulas analizadas en B.

El mismo procedimiento se siguió tras transformar plantas de *A. thaliana* (*phyA-501*) con el plásmido *pPHYA:SIS1*. Se obtuvieron un total de 29 plantas transgénicas independientes (transformantes primarios, T1). En la generación T2 se determinó que un total de 12 líneas tenían 1 inserción de T-DNA, que en la generación T3 llevamos a homocigosis, líneas que nombramos como *pPHYA:SIS1* (*phyA-501*). Seleccionamos 7 líneas en la T3 (#041, #148, #151,

#163, #198, #204 y #247) porque las plántulas mostraban diferentes niveles de desetiología en FRc, tal como se muestra en la (Figura R2.24).

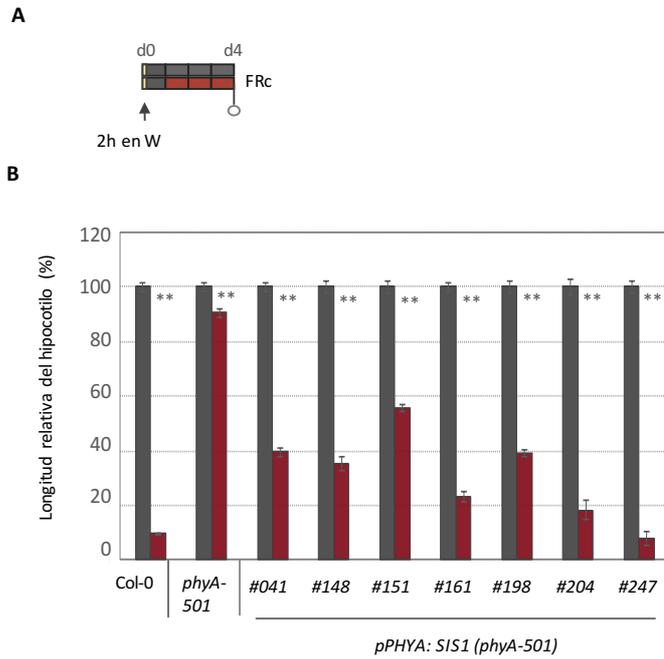


Figura R2.24. Longitud del hipocotilo de plántulas *pPHYA:SIS1 (phyA-501)* crecidas en luz monocromática FRc. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas crecieron tal y como se detalla en la Figura R2.10B. **(B)** Longitud relativa de los hipocotilos de cada genotipo crecidos en FRc, tomando como 100% los crecidos en D. Se representa la media y el SE de un experimento representativo. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre la longitud de los hipocotilos de las plántulas crecidas en FRc respecto a D para cada genotipo analizado (Prueba t de Student; ** P<0,01).

El análisis de la diferencia de la alargamiento de los hipocotilos crecidos en W+FR y en W (Figura R2.25) mostró que todas las líneas *pPHYA:SIS1 (phyA-501)* seleccionadas se alargaban menos que la *phyA-501*. En el caso de tres líneas (#163, #204 y #247), la diferencia era incluso menor que la de las plántulas Col-0 (línea silvestre).

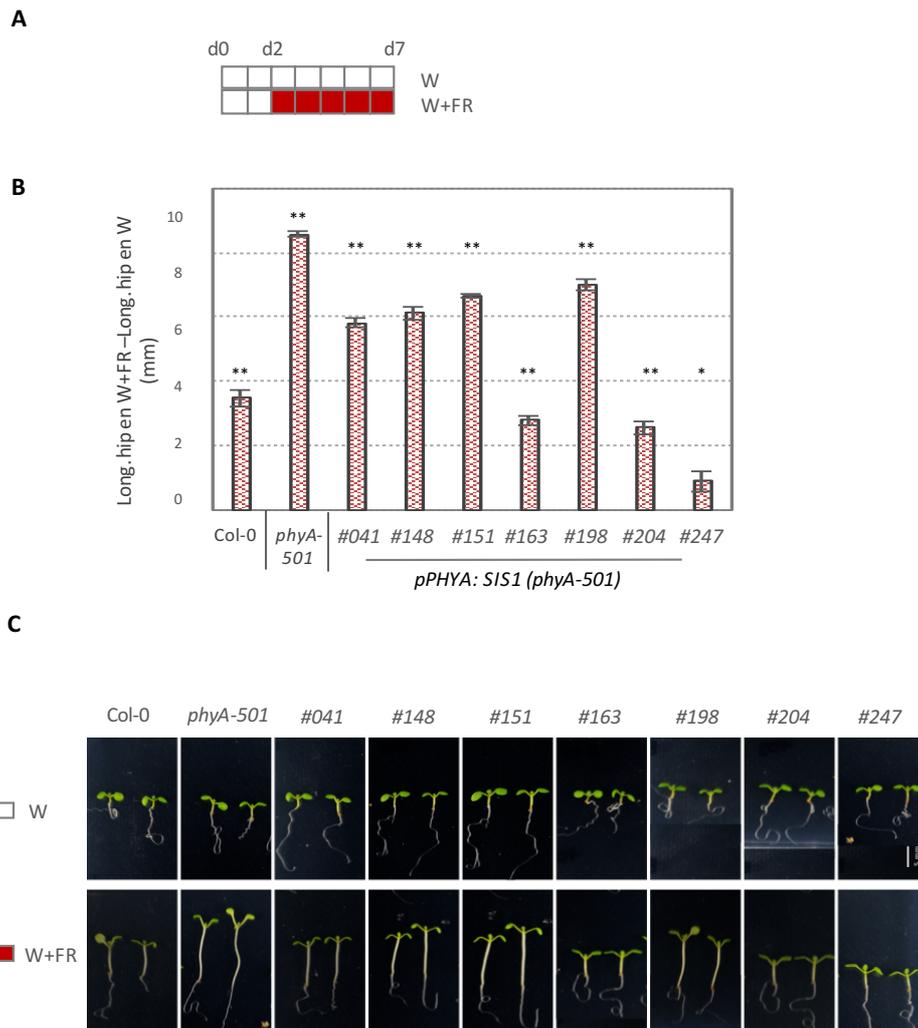


Figura R2.25. Respuesta del hipocotilo de plántulas *pPHYA:SIS1 (phyA-501)* crecidas en sombra simulada. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. Las plantas crecieron tal y como se detalla en la Figura R1.2 **(B)** La respuesta del hipocotilo se representa como la diferencia entre las medias de la longitud de los hipocotilos de las plántulas crecidas en W+FR y en W; las barras representan la media de este valor y el SE de cuatro experimentos independientes. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre la longitud del hipocotilo de plántulas crecidas en W+FR respecto a W (Prueba t de Student; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). **(C)** Aspecto de plántulas *pPHYA:SIS1* analizadas en **B**.

Estos resultados mostraban que las líneas transgénicas analizadas *pPHYA:PHYA (phyA-501)* y *pPHYA: SIS1 (phyA-501)* tienen diferentes grados de complementación de la actividad *phyA*, lo que indica que las construcciones empleadas eran capaces de producir *phyA* funcional. Las diferencias de complementación observadas entre las líneas individuales para cada construcción podían deberse a diferencias de expresión del transgen de *PHYA* y *SIS1*. Además, como estas líneas diferían únicamente en el fotorreceptor *phyA* que regula su propia expresión nos planteamos si existía correlación entre la actividad biológica del *PHYA/SIS1* transgénico y sus niveles de expresión. Como los niveles de *PHYA* están bajo el control de la luz, escogimos como material vegetal plántulas etioladas, en la que la expresión de *PHYA/SIS1* era alta, y plántulas crecidas en sombra simulada, en las que esperábamos niveles de expresión más bajos por la represión impuesta por la exposición a luz.

Como un primer paso, cuantificamos los niveles de *PHYA/SIS1* en oscuridad y en sombra simulada de las líneas *pPHYA:PHYA* (*phyA-501*) y *pPHYA:SIS1* (*phyA-501*). Como controles se incluyeron plántulas de Col-0 y *phyA-501* crecidas en las mismas condiciones. Así, se extrajo RNA total de plántulas crecidas en oscuridad durante 4 días (**Figura R2.26A**) y de plántulas crecidas durante 2 días en W y 5 días más en W+FR (**Figura R2.26B**). Los niveles de transcrito de *PHYA/SIS1* se estimaron por RT-qPCR utilizando oligonucleótidos específicos en una secuencia compartida para ambos genes de ambas especies, lo que permitía comparar directamente los niveles de expresión entre ambos genes (ver **Figura R2.5**) y normalizados con los del gen *UBQ10* de *A. thaliana*.

Primero quisimos averiguar si existía correlación entre los niveles de *PHYA/SIS1* en oscuridad y en sombra simulada. A continuación se representaron los niveles de *PHYA/SIS1* para cada línea en W+FR y en oscuridad. Para precisar la relación que existía entre los niveles de expresión de *PHYA/SIS1* en W+FR y en oscuridad en cada línea, realizamos una regresión lineal de estos datos (**Figura R2.26C**). Los datos de los niveles de RNA en Col-0 (que se tomaron como valor de referencia 1) se incorporan en la gráfica, pero no se emplearon para calcular la recta de regresión; por el contrario, los datos de los niveles de RNA en *phyA-501* sí que se emplearon para calcular las rectas, de las que se estimó el coeficiente de determinación (R^2 con valores entre 0-1), que proporciona el grado de correlación de las variables (cuanto más cerca de 1, mayor será la correlación). En las líneas de *pPHYA:PHYA* (*phyA-501*) se obtuvo un $R^2 \cong 0,82$ y en las líneas de *pPHYA:SIS1* (*phyA-501*) un $R^2 \cong 0,79$, indicándonos que existía correlación positiva entre los niveles de *PHYA* y *SIS1* en sombra simulada y en oscuridad en las líneas transgénicas obtenidas; por tanto, los niveles relativos de expresión de *PHYA* o *SIS1* entre líneas se mantenían en las condiciones de crecimiento y luz comparadas. También se determinó la pendiente de las rectas (coeficiente de x) para las líneas *pPHYA:PHYA* (*phyA-501*) y *pPHYA:SIS1* (*phyA-501*) que variaba de 8,34 a 2,80, respectivamente. Estas diferencias de pendiente indican que líneas con unos niveles de expresión de *PHYA* y *SIS1* similares en oscuridad, muestran niveles de expresión más altos de *PHYA* que de *SIS1* en W+FR, lo que indicaría que el tratamiento con W+FR reprime más débilmente la expresión de *PHYA* que la de *SIS1*. Como estas líneas difieren únicamente en el fotorreceptor *phyA* (*PHYA* frente a *SIS1*) que regula su propia expresión, parece probable que las alteraciones comentadas se deban a que *PHYA* y *SIS1* presentan diferencias funcionales intrínsecas.

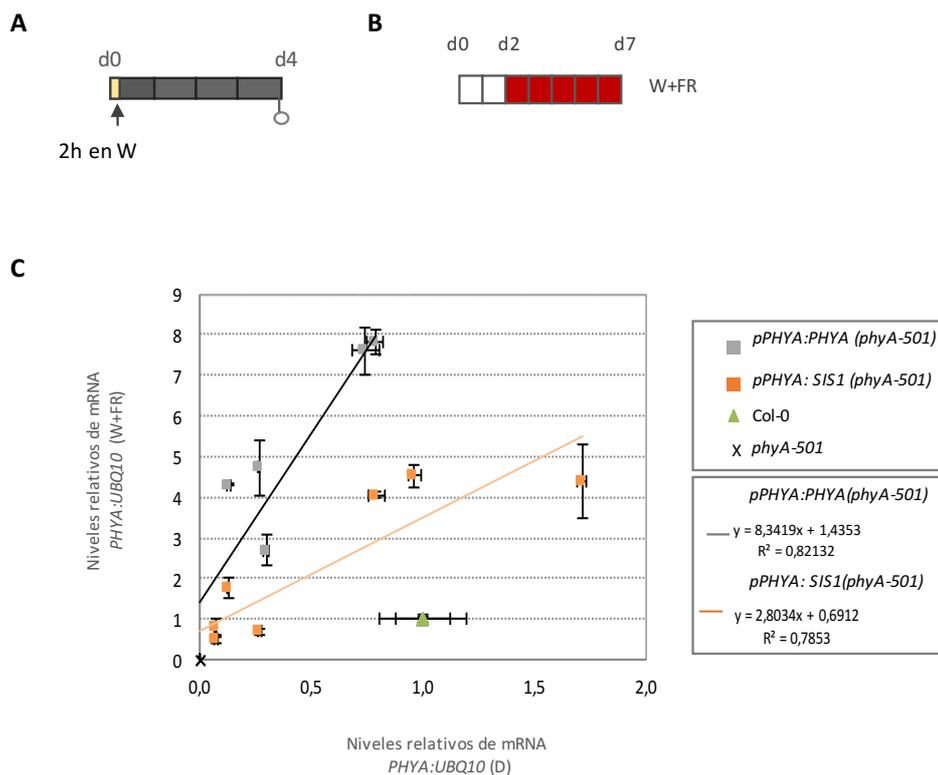


Figura R2.26. Correlación entre la expresión de *PHYA/SIS1* en sombra simulada y oscuridad en plántulas *pPHYA:PHYA (phyA-501)* y *pPHYA:SIS1 (phyA-501)*. (A,B) Esquema del diseño experimental utilizado. Los niveles de *PHYA* o *SIS1* se determinaron en plántulas etioladas de 4 días (A), crecidas tal como se detalla en la Figura R2.10, y en plántulas de día 7 en W+FR (B), crecidas tal como se detalla en la Figura R2.23A. (C) Los niveles relativos de mRNA de *PHYA* en plántulas [*pPHYA:PHYA (phyA-501)* y *pPHYA:SIS1(phyA-501)*] crecidas en W+FR (eje de las Y) se representan respecto a los de las plántulas crecidas en D (eje de las X) para cada una de las líneas analizadas. Cada punto representa la media y el SE de tres réplicas biológicas de cada línea. A la derecha se muestra las fórmulas de las rectas de regresión calculadas para cada construcción a partir de los datos mostrados; R^2 , cuadrado del coeficiente de correlación lineal para cada grupo. En el cálculo de la recta se incluye los valores de *phyA-501* pero no Col-0.

Tras este conjunto de resultados nos planteamos si existía una relación entre la actividad biológica de *PHYA/SIS1* transgénico (medida como diferencia de la longitud del hipocotilo en W+FR respecto a W) y sus niveles de expresión en oscuridad (Figura R2.27) o en sombra simulada (Figura R2.28). En las gráficas se representa la diferencia de la longitud de los hipocotilos crecidos en W+FR y en W (eje de las Y) respecto a los niveles relativos de mRNA de *PHYA/SIS1* (eje de las X) en plántulas etioladas (Figura R2.27) o en plántulas crecidas en W+FR (Figura R2.28).

En las Figura R2.27 y R2.28, el cálculo del cuadrado del coeficiente de correlación lineal R^2 para cada grupo indicaba que en las líneas *pPHYA:PHYA (phyA-501)* la actividad biológica observada correlacionaba con los niveles de *PHYA:UBQ10* tanto cuando se habían estimado en oscuridad ($R^2 \approx 0,59$) como en W+FR ($R^2 \approx 0,78$). Por el contrario, en las líneas *pPHYA:SIS1 (phyA-501)* la actividad biológica no correlacionaba con los niveles de expresión del transgen ni en oscuridad ($R^2 \approx 0,21$) ni en W+FR ($R^2 \approx 0,02$). Estas diferencias de correlación entre las líneas *pPHYA:PHYA (phyA-501)* (correlación positiva) y las líneas *pPHYA:SIS1 (phyA-501)* (correlación negativa) nos estaría indicando que existen diferencias funcionales entre las proteínas *PHYA* y *SIS1*.

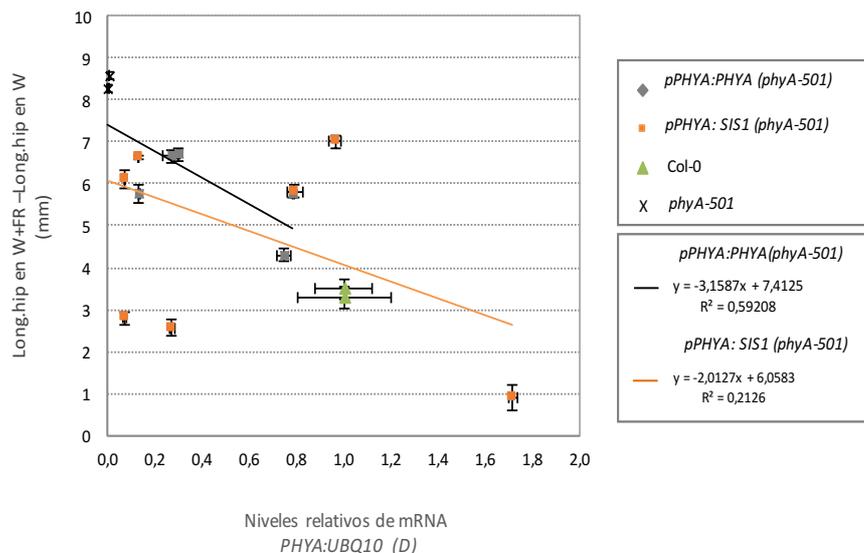


Figura R2.27. Correlación entre la actividad biológica de PHYA/SIS1 en la inhibición de la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra simulada y sus niveles de expresión en oscuridad. La actividad biológica se estima como la diferencia de la longitud de los hipocotilos crecidos en W+FR y en W. En la gráfica se representa esta diferencia entre longitudes de los hipocotilos (eje de las Y) respecto a los niveles relativos de mRNA de PHYA en plántulas etioladas (eje de las X). Los datos de la actividad biológica son los mismos que los mostrados en las Figuras R2.23B [líneas *pPHYA:PHYA (phyA-501)*] y R2.25B [*pPHYA:SIS1(phyA-501)*]. Los datos expresión de PHYA/SIS1 en oscuridad son los mismos que los mostrados en la Figura R2.26. A la derecha se muestra las fórmulas de las rectas de regresión calculadas para cada construcción a partir de los datos mostrados; R^2 , cuadrado del coeficiente de correlación lineal para cada grupo. En el cálculo de las rectas se incluye los valores de *phyA-501* pero no Col-0.

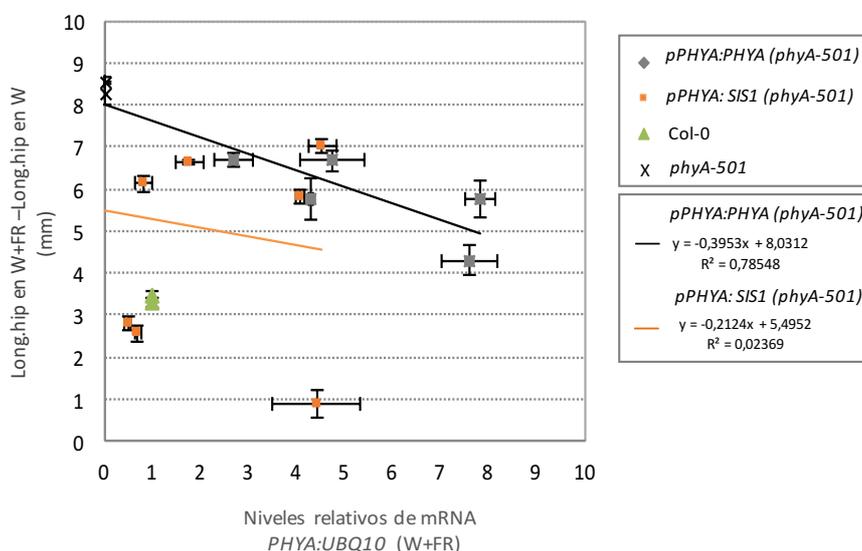


Figura R2.28. Correlación entre la actividad biológica de PHYA/SIS1 en la inhibición de la respuesta de elongación del hipocotilo y sus niveles de expresión en sombra simulada. La diferencia de la longitud de los hipocotilos crecidos en W+FR y en W (eje de las Y), se representa respecto a los niveles relativos de mRNA de PHYA en plántulas crecidas en W+FR (eje de las X). Los datos de la actividad biológica son los mismos que los mostrados en las Figuras R2.23B [líneas *pPHYA:PHYA (phyA-501)*] y R2.25B [*pPHYA:SIS1(phyA-501)*]. Los datos de expresión de PHYA/SIS1 en W+FR son los mismos que los mostrados

en la Figura R2.26. A la derecha se muestra las fórmulas de las rectas de regresión calculadas como se describe en R2.27.

En resumen, los análisis de las líneas transgénicas *pPHYA:PHYA* (*phyA-501*) y *pPHYA:SIS1* (*phyA-501*) indicaban que tanto el *phyA* de *A. thaliana* (*PHYA*) como el de *C. hirsuta* (*SIS1*) complementaban la pérdida de función del *phyA* en la regulación del alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra simulada (y en FRc). Los diferentes grados de complementación parecían ser causados por las variaciones en los niveles de expresión del *PHYA/SIS1* transgénico en las diferentes líneas individuales. Posteriormente, observamos que existía una correlación positiva entre los niveles de expresión de *PHYA* y *SIS1* en sombra simulada y en oscuridad en las líneas transgénicas obtenidas. Las diferencias entre las pendientes estimadas de estas correlaciones sugería que *PHYA* y *SIS1* presentan diferencias funcionales intrínsecas, tales como una diferente capacidad de reprimir su propia expresión.

Tras comprobar si existía una relación entre la actividad biológica de *PHYA/SIS1* transgénico y sus niveles de expresión en oscuridad o en sombra simulada obtuvimos que en el caso de las líneas *phyA-501* complementadas con *PHYA* correlacionaba mientras que en caso de las líneas complementadas con *SIS* no existía dicha correlación. Las diferencias de correlación podrían indicar que hay algo intrínseco en las proteínas *PHYA* y *SIS1* que hace que se comporten de manera distinta, apoyando la idea de que ambos fotorreceptores no son intercambiables.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La proximidad vegetal provoca una disminución del R:FR, señal que es captada por los fitocromos e induce un conjunto de respuestas conocidas como el síndrome de huida de la sombra (SAS) en muchas especies vegetales (Martínez-García et al. 2010; Roig-Villanova & Martínez-García 2016). Otras plantas, por el contrario, como estrategia frente a la proximidad vegetal han desarrollado tolerancia a la vegetación vecina.

En esta tesis hemos estudiado los mecanismos moleculares de un factor de transcripción implicado en el SAS en *A. thaliana*, ATHB4 (capítulo I). Además, hemos realizado un análisis comparativo entre dos especies que emplean diferentes estrategias frente a la sombra (*A. thaliana*, que la evita, y *C. hirsuta* que la tolera) para diseccionar las bases genéticas y moleculares de estas diferencias (capítulo II).

Cuando la estrategia es huir de la proximidad vegetal:

1.1. Estructura y función de ATHB4 en el síndrome de la huida de la sombra.

ATHB4 es un factor de transcripción de la familia de HD-Zip II cuya expresión está directamente controlada por la acción de los fitocromos (Roig-Villanova et al. 2006). La sobreexpresión de este factor altera el desarrollo de la plántula, afectando al alargamiento del hipocotilo, de la raíz, y la expansión de los cotiledones (Sorin et al. 2009). Como se ha visto en la introducción, los miembros de la familia HD-Zip II muestran cierta redundancia funcional entre ellos; además, la reducción del R:FR puede afectar de manera directa a los niveles de expresión de distintos miembros de la familia, apuntando a que actúan en conjunto para regular la expresión génica (Ohgishi et al. 2001).

Experimentos de *microarrays* de nuestro laboratorio mostraron que ATHB4 actuaría como un represor de la transcripción (Gallemí 2013; Gallemí et al. 2017a), datos que eran consistentes con lo publicado por otros autores sobre otros miembros de la familia como *ATHB2*, *HAT2* y *HAT3* (Ohgishi et al. 2001; Sawa et al. 2002; Turchi et al. 2013). En estos *microarrays* se identificaron una serie de posibles genes diana directos de ATHB4, como *SAUR15* (gen integrador de respuestas hormonal cuya expresión se induce por sombra simulada) (Nakamura et al. 2003; Roig-Villanova et al. 2007; Yin et al. 2002; Yin et al. 2005), *HAT2* (miembro de HD-Zip II y cuya expresión también se induce por sombra simulada) y *OPT1* (transportador de péptidos durante el desarrollo del tejido vascular, los cotiledones y el hipocotilo en plántulas, cuya expresión no varía en función de señales lumínicas) (Stacey et al. 2006). Aunque *ATHB2* no se identificó en estos análisis, las regiones promotoras de *HAT2* y *ATHB2* tenían muchas secuencias de unión de ATHB4 *in vitro*, lo que lo que sugería que ATHB4 podría unirse a estas regiones de *ATHB2 in vivo*. Tras utilizar otras técnicas, como *Chromatin ImmunoPrecipitation* (ChIP), se confirmó que ATHB4 se une directamente a secuencias promotoras tanto de *ATHB2* como de *HAT2*, lo que permitió concluir que estos dos genes están por tanto regulados directamente por ATHB4 (Gallemí et al. 2017). *SAUR15* y *OPT1* no tenían secuencias de unión de ATHB4 en sus promotores, por lo que no se estudió la unión de ATHB4 a sus promotores por ChIP. Esto sugería la posibilidad de que ATHB4 pudiera reprimir la expresión de genes concretos sin unirse a sus

regiones reguladoras, actuando por tanto como un cofactor transcripcional.

En los análisis de estructura-función de ATHB4 se analizó la participación de las diferentes regiones o dominios de ATHB4 en la actividad de esta proteína en (1) la respuesta del alargamiento del hipocotilo inducida por la exposición a sombra, (2) la represión de la transcripción de genes marcadores de sombra y (3) la polaridad de las hojas (Gallemí et al. 2017). Estos estudios se realizaron sobreexpresando de manera estable en *A. thaliana* 9 formas truncadas, que contenían combinaciones de los cuatro dominios o regiones que la componen (Nt, HD, Z y Ct) (**Figura R1.1**), y 3 mutadas fusionadas al GR. Tras estos estudios funcionales se concluyó que el extremo Ct no tenía función biológica mientras que la actividad dependía de la región Nt. Esta última región contiene dos motivos EAR definidos como dominios de interacción de proteínas (Szemenyei et al. 2008; Pauwels et al. 2010; Ke et al. 2015) con función represora de la transcripción (Hiratsu et al. 2003; Ikeda & Ohme-Takagi 2009; Kagale et al. 2010; Kagale & Rozwadowski 2011). Plantas transgénicas que sobreexpresaban formas truncadas que carecían de toda la región Nt (los primeros 142 aminoácidos, $\Delta 142$ ATHB4) (**Figura R1.28A**) o bien tenían una mutación en los motivos EAR (ATHB4_{L10A}, mutación puntual de un aminoácido polar Leu10, por otro polar, Ala) en la región Nt mostraban actividad biológica atenuada o anulada en todas las respuestas analizadas, mientras que las que contenían la región Nt wild type (WT) pero no podían unir el DNA (como las formas NtHD y ATHB4_{N210A}) tenían una actividad biológica similar a la de ATHB4 en la respuesta del hipocotilo y/o expresión génica a la sombra, pero carecían de actividad en la regulación de la polaridad de las hojas (Bou-Torrent et al. 2012; Brandt et al. 2012; Turchi et al. 2015). Estos datos nos indicaban que ATHB4 podía controlar la respuesta del alargamiento del hipocotilo y los cambios en la expresión génica en la respuesta a sombra de manera independiente de la unión al DNA. Sin embargo, necesitaba la unión al DNA en la regulación de la polaridad de las hojas. Se concluyó por tanto que ATHB4 tenía dos mecanismos de acción transcripcional alternativos que regulaban procesos de desarrollo diferentes: como factor de transcripción (uniendo directa y específicamente al DNA), mecanismo necesario para regular la polaridad de las hojas, o como cofactor transcripcional (sin unir al DNA) mecanismo implicado en la regulación de la respuesta del hipocotilo a sombra (Gallemí et al. 2017).

Nos resultó sorprendente que un factor de transcripción no requiriese la actividad de unión al DNA para regular algunos procesos fisiológicos. Con lo que con el fin de profundizar en el análisis de este mecanismo dual de acción de ATHB4 (como factor o cofactor transcripcional), en esta tesis estudiamos el efecto de la sobreexpresión de *ATHB4* fusionado a *VP16*, dominio activador de la transcripción con la capacidad de convertir un represor transcripcional en activador. Puesto que ATHB4 actúa principalmente como un represor transcripcional (Gallemí et al. 2017), el razonamiento detrás de estas fusiones era que si ATHB4 se comporta como un factor de transcripción (**Figura D1.1A, B**), la unión de las proteínas ATHB4 o ATHB4-VP16 a los promotores de sus genes diana resultaría en actividades opuestas (represión y activación de la transcripción, respectivamente). Por el contrario, si ATHB4 se comporta como cofactor transcripcional, las proteínas ATHB4 y ATHB4-VP16, que no unirían ni accederían a los promotores de los genes que regulan (**Figura D1.1C, D**), mostrarían una actividad transcripcional similar. La comparación del efecto de la sobreexpresión en plantas de *ATHB4-GFP* (con actividad represora de la transcripción) y *ATHB4-VP16* (supuestamente convertida en un factor activador de la transcripción) sobre la expresión génica (**Figura R1.4C, D**) indicaba que ATHB4-VP16 actúa como un activador transcripcional de *ATHB2* y *HAT2*, a los que ATHB4 regula uniéndose a sus regiones

promotoras (Gallemí et al. 2017), en contraste con ATHB4-GFP, que actúa como un represor transcripcional; por el contrario, tanto ATHB4-VP16 como ATHB4-GFP reprimía la expresión de *OPT1*, gen directamente regulado por ATHB4 pero sin unir sus regiones promotoras (**Figura R1.4B**). Estos resultados, son consistentes con nuestra hipótesis de que ATHB4 puede regular la expresión génica uniéndose o sin unirse a sus secuencias reguladoras de DNA dependiendo del gen que regule, y proporcionan apoyo experimental de la existencia del mecanismo dual de acción de ATHB4 (**Figura R1.4C-D**).

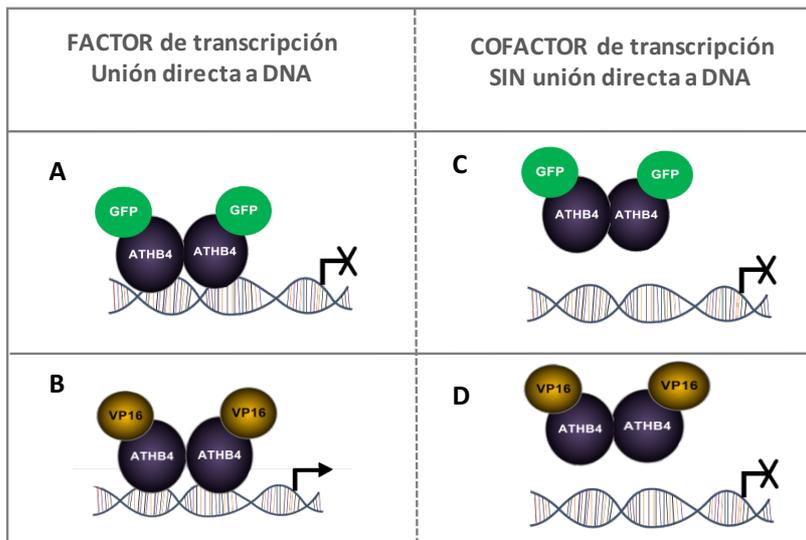


Figura D1.1. Modelos de posible mecanismo de acción de ATHB4-GFP y ATHB4-VP16. (A-B) Si ATHB4 es capaz de unir DNA, la sobreexpresión de *ATHB4-VP16* permitiría que el dominio activador de la transcripción accediese a los promotores de los genes directos de ATHB4, como *ATHB2/HAT2*, y activase su transcripción. ATHB4, actuaría como factor transcripcional. (C-D) Si ATHB4 no es capaz de unir DNA, la sobreexpresión de *ATHB4-VP16* resultaría en fenotipos moleculares similares a los de líneas que sobreexpresan *ATHB4* fusionado a *GFP*. ATHB4, actuaría como cofactor transcripcional.

En la regulación de la respuesta del hipocotilo a sombra propusimos que ATHB4 actuaría como cofactor transcripcional (sin unir al DNA) (Gallemí et al. 2017). La comparación de la respuesta del hipocotilo a sombra de plántulas 35S:ATHB4-GFP y 35S:ATHB4-VP16 indicó que los hipocotilos de los dos tipos de plántulas transgénicas respondían menos que la línea silvestre (**Figura R1.2**), sugiriendo un rol negativo similar en la regulación de esta respuesta, papel que sería independiente de la capacidad de ATHB4 de unir a DNA, con lo que actuaría como un cofactor transcripcional, de acuerdo con nuestra hipótesis previa.

En la regulación de la polaridad de las hojas de la roseta habíamos propuesto un papel para ATHB4 como factor de transcripción, uniendo directa y específicamente al DNA. La comparación del efecto de la sobreexpresión en la curvatura de las hojas de la roseta en plantas 35S:ATHB4-GR inducidas con DEX y 35S:ATHB4-VP16 mostró que la sobreexpresión de *ATHB4* curvaba las hojas hacia arriba, lo que sugería que el crecimiento o expansión de la capa de células adaxial (superior) era menor que la adaxial (inferior), y la de ATHB4-VP16 las curvaba hacia abajo (lo que sugería que el efecto era el contrario (**Figuras R1.5, R1.6**)). Como ATHB4 parece inhibir el crecimiento (Sorin et al. 2009), estos resultados muestran que ATHB4-VP16 lo estimularía e indicaría que en la regulación de esta respuesta las dos formas tendrían un papel opuesto,

resultados que sugerían que ATHB4 actúa como un factor de transcripción (con unión directa al DNA) en la regulación de la polaridad foliar. El conjunto de resultados apoyaban que efectivamente ATHB4 tenía dos mecanismos de acción.

La participación de cofactores transcripcionales en la regulación de las respuestas del SAS ya se ha descrito para otras proteínas. Así, proteínas como PAR1 y HFR1 también actúan como cofactores transcripcionales (Hornitschek et al. 2009; Galstyan et al. 2011) pero sin acción dual como ATHB4. PAR1 y HFR1 pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales bHLH, y su mecanismo de acción implica la inhibición de la actividad de bHLHs auténticos con los que interaccionan, como por ejemplo los PIFs (Hao et al. 2012; Bou-Torrent et al. 2015) y/o las proteínas BIMs y BEEs (Cifuentes-Esquivel et al. 2013).

La novedad de nuestro trabajo reside en que un mismo regulador transcripcional pueda actuar como factor o cofactor transcripcional en función del proceso de desarrollo que regule.

Sin embargo, este mecanismo de acción dual no parece ser único de ATHB4. En el caso de la proteína PIF3, factor de transcripción que actúa como regulador negativo de la señalización de phyB), se demostró que no era necesaria la unión de PIF3 a DNA para modular la respuesta del alargamiento del hipocotilo (en luz R monocromática) (Al-Sady et al. 2008). La acción de PIF3 en la regulación del alargamiento del hipocotilo se realiza sin unir directamente a DNA, igual que en el caso de ATHB4. No obstante, no está claro qué papel tendría el dominio de unión al DNA de PIF3 en su actividad biológica. Ambos factores de transcripción, PIF3 y ATHB4, contienen dominios implicados en la interacción proteína-proteína: PIF3 contiene un dominio APB (*ACTIVE PHYTHOCROME BINDING*) implicado en la interacción con phyB (Al-Sady et al. 2008) y ATHB4 contiene los motivos EAR muy conservados (LxLxLxL y LNLxL), apoyando la importancia de estas interacciones para su actividad biológica. Nuestros análisis indicaban que la región Nt de ATHB4 era necesaria para todas las respuestas analizadas (alargamiento del hipocotilo, regulación de la expresión génica y la polaridad de las hojas). En este contexto, los motivos EAR (localizados en el Nt) proporcionarían la base de estas interacciones. Mediante estas interacciones ATHB4 podría inhibir la unión al DNA de auténticos factores de transcripción que activarían la transcripción de genes que regulan esta respuesta, actuando entonces como un cofactor transcripcional, tal y como de ha sido descrito para las bHLH atípicas HFR1 y PAR1 (Galstyan et al. 2011; Cifuentes-Esquivel et al. 2013; Hornitschek et al. 2009). Por el contrario, en la regulación de genes marcadores de sombra como *ATHB2* o *HAT2* y de la polaridad foliar, ATHB4 formaría dímeros a través de la región Z para interaccionar con el DNA vía el HD; además, los dominios EAR de la región Nt de ATHB4 interaccionarían con otras proteínas que les llevaría a actuar como represores transcripcionales.

1.2. Relevancia biológica de los interactores vía el N-terminal de ATHB4 en la regulación del SAS.

Con el objetivo de entender el papel del Nt en la regulación del SAS se utilizaron dos estrategias complementarias para detectar nuevos interactores del Nt-ATHB4: **(1)** escrutinio empleando el sistema de doble híbrido en levadura (Y2H) utilizando la proteína ATHB4 (entera) como cebo; y **(2)** inmunoprecipitación de complejos e identificación por LC-MS/MS con el fin de detectar nuevos interactores *in planta*.

Fruto de la primera estrategia se habían identificado más de 70 posibles interactores. El análisis de los mismos nos llevó a estudiar tres de estas proteínas: TOPLESS (TPL), TPL-RELATED 4 (TPR4) y SEUSS (SEU), ya que codifican correpresores transcripcionales (Wang et al. 2013; Ke et al. 2015b; Causier, Ashworth, et al. 2012; Sitaraman et al. 2008). Además, se ha descrito que TPL y TPRs interactúan con proteínas que contienen motivos EAR (Pauwels et al. 2010; Causier, Lloyd, et al. 2012; Wang et al. 2013), lo que los convertía en candidatos interesantes a interactuar a través de la región Nt-ATHB4.

Tras validar la interacción del Nt-ATHB4 con TPL (**Figura R1.8**) analizamos genéticamente la función de TPL en las respuestas de la plántula a sombra simulada empleando una serie de líneas con la actividad de TPL alterada. Se analizaron la respuesta del hipocotilo y de expresión génica de una línea con un incremento de los niveles de TPL (**Figuras R1.9, R1.10**), del mutante *tpl-1*, que actúa como dominante negativo sobre la actividad de TPL y otros TPRs (estas plántulas tienen defectos en el desarrollo: plántulas con dos cotiledones, con un solo cotiledón, con forma de copa y sin parte aérea) (**Figura R1.11-12**), y de mutantes de pérdida de función *tpr4*, *tpl* y el doble mutante *tpr4 tpl* (plántulas que no muestran defectos aparentes en el desarrollo) (**Figura R1.13**). De este conjunto de resultados obtuvimos que tanto la ganancia (*pTPL:TPL-HA*) como la pérdida de actividad de TPL/TPR (*tpl-1* ó *tpr4 tpl*) resultaban en una ligera disminución de la respuesta del hipocotilo a sombra simulada, y un incremento de la expresión génica de marcadores de sombra. Estos resultados sugerían que el papel de TPL en el SAS es complejo e implica probablemente la participación de otros factores adicionales, al igual que se observó con el papel de ATHB4 en la regulación de las respuestas del SAS (Sorin et al. 2009). Pese a su complejidad, este conjunto de resultados sugieren que la proteína de TPL tendría un papel positivo en la regulación del alargamiento del hipocotilo. No obstante, no es fácil establecer si los efectos en la respuesta del hipocotilo o la expresión génica son directos (por la falta de TPL y TPRs) o indirectos (por los defectos en el desarrollo). Hubiera sido interesante añadir el análisis molecular de *tpr4tpl* para ver si la respuesta molecular era similar a la del mutantes *tpl-1* y así poder confirmar que los efectos de inducción de *tpl-1* se debían por la acción directa de la pérdida de estos componentes y no por problemas en el desarrollo.

Algunos autores describen a SEU como una proteína puente que forma parte de complejos represores de la transcripción (Gregis et al. 2006; Pfluger & Zambryski 2004; Sridhar et al. 2004); otros indican que SEU podría actuar en complejos como activador o como represor dependiendo del contexto celular (Mannervik et al. 1999; Freiman & Tjian 2002; Pfluger & Zambryski 2004). Tras validar la interacción de la proteína ATHB4 con SEU (**Figura R1.14**), los análisis genéticos de plantas con niveles reducidos de SEU indicaron que sus hipocotilos se alargaban menos que los de plántulas silvestres en respuesta a la sombra simulada; parecería por tanto que SEU tendría un rol positivo tanto en la regulación del alargamiento del hipocotilo como en la expresión génica en respuesta a sombra (**Figura R1.15-16**). Una posibilidad sería que la unión de SEU inhibiese la actividad de ATHB4, de forma que acción de SEU fuese indirecta. Así, cuando SEU no está presente (*seu-3*), la actividad de ATHB4 sería mayor, lo que resultaría en un fenotipo similar al de plántulas de sobreexpresión de *ATHB4*.

En paralelo, llevamos a cabo una aproximación proteómica *in planta* con el fin de detectar interactores del Nt-ATHB4. Tras comprobar que las líneas transgénicas *35S:NtHD-GFP* tenían

actividad biológica y que su señal GFP se podía detectar (**Figura R1.18-R1.19**), realizamos la inmunoprecipitación de los complejos y las lecturas del LC-MS/MS (**Figura R1.20**). Se identificaron 68 proteínas putativas interactoras del Nt-ATHB4, y tras los pertinentes filtrados nos quedamos con una lista de los 12 candidatos cuya localización subcelular era nuclear (**Figura R1.21D- Tabla R1.1**).

Nos focalizamos en SAP18, que interactuaba con proteínas que tenían motivos EAR y estaba relacionado con la represión transcripcional en plantas (Song & Galbraith 2006; Hill et al. 2008; Kagale & Rozwadowski 2011). Tras validar la interacción del Nt-ATHB4 con SAP18 (**Figura R1.22**) analizamos una línea de pérdida de función *sap18-10* (**Figura R1.23**). Las plántulas mutantes *sap18-10* mostraban una respuesta ligeramente incrementada a la sombra simulada respecto a plántulas silvestres (**Figura R1.24**), lo que nos indicaba que SAP18 tendría un papel negativo en la regulación del alargamiento del hipocotilo.

La proteína SAP18 no está muy bien caracterizada en *A. thaliana*, pero se considera una proteína estructural que estabiliza el complejo correpresor SIN3/HISTONE DEACETYLASE (HDAC) (Silverstein & Ekwall 2005). Además, se ha demostrado que SAP18 hace de enlace entre el complejo HDAC y represores transcripcionales (Hill et al. 2008; Song & Galbraith 2006).

Hipotetizamos que cuando SAP18 no está presente (*sap18-10*), la interacción del “complejo SIN3” con ATHB4 estaría alterada. Además, podría ser que hubiera un incremento de HDAC produciendo que la acetilación de histonas estuviera reducida. No obstante, desconocemos si la desacetilación/acetilación de las histonas tiene algún papel en la regulación de las respuestas del SAS en plántulas.

1.3. Función de los motivos EAR en ATHB4.

Con la finalidad de tener una versión de la proteína ATHB4 que mantuviera las actividades moleculares no relacionadas con los EAR intactas (p.ej. unión al DNA), obtuvimos la forma mutada ATHB4_{E1E2m} (**Figura R1.25**) que efectivamente no era capaz de interactuar con otras proteínas, como TPL y SAP18, pero sí de homodimerizar vía el dominio Zip, confirmando que estos factores interactúan con ATHB4 vía los motivos EAR (**Figura R1.26**). En el caso de SEU, tuvimos complicaciones técnicas que nos impidieron responder a esta pregunta. Los análisis de las líneas transgénicas inducibles *35S:ATHB4_{E1E2m}-GR* mostraron que la presencia de los motivos EAR es clave para la función de ATHB4 en la inhibición de la respuesta del alargamiento del hipocotilo en sombra simulada (**Figura R1.27**). Por falta de tiempo nos quedó por analizar los cambios en la expresión de los genes diana directos de ATHB4 (*ATHB2*, *HAT2* o *SAUR15*) en contraste a cómo lo hace la forma silvestre de la proteína (**Figura R1.4**). Nuestros resultados indican por tanto que la importancia de la región Nt de ATHB4 se debe a los motivos EAR, que son clave para la función biológica de ATHB4 en las tres respuestas analizadas.

La detección de la proteína entera ATHB4 en las líneas sobreexpresoras por inmublots era complicada y en ocasiones fallida, mientras que las formas truncadas sin la parte Nt se detectaban con facilidad (**Figura R1.28**). Estos resultados nos llevaron a pensar que la región Nt de ATHB4 era responsable de la estabilidad de la proteína y los motivos EAR podrían tener un papel en esto. Los experimentos de sobreexpresión transitoria en plantas de tabaco con formas truncadas de ATHB4 fusionadas a la GFP (Gallemí 2013) indicaban que la actividad GFP apenas se detectaba en núcleos sobreexpresando *ATHB4-GFP* tratados con luz W y aumentaba cuando

se trataba durante 1 h con W+FR, lo que sugería que la estabilidad estaba controlada por los fitocromos. Los motivos EAR parecen participar en la estabilidad de ATHB4 en respuesta a sombra simulada (**Figura R1.29**) probablemente por las interacciones que median, pero que dependerían de las condiciones de luz. En W, condiciones en que el fitocromo Pfr está activo, se reduciría la estabilidad de ATHB4; y en W+FR, condiciones en que el fitocromo pasa mayoritariamente a la forma Pr, aumentaría la abundancia (estabilidad) de la proteína ATHB4. En este sentido, nuestra observación de que el tratamiento con sombra simulada incrementaba los fenotipos de curvatura de las hojas tanto en las plantas *35S:ATHB4-GR* inducidas (mayor curvatura hacia arriba) como en las *35S:ATHB4-VP16* (mayor curvatura hacia abajo) (**Figuras R1.5, R1.6**) apoyan que la estabilidad de la proteína está incrementada en W+FR. A pesar de que la mayoría de investigaciones sobre los motivos EAR han estado centradas en su función de interacción con otras proteínas o de represión de la expresión génica, nuestros resultados sugieren la existencia de nuevas funciones en las que participan estos motivos, ya sean directa o indirectamente, como la estabilidad de la proteína dependiente de luz.

En resumen, nuestros resultados indican que (1) ATHB4 interacciona con SEU, TPL y SAP18 (con los dos últimos vía los motivos EAR), y (2) TPL y SEU tendrían un papel positivo mientras que SAP18 un papel negativo en la regulación del alargamiento del hipocotilo en respuesta a la sombra. El siguiente paso sería establecer los mecanismos por lo que estas interacciones físicas entre proteínas (ATHB4 con SEU, TPL y SAP18) tienen un papel en el SAS. Con este objetivo, en el laboratorio se han realizados cruces entre la línea de sobreexpresión de *ATHB4-GR* y los mutantes de pérdida de función: *seu-3*, *tpl-1*, *sap-18*. Las repuestas a la sombra de los dobles mutantes están en proceso de ser analizadas.

Múltiples trabajos han permitido elucidar que diversos correpresores (tales como TPL y SAP18) interaccionan y actúan con proteínas con motivos EAR (Hiratsu et al. 2003; Ikeda & Ohme-Takagi 2009; Kagale et al. 2010; Kagale & Rozwadowski 2011). Se ha comenzado a esclarecer los mecanismos de la represión mediada a través de estos motivos. La demostración de la interacción genética entre TPL y HDA19 (Long et al. 2006), y así como la interacción física directa entre SAP18 y HDA19 (Song & Galbraith 2006) apoyan un modelo donde los factores represores de la transcripción que contienen motivos EAR estarían remodelando la cromatina y de este modo facilitando la regulación génica (Kagale & Rozwadowski 2011; Ryu et al. 2014). Todas las proteínas de la subfamilia HD-Zip II contienen al menos un motivo EAR en el N-terminal, requerido para la represión transcripcional (Kagale et al. 2010; Kagale & Rozwadowski 2011). Además, se sabe que varias HD-Zip II (ATHB2, ATHB4, HAT1, HAT2, HAT3) se comportan como represores de la transcripción (Ohgishi et al. 2001.; Sawa et al. 2002; Sorin et al. 2009). Por tanto, parece probable que ATHB4 y otros HD-Zip II participen en estos complejos de represión. Además, la similitud entre ATHB4 y los otros miembros HD-Zip II también sugiere que los mecanismos moleculares que emplea ATHB4 en la regulación de diferentes respuestas del desarrollo esclarecidos en nuestro trabajo puedan también extrapolarse a los otros miembros de la familia.

Tolerancia a la sombra, una estrategia alternativa frente a la proximidad vegetal.

2.1. *A. thaliana* y *C. hirsuta*, dos plantas modelo para el estudio de estrategias alternativas a la proximidad vegetal.

La tolerancia a la sombra se refiere a la capacidad de las plantas de vivir en condiciones con bajos niveles de luz, como las que se encuentran en zonas sombreadas por otras plantas. Se asume que las especies tolerantes perciben los cambios de R:FR, pero en respuesta a esta señal, el alargamiento de sus órganos está atenuado (o anulado). Hasta el momento existe muy poca información disponible sobre los mecanismos y los componentes genéticos que participan o regulan la tolerancia a la sombra. Por ello hemos propuesto un análisis comparativo entre dos especies filogenéticamente cercanas que emplean diferentes estrategias frente a la sombra vegetal (*A. thaliana*, que la evita, y *C. hirsuta* que la tolera) que nos ha permitido diseccionar las bases genéticas y moleculares de estas diferencias.

Este estudio empezó con la observación de que las plántulas de *C. hirsuta* no alargaban sus hipocotilos en respuesta a tratamientos con sombra simulada (**Figura R2.1**) (Hay et al. 2014), si bien la capacidad de estos órganos de alargarse tanto en oscuridad (**Figura R2.10**) como en respuesta a hormonas vegetales, como las giberelinas (Hay et al. 2014) no estaba comprometida. Para explicar la falta de alargamiento del hipocotilo de las plántulas de *C. hirsuta* planteamos que podría haber al menos tres posibles mecanismos: (1) que no percibe la sombra, (2) que la percepción a la sombra no está conectada con las redes reguladoras endógenas de promoción del alargamiento del hipocotilo, y/o (3) que existen mecanismos de supresión de la respuesta de alargamiento.

El análisis en *C. hirsuta* de otras respuestas a la proximidad vegetal como la acumulación de pigmentos fotosintéticos o cambios rápidos en la expresión génica, indicaban que *C. hirsuta* era capaz de percibir la sombra (**Figura R2.2**) (**Figura R2.19**), por lo que podemos descartar el primero de los mecanismos planteados para explicar la falta de respuesta del hipocotilo a luz de baja R:FR. Estos resultados son consistentes con las observaciones recientes de otros autores que describieron cambios transcripcionales en dos especies de geranio (una intolerante y otra tolerante a la sombra), resultados que indican que estas plantas, independientemente de la estrategia empleada para responder a la proximidad vegetal, perciben (y responden a) la señal de sombra (Gommers et al. 2017). No obstante, como los hipocotilos de *C. hirsuta* no se alargan específicamente en respuesta a la proximidad vegetal la consideramos una especie que tolera la sombra, en contraste con *A. thaliana*.

La identificación de los mutantes *sis1* y el hecho de que estas mutaciones fuesen monogénicas y recesivas (**Figura R2.11**), indicaba que la pérdida de la función de un único gen era suficiente para que los hipocotilos de las plántulas de *C. hirsuta* se alargasen en respuesta a sombra simulada. Estos resultados sugerían que los mecanismos que conectan la percepción de sombra simulada y las redes reguladoras endógenas de promoción del alargamiento del hipocotilo en esta especie existen y son funcionales, al igual que ocurre en especies que evitan la sombra, como *A. thaliana*. Así, podíamos descartar el segundo de los dos mecanismos restantes (que la percepción a la sombra no está conectada con las redes reguladoras

endógenas de promoción del alargamiento del hipocotilo). Por tanto, debían de existir mecanismos de supresión de la respuesta de alargamiento del hipocotilo a la proximidad vegetal, y SIS1 era una parte principal del mismo.

La identificación molecular de la mutación *sis1* se llevó a cabo de manera razonada. Por un lado, *phyA* se había descrito como un regulador negativo de las respuestas del hipocotilo a la sombra en *A. thaliana*. En esta especie las plantas mutantes *phyA* responden a sombra simulada alargando más el hipocotilo que las plantas silvestres (Johnson et al. 1994; Yanovsky et al. 1997; Martínez-García et al. 2014). El análisis del alargamiento del hipocotilo de las plántulas de silenciamiento *RNAi:ChPHYA* que se generaron en paralelo (**Figura R2.7-R2.8**) indicó que la reducción de los niveles de *ChPHYA* en Cardamine resultaba en plántulas que respondían a sombra simulada alargando sus hipocotilos, tal como habíamos observado que respondían los mutantes *sis1*.

Además, los análisis de inmunoblot con anticuerpos específicos contra *phyA* de extractos de proteínas de plántulas etioladas de Ox y de los mutantes *sis1* mostraron que uno de los dos alelos carecía de *phyA*. La secuenciación del gen *ChPHYA* confirmó que los alelos *sis1* eran deficientes en este fotorreceptor, demostrando por tanto que era necesario para la implementación de la tolerancia a la sombra (**Figura R2.13**).

Experimentos de desetiación bajo intensidades crecientes de distintos tipos de luz monocromática (Bc, Rc, FRc) indicaron que las plántulas *sis1* de *C. hirsuta*, al igual que las *phyA-501* de *A. thaliana* eran hiposensibles a Bc y al Rc y completamente ciegas a FRc (**Figuras R2.15-R2.17**) en contraste con las correspondientes plántulas silvestres (Ox y Col-0), indicando que el papel de *phyA* en la desetiación era similar en ambas especies. Los análisis del efecto de la ausencia de *phyA* en la acumulación de pigmentos fotosintéticos (CRT y CHL) en respuesta a la sombra simulada (**Figura R2.18**), indicaban que *phyA* reprime esta respuesta a sombra en ambas especies, independientemente de la estrategia utilizada frente a la proximidad vegetal a nivel de alargamiento del hipocotilo. Los análisis de la inducción de genes marcadores de sombra en respuesta a sombra simulada (*PIL1* y *ATHB2*) (**Figura R.19**) indicaban que *phyA* de *C. hirsuta* inhibe la inducción tardía por sombra de estos genes, al igual que está descrito para *phyA* en *A. thaliana* (Ciolfi et al. 2013). Por tanto, en las dos especies estudiadas la ausencia de *phyA* produce fenotipos similares.

También encontramos diferencias en el papel del *phyA* de las dos especies en el alargamiento de los hipocotilos en respuesta a sombra simulada: los hipocotilos de las plantas *phyA-501* de *A. thaliana* se diferenciaban de los silvestres sólo cuando crecían en condiciones de R:FR muy bajo, mientras que las plantas *sis1-1* y *sis1-2* presentaban hipocotilos más largos que las plántulas silvestres en todas las condiciones de sombra estudiadas (**Figura R2.14**). La existencia de diferencias de respuestas de los mutantes *phyA-501* y *sis1-1* y *sis1-2* sólo en las respuestas a sombra simulada (y no en las de desetiación) sugerían que podrían existir diferencias específicas entre estas dos especies en componentes aguas abajo en la señalización de *phyA* que estarían implicados en la supresión del alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra, componentes en los que convergería la acción del *phyA*.

El hecho de que en *C. hirsuta* *phyA* inhiba el alargamiento del hipocotilo en sombra nos llevó a hipotetizar que la tolerancia a la sombra en esta especie podría deberse a niveles o actividad

de *phyA* altos, tal como se observa en plantas de *A. thaliana* que sobreexpresan *PHYA* (línea 35S:As*PHYA*, AOX) (**Figuras R2.3, R2.4**). Los niveles de transcrito *PHYA* y de proteína *PHYA* eran mayores en plántulas etioladas de *C. hirsuta* que las de *A. thaliana*, resultados que apoyaban que este fotorreceptor podría causar las diferencias de respuesta del hipocotilo entre las dos especies a la proximidad vegetal (**Figura R2.6**). No obstante, no sabemos si los niveles de *PHYA/PHYA*, que se estimaron en oscuridad, también son mayores en plántulas que crecen en W y W+FR.

2.2. Complementación de plantas deficientes en *phyA* de *A. thaliana*.

Además de mayores niveles de expresión de transcrito *PHYA* y de proteína *PHYA* (**Figura R2.6**), la tolerancia a la sombra también podría establecerse si la actividad intrínseca del *phyA* de *C. hirsuta* (que llamaremos *SIS1* para diferenciarlo del *PHYA* de *A. thaliana*) es mayor que la de *A. thaliana*, bien porque *SIS1* sea más activo o por ser más estable que *PHYA* en sombra simulada. Con el fin de estudiar si existían diferencias intrínsecas entre la proteína *PHYA* y *SIS1*, transformamos el mutante *phyA-501* de *A. thaliana* con el gen *PHYA* de *A. thaliana* y el de *C. hirsuta* (*SIS1*) bajo el control del promotor endógeno de *PHYA* de *A. thaliana* (*pPHYA:PHYA* y *pPHYA:SIS1*) (**Figura R2.21**). Las dos construcciones empleadas eran capaces de producir *phyA* funcional, puesto que las plántulas presentaban supresión del alargamiento del hipocotilo tanto en respuesta a sombra simulada como en desetiación, sugiriendo que las construcciones producen *PHYA/SIS1* funcionales en *A. thaliana* e indicando que había complementación (**Figuras R2.22-R2.25**).

Los niveles de expresión de las líneas *pPHYA:PHYA* (*phyA-501*) y *pPHYA:SIS1* (*phyA-501*) en oscuridad y en sombra simulada correlacionaban positivamente, pero las pendientes de las rectas de regresión eran diferentes (**Figuras R2.26**) e indicaban que líneas con unos niveles de expresión de *PHYA* y *SIS1* similares en oscuridad, presentaban niveles de expresión más altos de *PHYA* que de *SIS1* en sombra simulada. Puesto que estas líneas sólo diferían en el fotorreceptor *SIS1/PHYA* (que regula su propia expresión), interpretamos que *SIS1*, tras el tratamiento con sombra simulada, es más eficiente en reprimir su propia expresión que *PHYA*.

La actividad biológica de *PHYA* en la respuesta del alargamiento del hipocotilo correlacionaba tanto con los niveles de expresión de *PHYA* en oscuridad como en sombra simulada, mientras que la actividad biológica de *SIS1* no correlacionaba con sus niveles de expresión. Dado que la expresión de *PHYA* y *SIS1* está bajo el mismo promotor, las diferencias de correlación podrían indicar que hay algo intrínseco en las proteínas *PHYA* y *SIS1* que hace que se comporten de manera distinta, al igual que habíamos concluido a partir de la correlación entre niveles de expresión en oscuridad y en sombra simulada (**Figuras R2.27-R2.28**). Si *SIS1* fuese intrínsecamente más activo o más estable que *PHYA*, cuando las plantas perciben la proximidad vegetal, la proteína *SIS1* sería más efectiva en reprimir el alargamiento del hipocotilo. Para poder verificar esta hipótesis faltaría estudiar los niveles de proteína en sombra e intentar analizar si la actividad biológica de *PHYA/SIS1* se correlaciona con los niveles de proteína.

Por último, el hecho de que la complementación del mutante *phyA-501* con *SIS1* no resulte en plantas completamente tolerantes a la sombra (**Figura R2.25**) sugiere que probablemente la tolerancia a la sombra no depende únicamente del *phyA* (*SIS1*), y por tanto que componentes

aguas abajo en la señalización de phyA también estarían influyendo en la tolerancia a la sombra.

En resumen, *C. hirsuta* es una especie filogenéticamente cercana a *A. thaliana* pero tiene como estrategia tolerar la sombra. Nuestros estudios indican que el phyA tiene un papel fundamental en la tolerancia a la sombra inhibiendo la respuesta de alargamiento de los hipocotilos, pero no sería el único componente que tendría un papel en este proceso. Postulamos que además del phyA, componentes aguas abajo de su vía de señalización estarían regulando la tolerancia a la proximidad vegetal.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los análisis de sobreexpresión de la fusión de ATHB4 al activador de la transcripción VP16 confirman que ATHB4 actúa como factor de transcripción o como cofactor transcripcional en la regulación de procesos de desarrollo diferentes.
2. La región N-terminal de ATHB4 interacciona con los cofactores TPL, SEU y SAP18. Los análisis genéticos indican que TPL y SEU actuarían como reguladores positivos, y SAP18 como regulador negativo de las respuestas del alargamiento del hipocotilo en sombra.
3. Los motivos EAR de la región N-terminal de ATHB4 (1) median la interacción con TPL y SAP18; (2) son necesarios para la inhibición del alargamiento de los hipocotilos en respuesta a sombra simulada, y (3) participan en la estabilidad de la proteína en respuesta a la sombra simulada.
4. Las plántulas de *Cardamine hirsuta*, una especie filogenéticamente próxima a *Arabidopsis thaliana*, son capaces de percibir la sombra aunque no responden alargando los hipocotilos, por lo que la consideramos como una especie que tolera la sombra.
5. El cribado genético de una población mutagenizada de *C. hirsuta* resultó en la obtención de los mutantes *slender in shade1 (sis1)*, caracterizados por responder a sombra alargando el hipocotilo. Estos mutantes *sis1* eran deficientes en fitocromo A (*ChPHYA/SIS1*).
6. Nuestros análisis genéticos, tanto de líneas *RNAi:ChPHYA* como del cribado genético que resultó en la identificación de los mutantes *sis1*, indican que en *C. hirsuta* el fitocromo A es clave para esta supresión y por tanto para la tolerancia a la proximidad vegetal.
7. La tolerancia a la sombra se debe a la supresión de dicha respuesta más que a una desconexión entre la percepción de la sombra y los mecanismos endógenos de control del alargamiento del hipocotilo.
8. La pérdida de función del *phyA* en *A. thaliana* y *C. hirsuta* resulta en fenotipos similares en la desetiología de la plántula.
9. La complementación de plantas mutantes *phyA* de *A. thaliana* con *pPHYA:PHYA* y *pPHYA:SIS1* sugiere que las proteínas *phyA* de *A. thaliana* y *C. hirsuta* tienen actividades distintas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Se describen tanto materiales como protocolos que se han utilizado durante esta tesis doctoral. Los métodos generales de manipulación de ácidos nucleicos, proteínas, y los relacionados con el cultivo y manipulación de bacterias se realizaron según los protocolos descritos en “*Current Protocols in Molecular Biology*” (Ausubel et al. 2001), y “*Molecular cloning: A laboratory Manual*” (Sambrook & Russell 2001) con pequeñas modificaciones de nuestro laboratorio en algunos casos.

El agua utilizada generalmente es desionizada (dH₂O), mientras que para los experimentos de biología molecular se utilizó bidestilada (ddH₂O, dH₂O tratada con el desionizador de agua *Millipore Milli-Q*). Normalmente las soluciones utilizadas se esterilizaron con un autoclave húmedo de vapor de agua a 120°C y una atmosfera de presión durante 20 minutos; en el caso de los reactivos para levadura se esterilizaron bien en las mismas condiciones de temperatura pero solo 15 min, o bien mediante filtración (filtros de 0,3-0,45 µm).

El pH de los medios y soluciones se ajustó antes de someterlos a los ciclos de autoclave. El material de laboratorio y las membranas para la recogida de material vegetal se esterilizaron en autoclaves secos.

1. Material bacteriano y levaduras.

1.1. Cepas de bacterias y levaduras.

Se han utilizado las siguientes cepas bacterianas:

DH5α: Cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) utilizada para los clonajes de vectores.

C58C1/GV2260: Cepa de *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*), para el uso de vectores binarios para la transformación de plantas.

GV3101: Cepa de *A. tumefaciens* utilizada para la agroinfiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*).

PJ694α: Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*, levadura) que se transforma con el plásmido que contiene la proteína de fusión BD-X.

YM4271a: Cepa *S. cerevisiae* que se transforma con el plásmido que contiene la proteína de fusión AD-Y.

1.2. Condiciones de crecimiento de bacterias y levaduras.

El cultivo líquido de células de *E. coli* y *A. tumefaciens* se realizó en tubos de cultivo a 37°C y 28°C respectivamente en agitación a 250 rpm, y el de *S. cerevisiae* se realizó en tubos de cultivo a 28-30°C en agitación a 180 rpm. El cultivo sólido se realizó en placas de Petri a la Tª descrita. Los cultivos de bacterias y levaduras se almacenaron permanentemente en *ependorfs*® utilizando cultivos crecidos durante la noche (Over Night; O/N) con 50% glicerol y conservados a -80°C.

1.3. Medios de cultivos de bacterias y levaduras.

Bacterias:

Los medios de cultivo utilizados rutinariamente para el trabajo con bacterias durante esta tesis fueron los siguientes:

Medio LB pH 7,5: bactotripton 100 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 10 g/L. Ajustar el pH con NaOH. Para el medio sólido se añade 15 g/L de agar . Se esteriliza en el autoclave durante 20 min.

Medio YEB pH 7,2: extracto de carne 5 g/L, extracto de levadura 1 g/L, peptona 5 g/L, sacarosa 5 g/L y 2 mL/L MgSO₄ 1M. Para el medio sólido se añade 15 g/L de agar. Se esteriliza en el autoclave durante 15 min.

Levaduras:

Los medios de cultivos utilizados rutinariamente para el trabajo con levaduras se esterilizaron autoclavando a 120 °C durante 15 min:

Medio YPDA líquido y sólido: peptona Difco 20 g/L , extracto de levadura 10 g/L y glucosa 20 g/L . Ajustar el pH a 5,8 con HCl, añadir agar Difco 20 g/L (sólo para medio sólido) y autoclavar.

Medio SD (Synthetic Dropout): base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Sigma Y0626) 6,7 g/L y glucosa 20 g/L. Ajustar el pH a 5.8 con HCl, añadir agar Difco 20 g/L (sólo para el medio sólido) y autoclavar. Enfriar el medio hasta 55°C antes de añadir las soluciones 10x dropout (10xDO).

10x DO-L: DO-L 6,4 gr/L en agua. Autoclavar.

10x DO-W: DO-W 6,4 gr/L en agua. Autoclavar.

10x DO-LW: DO-LW 6,4 gr/L en agua. Autoclavar.

10x DO-HLW: DO-HLW 6 gr/L en agua. Autoclavar.

1.4. Resumen de compuestos de selección añadidos a los medios de cultivo bacterianos y de plantas.

En la **tabla M1** se muestra los diferentes antibióticos y otros compuestos utilizados para la selección con los que se suplementaron los medios, las concentraciones, el disolvente en el que se prepara y las concentraciones de trabajo.

Antibióticos, y otros compuestos de selección	Concentración stock	Disolvente	Concentración de trabajo (según el organismo)			
			<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>C. hirsuta</i>
Carbenicilina (Cb)	100 mg/mL	Etanol 50%	100 µg/mL	100 µg/mL	-	-
Cefotaxima (Cf)	100 mg/mL	Agua	-	-	100 µg/mL	100 µg/mL
Espectinomicina (Spc)	100 mg/mL	Etanol 50%	100 µg/mL	100 µg/mL	-	-
Gentamicina (Gm)	200 mg/mL	Agua	40 µg/mL	-	-	-
Higromicina (Hyg)	50 mg/mL	Agua	-	-	30 µg/mL	50 µg/mL
Kanamicina (Km)	50 mg/mL	Agua	25 µg/mL	25 µg/mL	25 µg/mL	-
Rifampicina (Rf)	50 mg/mL	DMSO	20 µg/mL	50 µg/mL	-	-
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal)	20 mg/mL	DMF	40 µg/mL	-	-	-
Basta (ppt)	-	-	-	-	16 µg/mL	32 µg/mL
Isopropil-β-D-Tiogalactósido (IPTG)	23,8 mg/mL	Agua	23,8 µg/mL	-	-	-

Tabla M1. Antibióticos y otros compuestos de selección que se han utilizado en este trabajo con las bacterias: *E. coli*, *A. tumefaciens* y en plantas: *A. thaliana*, *C. hirsuta*. DMF: N,N-DIMETILFORMAMIDA. DMSO: DIMETILSULFÓXIDO.

2. Material vegetal.

En este trabajo se han utilizado plantas de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) de las accesiones Columbia-0 (Col-0), Landsberg *erecta* (Ler-0), Knox (KNO-18) y Nossen (No-0). Además, se ha utilizado plantas de *Cardamine hirsuta* (*C. hirsuta*) de la accesión Oxford (Ox).

2.1. Líneas transgénicas.

Las líneas transgénicas generadas se detallan en el apartado 3.1 "Construcciones y transformaciones en planta".

2.2. Líneas de ganancia de función cedidas por otros laboratorios.

Línea	Gen	Descripción
<i>pTPL:TPL1-HA (pDS1)</i>	<i>TPL</i>	Sobreexpresión del gen <i>TPL</i> . Cedida por Dr. David E. Somers.
<i>tpl-1</i>	<i>TPL</i>	Línea de ganancia de función que suprime de función de los genes <i>TPL-TPR</i> . Cedida por el Dr. Jeff.A. Long.
<i>35:AsPHYA</i>	<i>PHYA</i>	Sobreexpresión constitutiva del gen <i>PHYA</i> de <i>A. sativa</i> cedida por Dr. Peter Quail.

Tabla M2. Líneas de ganancia de función.

2.3. Líneas de pérdida de función por inserción de T-DNA.

Los mutantes que proceden de la colección **SALK** se han generado por inserción de T-DNA del vector pROK2 con el gen *NPTII* de resistencia a Km en el genoma de *A. thaliana* en el fondo genético Col-0. Han sido generadas en el laboratorio del Dr. J. Ecker en el SIGnAL (*Salk Institute Genomic Analysis Laboratory*, <http://signal.salk.edu/index.html>). Adquiridas del NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Centre*).

Los mutantes que proceden de la colección **Gabi-Kat** se han generado por inserción de T-DNA que contienen una secuencia flanqueante (*Flanking Sequence Tag*, FST) en el genoma de *A. thaliana* en el fondo genético Col-0. Han sido generados en el laboratorio del Dr. Weisshaar (Universität Bielefeld, <https://www.gabi-kat.de/>).

Línea mutante	Nombre en el lab.	Ecotipo	GEN	LOCUS	Código Salk o Gabi-KAT
<i>phyA-501</i>	SA2	Col-0	<i>PHYA</i>	AT1G09570	SALK_014575
<i>phyB-9</i>	<i>PhyB</i>	Col-0	<i>PHYB</i>	AT2G18790	Cedido por Dr. Quail (Reed et al. 1993)
<i>sap18-10</i>	<i>C58.10</i>	Col-0	<i>SAP18</i>	AT2G45640	Gabi-Kat_ GK-855C02
<i>seu-3</i>	<i>seu-3</i>	Col-0	<i>SEU</i>	AT1G43850	Cedida por Dr. Franks (Franks et al. 2002)
<i>tpr4-10</i>	<i>S136</i>	Col-0	<i>TPR4</i>	AT1G15750	SALK_150008
<i>tpl-20</i>	<i>S139</i>	Col-0	<i>TPL</i>	AT1G04530	SALK_097230

Tabla M3. Líneas de pérdida de función.

2.4. Cruces.

Los cruces se han realizado polinizando los pistilos (\varnothing) de flores emasculadas de la línea 1 con el polen de la línea 2 (σ^7). Si la fecundación se produce con éxito se desarrolla una silicua de la que se recogen las semillas (generación F1 del cruce). La autofecundación de los individuos de F1 da la generación F2 y así sucesivamente.

Nombre del cruce	Planta madre (\varnothing)	Planta padre (σ^7)	Finalidad del cruce
CMJ19.18	<i>tpr4-10</i>	<i>tpl-20</i>	Obtención del doble mutante
CMJ6	Ox	<i>m10.024 (sis1-2)</i>	Retrocruzamiento (limpieza/análisis del tipo de mutación)
C56	cMJ6	<i>m10.024 (sis1-2)</i>	Retrocruzamiento (limpieza/ análisis del tipo de mutación)
C58	CCT5	Ox	Retrocruzamiento (limpieza/análisis del tipo de mutación)
CCT5	<i>m181.1 (sis1-1)</i>	Ox	Retrocruzamiento (limpieza/análisis del tipo de mutación)
CMJ27	CCT5.19	CMJ6.18	Test de alelismo
CMJ31	CMJ6.19	CCT5.23	Test de alelismo

Tabla M4: Cruces realizados y/o utilizados en este trabajo.

2.5. Condiciones de cultivo en invernadero y fitotrones.

Las plantas crecieron en tiestos con una mezcla con proporciones 2:1:1 de turba, perlita y vermiculita, respetivamente. Las condiciones de cultivo del invernadero fueron de 22°C, humedad ambiental del 55%, 14 h de luz y 10 h de oscuridad, aproximadamente.

En los fitotrones las plantas crecieron a 22°C, humedad ambiental del 55%, y las siguientes condiciones de luz:

- **SD** (Short Day, en inglés) 8 h de luz y 16 h de oscuridad.
- **LD** (Long Day, en inglés) 16 h de luz y 8h de oscuridad.

En todos los casos las plantas se regaron por inundación de las bandejas que contenían los tiestos 2-3 veces por semana, según las necesidades de las plantas. Una vez por semana el riego era con solución de fertirrigación.

Solución de fertirrigación: Solución de Hoagland y Arnon (Hoagland & Arnon 1938) modificada por Johnson y col., (Johnson et al. 1957): NO₃K 8,4 mM, NH₄NO₃ 1,2 mM, K₂HPO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, Ca(NO₃)₂·4H₂O 2,5 mM, MgSO₄·7H₂O 0,7 mM, SO₄Fe·7H₂O 0,6 mM. Esta solución se complementa con un quelante de hierro Kelamix 35 mg/L y con microelementos 0,4 g/L.

2.6. Condiciones de cultivo *in vitro*.

Las plántulas crecieron en luz continua o en ciclos de LD. Las condiciones de luz continua se detallarán más adelante en el apartado 4.3. En LD las condiciones de cultivo fueron 16h luz y 8h oscuridad a 22°C y humedad no controlada.

2.7. Medios de cultivo *in vitro*.

Se utilizó medio Murashige y Skoog (medio MS) el cultivo de plántulas en placas de Petri estériles. **Medio Murashige & Skoog (GM-0,5x pH 5.8):** medio con vitaminas 2,15 g/L, MES

0,25 g/L. Ajustar el pH con KOH, y por último se añade agar 8 g/L . Autoclavar 20 min.
Suplementos para los medios de cultivos de plantas: En algunos casos se añadieron antibióticos u otros compuestos de selección, tal como se describe en la **tabla M1** a partir de soluciones de *stocks*.

3. Plásmidos.

3.1. Vectores comerciales o cedidos.

Plásmido	Descripción	Resistencia en bacterias	Resistencia en planta
pCambia1302	Vector binario que permite clonar el gen de interés fusionado al gen reportero <i>-GFP</i> bajo el promotor constitutivo CaMV 35S.	Km ^R	Hyg ^R
pCambia2300	Vector binario que permite clonar el gen de interés bajo el promotor constitutivo CaMV 35S.	Km ^R	Hyg ^R
pCRII-TOPO	Vector utilizado para el clonaje de productos de PCR por el sistema <i>T/A cloning</i> .	Amp ^R , Km ^R	
pGI0029/35S/GR	Variante del vector pGreen que permite clonar un gen de interés fusionado al receptor de glucocorticoides (GR) bajo el promotor constitutivo CaMV 35S.	Km ^R	Hyg ^R
pENTR3C	Vector Gateway (GW), de entrada donde el gen de interés está flanqueado por attB1 y attB2.	Km ^R	
pDONR221	Vector GW, de entrada donde el gen de interés está flanqueado por attB1 y attB2.	Km ^R	
pDONR207	Vector GW de entrada donde el gen de interés está flanqueado por attB1 y attB2.	Gm ^R	
pYFN43	Vector GW que sobreexpresa constitutivamente el N-terminal de la proteína amarilla (YFP). Cedido por Dr. Alejandro Ferrando del IBMCP (Belda-Palazon et al. 2012).	Amp ^R	Hyg ^R
pYFC43	Vector GW que sobreexpresa constitutivamente el C-terminal de la proteína fluorescente amarilla fluorescente (YFP). Cedido por Dr. Alejandro Ferrando del IBMCP (Belda-Palazon et al. 2012)	Amp ^R	Hyg ^R
pGBKT-7	Vector GW utilizado para el clonaje del dominio de unión a DNA de GAL4 al gen de interés.	Km ^R	
pGADT-7	Vector GW utilizado para el clonaje con el dominio de activación GAL4 del gen de interés.	Amp ^R	
pVA3	Vector utilizado como control positivo en el Y2H. Contiene la proteína p53 fusionado al dominio de unión a DNA de GAL4.	Km ^R	
pTD1	Vector utilizado como control positivo en el Y2H. Contiene el N-terminal de la proteína SV40 fusionado al dominio de activación GAL4.	Amp ^R	

Tabla M5: Vectores comerciales utilizados en este trabajo.

3.2. Construcciones y transformaciones en planta.

Plásmido	Descripción	Vector	Inserto	Tipo de vector
pCS12	<i>ATHB4</i> (cDNA)	pCRII-TOPO	Amplificación de <i>ATHB4</i> por PCR con oligos (JO284+CSO7)	
pCS14	35S: term (OCS)	Derivado del vector pCambia1300 (incluye un promotor CaMV 35S y terminador de pBinAR (term OCS))	sin inserto	
pCS19	35S: <i>ATHB4-GR</i>	pCS14 (promotor CaMV 35S y el terminador de un pBinAR y fusionado a la GR)	<i>ATHB4</i>	Binario
pBJ3	35S: <i>ATHB4-GFP</i>	pCambia1302	<i>ATHB4</i> (proviene de dig. <i>SpeI</i> + <i>XbaI</i> a pCS12)	Binario
pR101	pNOB936 con promotor de SEEDSTICK	pNOB936 dig. <i>AatII</i>	sin inserto y sin promotor	
pMG15	35S:GR	pCS14 dig. <i>Sall</i> +Klenow+ <i>BamHI</i>	pGreen0029(35S:GR) dig. <i>EcoRI</i> +Klenow y <i>BamHI</i>	Binario
pMG42	$\Delta 50$ <i>ATHB4</i> (forma truncada de la región N-terminal de <i>ATHB4</i>)	pCRII-TOPO	Forma truncada de $\Delta 50$ <i>ATHB4</i> amplificación por PCR con MGO40+CSO7	
pMG59	N-terminal (Nt) de <i>ATHB4</i>	pCRII-TOPO	Forma truncada N-terminal de <i>ATHB4</i> amplificación por PCR con 2x35S+MGO51	
pMJ2	VP16	PCRII-TOPO	VP16 amplificado por PCR con los oligos: NCO1+MJO1 usando el plásmido pNC7 (Galstyan et al. 2011)*	
pMJ3	35S:VP16	pCS14 (35S:term (OCS)) dig. con <i>BamHI</i> + <i>Sall</i>	VP16 (proviene del pMJ2 dig. con <i>BamHI</i> + <i>Sall</i>)*	
pMJ4	35S:ATHB4-VP16	pMJ3 dig. con <i>KpnI</i> +Klenow+ <i>BamHI</i>	<i>ATHB4</i> (proviene de dig. pCS12 con <i>EcoR V</i> + <i>BamHI</i>)*	Binario
pMJ16	Nt-TPL (726 base pair (bp)-242 aminoacid (aa))	pDONR 207 (GW)	Amplificación de Nt-TPL por PCR con oligos MJO11+MJO13	
pMJ17	Nt-TPR4 (492bp- 164 aa)	pDONR 207 (GW)	Amplificación de Nt-TPR4 por PCR con oligos MJO14+MJO15	
pMJ21	Nt-TPL (726 bp-242 aa)	pGBKT-7 (GW)	pMJ16 (Nt-TPL en pDONR207)	
pMJ22	Nt-TPL (726 bp-242 aa)	pGADT-7 (GW)	pMJ16 (Nt-TPL en pDONR207)	
pMJ25	Nt-TPL (726 bp-242 aa)	pYFN43(GW)	pMJ16 (Nt-TPL en pDONR207)	
pMJ26	Nt-TPL (726 bp-242 aa)	pYFC43(GW)	pMJ16 (Nt-TPL en pDONR207)	
pMJ27	YFN -TPL (Full Length (FL))	pYFN43(GW)	PSW3 (TPL en un pENTR) Cedido por Dr. Stephen Wenkel	
pMJ28	YFC -TPL (FL)	pYFC43(GW)	PSW3 (TPL en un pENTR) Cedido por Dr. Stephen Wenkel	
pMJ29	<i>ATHB4</i> (cDNA)	pENTR3C (GW)	<i>ATHB4</i> (proviene de la dig. de pCS12)	
pMJ30	YFN- <i>ATHB4</i>	pYFN43(GW)	pMJ29 (<i>ATHB4</i> en pENTR3C)	
pMJ31	YFC- <i>ATHB4</i>	pYFC43(GW)	pMJ29 (<i>ATHB4</i> en pENTR3C)	
pMJ32	Nt- <i>ATHB4</i>	pENTR3C (GW)	Forma truncada Nt- <i>ATHB4</i> (pMG59) dig. con <i>EcoRI</i>	
pMJ33	<i>ATHB4</i>	pGADT-7 (GW)	pMJ29 (<i>ATHB4</i> en pENTR3C)	
pMJ34	<i>ATHB4</i>	pDONR207 (GW)	pMJ29 (<i>ATHB4</i> en pENTR3C)	
pMJ35	YFN- <i>ATHB4</i>	pYFN43(GW)	pMJ34(<i>ATHB4</i> en pDONR 207)	
pMJ36	YFC- <i>ATHB4</i>	pYFC43(GW)	pMJ34(<i>ATHB4</i> en pDONR 207)	
pMJ38	Nt- <i>ATHB4</i>	pGBKT-7 (GW)	pMJ32 (Nt- <i>ATHB4</i> en pENTR3C)	
pMJ39	Nt- <i>ATHB4</i>	pGADT-7 (GW)	pMJ32 (Nt- <i>ATHB4</i> en pENTR3C)	
pMJ40	Nt- <i>ATHB4</i>	pYFN43(GW)	pMJ32 (Nt- <i>ATHB4</i> en pENTR3C)	
pMJ41	Nt- <i>ATHB4</i>	pYFC43(GW)	pMJ32 (Nt- <i>ATHB4</i> en pENTR3C)	
pMJ42	Nt- <i>ATHB4</i>	pDONR207 (GW)	pMJ32 (Nt- <i>ATHB4</i> en pENTR3C)	
pMJ43	<i>ATHB4</i> _{E1m}	pDONR207 (GW)	<i>ATHB4</i> _{E1m} en pDONR 207*	
pMJ45	<i>ATHB4</i> _{E1+E2m}	pDONR207 (GW)	<i>ATHB4</i> _{E1m} en pDONR 207 *	
pMJ47	<i>ATHB4</i> _{E1m}	pGADT-7 (GW)	<i>ATHB4</i> _{E1m} en pDONR 207 *	
pMJ60	$\Delta 50$ <i>ATHB4</i> (pMG42)	pMS51 (pCambia1302 dig con <i>NcoI</i> + <i>SpeI</i>) fusión a la GFP	Forma truncada de $\Delta 50$ <i>ATHB4</i> (pMG42) amplificación por PCR con MGO40+CSO7	
pMJ62	$\Delta 30$ <i>ATHB4</i>	pCRII-TOPO	Forma truncada de $\Delta 30$ <i>ATHB4</i> amplificación por PCR con MJO43+CSO7	
pMJ63	$\Delta 30$ <i>ATHB4</i> (pMJ63)	pMS51 (dig. con <i>BglII</i>)	Inserto digerido con <i>BamHI</i>	

Plásmido	Descripción	Vector	INSERTO	Tipo de vector
pMJ65	<i>ChPHYA</i> (cDNA) en pCRII-TOPO con errores	pCRII-TOPO	*	
pMJ67	<i>ChPHYA</i> (cDNA) en pCRII-TOPO sin errores	pMJ65.6 dig. <i>XhoI/XbaI</i> +pMJ65.2 <i>XhoI/XbaI</i> + <i>AvrII</i>	pMJ65.2 dig. <i>XhoI/XbaI</i> *	
pMJ68	<i>ChPHYA</i> (gDNA) del <i>m10 (sis1-2)</i> con MBO1+CTO34			
pMJ69	<i>ChPHYA</i> (gDNA) del <i>m10 (sis1-2)</i> con MBO5+MBO10			
pMJ70	<i>pAtPHYA</i> (APAG8)		pBS SK+ *	
pMJ72	<i>ChPHYA</i> (cDNA)	pENTR3C	*	
pMJ74	<i>ChPHYA</i> (cDNA)	pENTR3C sin diana <i>XbaI</i> en la región attB	*	
pMJ77	<i>AtPHYA</i> (<i>pET-PHYA</i>)	pBS SK+ dig <i>BamHI</i> + <i>EcoRV</i>	<i>petPHYA</i> dig. con <i>NdeI</i> + <i>Klenow</i> + <i>BamHI</i> *	
pMJ78	<i>AtPHYA</i> (cDNA) in pENTR3C dig. <i>NotI</i> + <i>Sall</i>	pENTR3C dig. <i>NotI</i> + <i>Sall</i>	pMJ77 dig <i>NotI</i> + <i>Sall</i> *	
pMJ83	<i>ChPHYA</i> (cDNA) sin promotor	pDONR207 (GW)	pMJ74 (cDNA <i>ChPHYA</i>)*	
pMJ84	<i>pAtPHYA: ChPHYA</i>	pIR101 (GW)	*	Binario
pMJ85	<i>pAtPHYA: cccb</i>	pDONR221 (GW)	pMJ84(<i>pAtPHYA: ChPHYA</i>) *	
pMJ86	<i>pAtPHYA: AtPHYA</i>	pIR101 (GW)	*	Binario
pMJ89	<i>ATHB4_{E1+E2m}</i>	pGBKT-7 (GW)	pMJ45.33*	
pMJ90	<i>ATHB4_{E1+E2m}</i>	pGADT-7 (GW)	pMJ45.33*	
pMJ91	35S: <i>ATHB4_{E1+E2m}-GR</i>	pMG15 pCS14 con fusión a la GR dig. con <i>BamHI</i>	pMJ45.33*	Binario
pMJ92	35S: <i>ATHB4_{E1+E2m}-GFP</i>	pMS51 (dig con <i>BglII</i>)	pMJ45.33*	Binario
pMJ93	<i>SEU</i> (cDNA)	pGBKT-7 (GW)		
pMJ94	<i>SEU</i> (cDNA)	pGADT-7 (GW)		

Tabla M6: Plásmidos y transformaciones utilizadas en esta tesis. *(Ver descripción a continuación).

Generación de la construcción 35S: *ATHB4-VP16* (pMJ4).

Para generar la construcción de sobreexpresión de *ATHB4-VP16* se utilizó como molde un plásmido ya existente en nuestro laboratorio (pNC7) que contenía el cDNA del gen *PAR1* fusionado al dominio de activación *VP16* (Galstyan et al. 2011). La región del gen *VP16* se amplificó con los oligos NCO1 y MJO1 (ver tabla de oligonucleótidos), que incorpora un sitio de corte *Sall* en el extremo 3'. El producto de PCR se subclonó direccionalmente en un vector pCRII-TOPO para generar pMJ2 y posteriormente ser secuenciado. El inserto de pMJ2 se digirió con *BamHI* y *Sall*, y se subclonó en los mismos sitios de clonaje en el vector pCS14 (disponible en el laboratorio), dando lugar a pMJ3 (35S:-*VP16*).

El plásmido pCS14 es una modificación de un vector pCambia1300 digerido con *EcoRI* y *HindIII*, desfosforilado y ligado con un *cassette* que contiene el promotor CaMV 35S y un terminador que proviene del vector pBINAR (Galstyan et al. 2011). Para obtener el cDNA de *ATHB4* recurrimos al plásmido pCS12 (disponible en el lab), que deriva del vector pCRII-TOPO y que contiene el cDNA de *ATHB4*.

El inserto obtenido de la digestión pCS12 digerido con *EcoRV* y *BamHI* (*ATHB4*) se clonó en pMJ3 digerido primero con *KpnI* y *Klenow* (resultando en un extremo romo) y después con *BamHI*, que resultó en pMJ4 (35S:*ATHB4-VP16*), que se transformó en *A. tumefaciens* C58C1 (pGV2260) para transformar luego plantas de *A. thaliana* mediante inmersión floral. Las

plántulas transgénicas resultantes se seleccionaron en medios que contenían Hyg. Sólo se seleccionaron líneas con una única inserción de T-DNA, como se describe en (Roig-Villanova et al. 2006).

Mutagénesis de los motivos EAR y construcciones derivadas (pMJ43, PMJ45, pMJ89, pMJ90, pMJ91, pMJ92).

Los motivos EAR se mutagenizaron por PCR con oligonucleótidos que contenían cambios en las bases requeridas. Sustituimos las Leucinas de los **motivos EAR1** (L8, L10, L12) y **EAR2** (L24, L26 y L28) por Alaninas. Realizamos las mutagénesis de cada motivo por separado. La primera mutagénesis utilizó como DNA molde pMJ29, que contenía ATHB4 en el vector pENTR3C.

Para el motivo 1 se realizaron dos PCR: PCR 1; amplificando con un oligonucleótido directo WT (Wild Type) (MJO25) y el reverso mutado (MJO22). PCR 2; amplificando con un oligonucleótido directo mutado (MJO21) y el reverso WT (MJO26). Unificamos los productos de PCR y amplificamos con los oligonucleótidos MJO27+MJO28 (introducían sitios attB1 y attB2). Tras la purificación del producto de PCR y usando sistema de recombinación BP Clonasa II del sistema Gateway (Invitrogen) se introdujo en un vector pDONR207 (attP1<ccdB-Resistencia a Cm<attP2), resultando en el vector pMJ43.

Usando sistema de recombinación LR Clonasa II del sistema Gateway (Invitrogen), se recombinó pMJ43.1 con el vector de destino PGADT-7 (vector de expresión en levadura), dando pMJ47. El plásmido pMJ47 fue utilizado como DNA molde que contenía el motivo1 mutado y el motivo2 WT.

Para el motivo 2 se realizaron dos PCR: PCR 1; amplificando con un oligonucleótido directo WT (MJO25) y el reverso mutado (MJO24). PCR 2; amplificando con un oligonucleótido directo mutado (MJO23) y el reverso WT (MJO26). Unificamos los productos de PCR y amplificamos con los oligonucleótidos MJO27+MJO28 (introducían sitios attB1 y attB2). Tras la purificación del producto de PCR y usando sistema de recombinación BP Clonasa II del sistema Gateway (Invitrogen) se introdujo en un vector pDONR207 (attP1<ccdB-CmR<attP2), resultando en el vector pMJ45. Comprobamos mediante secuenciación que el plásmido pMJ45 sólo contenía los motivos EAR mutados. Usando el sistema de recombinación LR Clonasa II del sistema Gateway (Invitrogen), se recombinó con los vectores de destino para Y2H (pGADT-7 y pGBKT-7) que contiene sitios (attB1< ATHB4_{E1+E2m} <attB2) generando pMJ89 (BD- ATHB4_{E1+E2m}) y pMJ90 (AD- ATHB4_{E1+E2m}).

Para generar pMJ91 (35S:ATHB4_{E1+E2m}-GR) se digirieron los vectores pMJ45.33 y vector pMG15 (vector con promotor 35S y receptor de glucocorticoides GR) (Gallemi et al. 2017) con *Bam*HI. La ligación entre el vector pMG15 y el inserto que provenía de pMJ45.33 dió lugar a pMJ91 (35S:ATHB4_{E1+E2m}-GR), este plásmido presenta resistencia a Hyg. en plantas. El pMJ91 (plásmido binario) se introdujo en *A. tumefaciens* C58C1 (pGV2260) por electroporación y se seleccionaron colonias transformadas en medio YEB suplementado con los antibióticos Rf, Cb y Km con el objetivo de transformar plantas de *A. thaliana* mediante inmersión floral. Las plántulas transgénicas fueron seleccionadas en medio que contenía Hyg. (concentraciones descritas en el apartado 1.5). Sólo se seleccionaron líneas con una única inserción de T-DNA, tal como se describe en (Roig-Villanova et al. 2006).

Generamos pMJ92 (35S:ATHB4_{E1+E2m}-GFP) digiriendo pMJ45.33 con *Bam*HI y el vector pMS51 (vector pCambia1302 modificado con incorporación de dos dianas de clonaje *Sall* y *Spel*) digerido con *Bgl*III (vector con promotor 35S y la proteína GFP) (Gallemi et al. 2017). Se ligaron

el inserto pMJ45.33 digerido con *Bam*HI y el vector pMS51 digerido con *Bgl*II dando lugar a pMJ92 (*35S:ATHB4_{E1+E2m}-GFP*), un vector binario que se introdujo en *A. tumefaciens* GV3101 que utilizamos para agroinfiltrar plantas de *N. bethamiana* para experimentos de localización subcelular.

Construcción para las plantas RNAi-*ChPHYA* (pCT31) (generada por C. Then):

Para generar la construcción RNAi (supresión de la expresión de genes específicos mediante RNA de interferencia) para silenciar el *ChPHYA* se utilizó cDNA de *C. hirsuta* como molde para la PCR. Por PCR se amplificó un fragmento de 256 pb utilizando los oligonucleótidos específicos: CTO31 y CTO32 (ver tabla de oligonucleótidos). Esta región *ChPHYA*, correspondiente a los primeros 256 pb del cDNA, fue seleccionada porque mostró menos similitud con otros fitocromos. El producto de PCR se subclonó direccionalmente en pCRII-TOPO para generar pCT16. El fragmento pCT16 se secuenció para confirmar que no hubiera errores. Un fragmento de pCT16 digerido con *Eco*RI se subclonó en los mismos sitios del vector pENTR3C (Invitrogen), flanqueado por los sitios attL1 y attL2, para dar pCT18. Usando sistema de recombinación LR Clonasa II del sistema Gateway (Invitrogen) se recombinó con el vector de destino RNAi pB7GWIWG2 (I), que contiene sitios attR1 y attR2 y generó pCT31 (*35S: RNAi-*ChPHYA**), que confiere resistencia a ppt en plantas. Este vector binario se introdujo en *A. tumefaciens* C58C1 (pGV2260) por electroporación y se seleccionaron colonias transformadas en medio YEB suplementado con los antibióticos (concentraciones descritas en el apartado 1.5) Rf, Km y Spc. Las plantas de *C. hirsuta* (Ox) fueron transformadas mediante inmersión floral. Las plántulas transgénicas fueron seleccionadas en medios que contenían ppt (concentraciones descritas en el apartado 1.5).

Generación de las construcciones *pAtPHYA: AtPHYA* (pMJ86) y *pAtPHYA: ChPHYA* (pMJ84) para la complementación de plantas *A. thaliana phyA-501*.

Como fuente del promotor del gen *PHYA* de *A. thaliana* (*pAtPHYA*), se empleó el plásmido APAG (pAPAG, proporcionado por A. Nagatani, Universidad de Kyoto, Japón), que contiene 2,9 kb de la región promotora (Toledo-Ortiz et al. 2010). Se subclonó un fragmento *Xho*I-*Bam*HI de pAPAG en un vector pBS-SK+ digerido con las mismas enzimas, generando pMJ70, que permitía obtener un fragmento *Xba*I que cubre 2,0 Kbp del *pAtPHYA* (de ATG a -2.029).

Como fuente de *AtPHYA*, se empleó el vector *pET-PHYA* (proporcionado por P. Quail, UC-Berkeley, CA, EE.UU), que contiene el marco de lectura abierta (ORF, del inglés Open Reading Frame) completo de *AtPHYA* en un vector pENTR3C para expresión en *E. coli* (Somers et al. 1991). El vector se digirió primero con *Nhe*I (y con extremos romos con Klenow) y después con *Bam*HI. El fragmento flanqueado por *Nhe*I y *Bam*HI, que contiene toda la ORF de *AtPHYA*, se clonó luego en un vector pBS-SK+ digerido con *Eco*RV y *Bam*HI, generando pMJ77. Se subclonó un fragmento *Sal*I-*Not*I de pMJ77 en los mismos sitios de pENTR3C (attL1<ccdB<attL2, Invitrogen), generando pMJ78, que contiene *AtPHYA* flanqueado por sitios de recombinación Gateway (attL1<*AtPHYA*<attL2).

La secuencia codificante completa de *ChPHYA* se amplificó de cDNA de plántulas etioladas usando los oligos específico CTO31 y MBO9. El fragmento resultante se clonó en pCRII-TOPO para dar lugar a pMJ65. Después de la secuenciación de varias colonias independientes, nos centramos en pMJ65.2 (que no contenía errores silenciosos entre el ATG y un sitio único *Avr*II dentro de la secuencia de *ChPHYA*) y pMJ65.6 (que no contenía errores entre el único sitio

AvrII y el codón STOP). Obtuvimos un fragmento *Xba*I-AvrII de pMJ65.2 y se subclonó en los mismos sitios del vector pMJ65.6, generando el plásmido pMJ67, que contiene el ORF completo de *ChPHYA*. Se subclonó direccionalmente un fragmento *Eco*RI de pMJ67 en los mismos sitios de pENTR3C, generando pMJ72, que contiene *ChPHYA* flanqueado por sitios de recombinación (attL1<*ChPHYA*XbaI<attL2). pMJ72 fue digerido con *Xba*I, rellenado con Klenow y religado, para generar pMJ74 (attL1<*ChPHYA*<attL2), que eliminaba un sitio *Xba*I situado después del codón de parada pero antes del sitio attL2.

El vector binario de destino fue: pNOB936 (confiere resistencia a ppt en plantas) se digirió con *Aat*II (para liberar el promotor *SEEDSTICK*) y se volvió a ligar para generar pIR101. Usando el sistema Gateway LR Clonasa II (Invitrogen), recombinación *in vitro* entre pIR101 (attR1<ccdB<attR2) y pMJ74 (attL1<*ChPHYA*<attL2), que generó pMJ83 (attB1<*ChPHYA*<attB2). Un fragmento *Xba*I de pMJ70, que contenía *pAtPHYA*, se clonó direccionalmente en pMJ83 digerido con la misma enzima de restricción, produciendo pMJ84 (*pAtPHYA*: attB1<*ChPHYA*<attB2).

Usando el sistema Gateway BP Clonase II (Invitrogen), pMJ84 (*pAtPHYA*: attB1<*ChPHYA*<attB2) se recombinó con pDONR207 (attP1<ccdB-CmR<attP2) para generar pMJ85 (*pAtPHYA*: attR1<ccdB-CmR<attB2), que fueron recombinados por sistema Gateway LR clonasa II con pMJ78 (attL1<*AtPHYA*<attL2) para generar pMJ86 (*pAtPHYA*: attB1<*AtPHYA*<attB2).

Estos vectores binarios (pMJ84 y pMJ86) se introdujeron en *A. tumefaciens* C58C1 (pGV2260) por electroporación y se transformaron colonias transformadas (seleccionadas en medio YEB suplementado con los antibióticos (concentraciones descritas en el apartado 1.5) Rf, km y Spc. con el objetivo de transformar plantas de *A. thaliana phyA-501* por inmersión floral. Las plántulas transgénicas fueron seleccionadas en medios que contenían ppt.

3.3. Plásmidos cedidos por otros laboratorios.

Plásmido	Descripción	Vector	Cedido por
pSW1	<i>TPL (cDNA)</i>	pGADT-7 (GW)	Dr. Stephan Wenkel
pSW3	<i>TPL (cDNA)</i>	pENTR	
pBD4	<i>TPR4 (cDNA)</i>	pGBT9	Dr. Brendan Davis
pDS1	<i>pTPL:TPL-HA</i>	pCambia1300	Dr. David Somers
pIT1	<i>SAP18 (cDNA)</i>	pDONR207	Prof. Lucia Colombo
pIT2	<i>SAP18 (cDNA)</i>	pYFN43(GW)	
pIT3	<i>SAP18 (cDNA)</i>	pYFC43(GW)	
pIT4	<i>SAP18 (cDNA)</i>	pGADT-7 (GW)	
pIT5	<i>SAP18 (cDNA)</i>	pGBKT-7 (GW)	
pIT6	<i>SEU (cDNA)</i>	pDONR207	
pIT7	<i>SEU (cDNA)</i>	pYFN43(GW)	
pIT8	<i>SEU (cDNA)</i>	pYFC43(GW)	

Tabla M7: Plásmidos cedidos por otros laboratorios utilizados en esta tesis

3.4. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos que en la descripción tienen la abreviatura *Ch* pertenecen a *Cardamine hirsuta*.

Nombre	Secuencias de 5' a 3'	Gen	Uso
2x35S	CGTAAGACTGGCGAAC	promotor CaMV 35S	Genotipado
35S	CTTCGCAAGACCCCTCC	promotor CaMV 35S	Genotipado
LBb1	CGTGGACCGCTTGCTGCAACT	T-DNA "left border, LB"	Genotipado
Directo	GTAAACGACGCGCCAGT		Sec.
Revers	CAGGAAACAGCTATGAC		Sec.
BO33	GCGGTCTATGTAGGAGAGAATGATC	SAUR15 (FW)	RT-qPCR
BO34	CCGGCACCACATATCTCTTCTT	SAUR15 (Rev)	RT-qPCR
BO40	AAATCTCGTCTCTGTTATGCTTAAGAAG	UBQ10 (FW)	RT-qPCR
BO41	TTTTACATGAAACGAAACATGAACTT	UBQ10 (Rev)	RT-qPCR
BO68	AGAAGTGAGAGAGAAGAAATCTCCG	HAT2 (FW)	RT-qPCR
BO69	TCATCTGAGGTTCCACGTGAGTA	HAT2 (Rev)	RT-qPCR
BO70	GGATCTAGAATGGGCGAGCTCCAGAAGCTCG	GR (FW)	Genotipado
BO71	CCTACTAGTTTTTGTATGAAACAGAAGCTTTTTG	GR (Rev)	Genotipado
BO87	GGAAGCAAACCCTTAGCATCAT	PIL1 (FW)	RT-qPCR
BO88	TCCATATAATCTTCATCTTTTAATTTGGTTTA	PIL1 (Rev)	RT-qPCR
BO95	TGGTGTCAAGCAGATGATTTGC	EF1a (FW)	RT-qPCR
BO96	ATGAAGACACCTCCTTGATGATTTTC	EF1a (Rev)	RT-qPCR
CTO9	GGCCGATTGTGCTGTCCTTA	EF1a (FW)	RT-qPCR
CTO10	TCACGGGTCTGACCATCCTTA	EF1a (Rev)	RT-qPCR
CTO19	TCCCATCTTTTCTCCATTGGA	PIL1 (FW)	RT-qPCR
CTO20	GATGGCACCACGAATTGCT	PIL1 (Rev)	RT-qPCR
CTO31	ATGTCGGGTCTAGCCGAG	ChPHYA (FW)	Genotipado
CTO34	TTCTGGCCAGTAAGATCATGTGC	ChPHYA (Rev)	Genotipado
CTO39	AGCCACCCACTACTTTGACC	ATHB2 (FW)	RT-qPCR
CTO40	CGTGGCAGCTTGATTTGGT	ATHB2 (Rev)	RT-qPCR
MBO1	TGTTCATAAGATTACGGCATG	ChPHYA (FW)	Genotipado
MBO2	TCTGCAAAGCCCTTTTATGC	ChPHYA (FW)	Genotipado
MBO3	TACATGGCCAACATGGATTTC	ChPHYA (FW)	Genotipado
MBO4	GGGTTTCCTAAGGCTTAGG	ChPHYA (FW)	Genotipado
MBO5	ATCGGGAAGCATCTCCTCAC	ChPHYA (FW)	Genotipado
MBO6	GTGCTGTGACCAGTCAGGAG	ChPHYA (FW)	Genotipado
MBO7	ATGAGACCGGAGAAGAAGTC	ChPHYA (FW)	Genotipado
MBO8	GAGAAACCAGTGAACCACTG	ChPHYA (Rev)	Genotipado
MBO9	CATCCATATTTACAGCTCCAG	ChPHYA (Rev)	Genotipado
MBO10	GAGGACTACTTGTTCGCTGC	ChPHYA (Rev)	Genotipado
MBO11	GGACCTTGCTGAGTTGCTTC	ChPHYA (Rev)	Genotipado
MBO12	TGGATTCCACTCCGTACACC	ChPHYA (Rev)	Genotipado
MBO13	TCACTGTGTACAGCTTCTAG	ChPHYA (Rev)	Genotipado
MBO14	CATCACATTTACACAGGTCC	ChPHYA (Rev)	Genotipado
MBO15	CTGCTTGAGGGATGTCGGTG	ChPHYA (Rev)	Genotipado
MGO26	GGAGGTAGACTGCGAGTTCTTACG	ATHB2 (FW)	RT-qPCR
MGO27	TGCATGTAGAACTGAGGAGAGAGC	ATHB2 (Rev)	RT-qPCR
MGO28	AGAAGTGTCCGAGCTGAGGG	ATHB4 (FW)	RT-qPCR
MGO29	AGACACGTTCCGAAGAAGGG	ATHB4 (Rev)	RT-qPCR
MGO30	GCCACAACATCGAAGACG	GFP (FW)	RT-qPCR
MGO31	CCATGCCATGTGTAATCC	GFP (Rev)	RT-qPCR
MGO42	TTCAGCAAGCCACTGCAGG	GR (FW)	RT-qPCR
MGO43	GCTGTGGTAATGCTGCAGGAA	GR (Rev)	RT-qPCR
MGO48	TCCCTTCCATTTCCGCAAT	OPT1 (FW)	RT-qPCR
MGO49	TGAGCCGAGAACCACAATC	OPT1 (Rev)	RT-qPCR
NCO1	CCGGATCCTACCCATACGACGTTCCGG	VP16 con BamHI en 5' (FW)	clonaje
JO284	AGGACAATGGGGAAAGAGAT	N-terminal de ATHB4 (FW)	clonaje
RO64	CGCTTGATGACTGGTGATG	Final del promotor de AtPHYA (FW)	PCR
RO65	CTCCGGAGAAGATCGAATCGAC	Principio del promotor de AtPHYA (Rev)	PCR
RO66	AGCCCGATGACAGCGACCACG	BASTA (FW)	PCR

Nombre	Secuencia	Gen	Uso
MJ07	CCATAAATAGCCCCACG	SALK-TPR4 (FW)	Genotipado
MJ08	CATCCCATTACCAGCTG	SALK-TPR4 (Rev)	Genotipado
MJ09	ACCTTGAGGTCTCGTACC	SALK-TPL (FW)	Genotipado
MJ010	TCCCATCAAGAGCTGTTG	SALK-TPL (Rev)	Genotipado
MJ011	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGCTTCTCTTAG TAGAGAGCTC	TPL (FW)	Clonaje-GW
MJ012	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGCTGGATTGGCCTTGG ATTTTTAC	TPL (Rev)	Clonaje-GW
MJ013	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGCTGGTTGAAATGG CCCGTG	TPL (Rev)	Clonaje-GW
MJ014	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGCTCACTCAG CAGAGAACTC	TPR4(FW)	Clonaje-GW
MJ015	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGCTGGAAATGAAGTTT GTCTCG	TPR4 (Rev)	Clonaje-GW
MJ016	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGCTGGTTGAAATGG ACCGTG	TPR4 (Rev)	Clonaje-GW
MJ021	GGGGCGGGTGCAGTGCAGCTTGGGAAATAGTCAAC	Mutagénesis EAR1 (FW)	Clonaje-GW
MJ022	GCTTGCCTCGCACCCGCCCATCACTCTTTCCCC	Mutagénesis EAR1 (Rev)	Clonaje-GW
MJ023	TCTGCGAGGGCGAATGCGATGCGTTGACAACCTTC	Mutagénesis EAR2 (FW)	Clonaje-GW
MJ024	CATCGCATTCGCCCTCGCAGATGGTTCCTTTTGTGTTG	Mutagénesis EAR2 (Rev)	Clonaje-GW
MJ025	GACTGATAGTGACCTGTTTCG	AttL1 (FW)	Clonaje-GW
MJ026	GACTGATAGTGACCTGTTTCG	AttL2 (Rev)	Clonaje-GW
MJ027	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT	AttB1(FW)	Clonaje-GW
MJ028	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	AttB2(Rev)	Clonaje-GW
MJ043	CGATGTTGACAACCTCTTCTTC	30Δnt-ATHB4 (FW)	clonaje
MJ044	TCATCCAAAACCCAAATC	ChPHYA-Wild Type(WT) (FW)	Clonaje/Sec
MJ045	AGCAGAGACGGATTTTGC	ChPHYA-WT (FW)	Clonaje/Sec
MJ046	AGCAGAGACGGATTTTGT	ChPHYA-mut181(sisl- 1)(FW)	Clonaje/Sec
MJ047	CATTACTGCATTCTGAGTGAG	ChPHYA-WT (Rev)	Clonaje/Sec
MJ048	CAGGAATCCGCTGTCCGG	ChPHYA-mut10 (sisl-2) (FW)	Clonaje/Sec
MJ049	CAGGAATCCGCTGTCCGA	ChPHYA-WT (FW)	Clonaje/Sec
MJ050	CCTGGTAAACATGATCC	ChPHYA-WT (Rev)	Clonaje/Sec
MJ051	CCTGGTAAACATGATCT	ChPHYA-mut10 (sisl-2) (Rev)	Clonaje/Sec
MJ052	TCTCCTCACACTTGTGAGGATTC	ChPHYA (FW)	RT-qPCR
MJ053	TCCTCGGTTCCCTCTAATGCA	ChPHYA (Rev)	RT-qPCR
MJ054	GCTAATGTTGACGCTTCCTTGA	ChPHYA (FW)	RT-qPCR
MJ055	cggtatcggttagcctgatttc	ChPHYA (Rev)	RT-qPCR
MJ056	TCTAGATAAGATTCCAGAAATG	pChPHYA (FW)	Clonaje
MJ057	TCTAGATTTTTTCTGACACCAG	pChPHYA (Rev)	Clonaje
MJ058	AAGATCTGATCATGCCCTTCTTGA	AtPHYA (FW)	RT-qPCR
MJ059	GGCCTAGAGCTGACATTTTT	AtPHYA (Rev)	RT-qPCR
MJ060	GGTGGCTATAATGTGAGAGAG	GABI-KAT-sap18 (FW)	Genotipado
MJ061	CAAACGGAAGTTCGGAAGCG	GABI-KAT-sap18 (Rev)	Genotipado
MJ064	TTCGAATGTTTCGGCTAACC	seu-3 mutant (FW)	Genotipado
MJ065	TTCGAATGTTTCGGCTAACT	seu-3 mutant (FW)	Genotipado
MJ066	GGGCCAAATTTCTCATGGCC	seu-3 mutant (Rev)	Genotipado
MJ069	CGCTTCTTTGGGTGGTCTA	RT-qPCR-VP16 (FW)	RT-qPCR
MJ070	ATAGGGATAGCCGCATAGT	RT-qPCR-VP16(Rev)	RT-qPCR
MJ071	CGATCGTGAAAAGACATG	sap18 (FW)	RT-qPCR
MJ072	CAAATCTGTTAGCTCGCG	sap18 (Rev)	RT-qPCR
MJ073	GTTGGGGAGACGATGGC	sap18 (FW)	RT-qPCR
MJ074	GCCACATCCAGATAATC	sap18 (Rev)	RT-qPCR
MJ075	TCCGATAACAAATGAGAC	ChPHYA and AtPHYA (SEC. COMPATIDA) (FW)	RT-qPCR
MJ076	CGGATGGTGTAAAGTTTA	ChPHYA and AtPHYA (SEC. COMPATIDA) (Rev)	RT-qPCR

Tabla M8. Oligonucleótidos utilizados en esta tesis.

4. Metodología.

4.1. Técnicas de biología molecular de ácidos nucleicos.

4.1.1. Obtención de DNA plasmídico.

En este trabajo se utilizaron dos métodos de extracción de DNA plasmídico dependiendo del grado de pureza deseado: A) *Miniprep* por lisis alcalina (utilizado para comprobar pasos intermedios de clonajes mediante digestión o para PCR) y B) *Miniprep* de DNA plasmídico con kit comercial.

A) *Miniprep* de DNA por lisis alcalina de cultivos bacterianos líquidos. Este método está basado en el descrito por (Sambrook & Russell 2001).

1. Transferir el cultivo líquido que ha estado en agitación O/N a un tubo de 1,5 mL. Centrifugar 2 min a 13000 rpm. Retirar el sobrenadante. Añadir el volumen restante de cultivo y repetir.
2. Agregar 150 µL de tampón P1. Resuspender el sedimento de las bacterias con ayuda del vórtex.
3. Agregar 150 µL de tampón P2. Agitar suavemente el tubo por inversión unas 4-5 veces. Incubar < 5 min a Tª ambiente (RT).
4. Agregar 150 µL de tampón P3 y mezclar inmediatamente 4-5 veces por inversión. Dejar reposar 15-20 min en hielo. Centrifugar a velocidad máxima.
5. Pasar el sobrenadante en un nuevo tubo de 1,5 mL, agregar 900 µL de 100% (v/v) etanol. Incubar 2 min a RT Centrifugar 10 min a velocidad máxima.
6. Descartar el sobrenadante y agregar al sedimento 700 µL de 70% (v/v) etanol. Centrifugar 5 min a velocidad máxima.
7. Descartar el etanol. Dejar secar el sedimento de DNA al aire durante 10 min o hasta que se evapore todo el etanol.
8. Resuspender el pellet en 50 µL de 1xTE o agua. Guardar a -20°C.

Soluciones:

Tampón P1 (conservar a 4°C): 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA, 100µg/ml RNAsa.

Tampón P2 (conservar a RT): 200 mM NaOH, 1%(p/v) SDS.

Tampón P3 (conservar a 4°C): 3M NAc, acetato sódico, (pH 5,5. Ajustar el pH con ácido acético).

Tampón 1xTE pH 7,4: 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA.

B) *Miniprep* de DNA plasmídico con kit comercial. Método utilizado para obtener DNA de alta calidad para secuenciar. Se realizó con el Kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen®, siguiendo el procedimiento del fabricante.

4.1.2. Reacciones de modificación del DNA.

Para las reacciones de modificación del DNA realizadas, como digestiones de fragmentos de DNA con enzimas de digestión, ligaciones, desfosforilación de extremos de DNA, etc. se

han utilizado enzimas de digestión de DNA y ligasas, siguiendo los protocolos estándar y las condiciones aconsejadas por el fabricante en cada caso. Es por este motivo por el que en este trabajo sólo se detallan las de mayor importancia, o bien, si el protocolo que se ha seguido supone una modificación del original.

4.1.3. Subclonaje de fragmentos de DNA en vectores con el método GATEWAY®.

Reacción BP/LR clonasa (siguiendo recomendaciones del fabricante):

1. Mezclar en un tubo: **X** μL Vector de entrada (~ 100 ng/ μL), **Y** μL Vector de destino (~ 100 ng/ μL) y 5,5 μL tampón TE pH=8, 2 μL BP ó LR clonasa.
2. Incubar a 25°C durante 1 h.
3. Añadir 1 μL de solución de proteinasa K. Incubar a 37°C durante 10 min.
4. Almacenaje a -20°C hasta el uso.

4.1.4. Transformación de células competentes de *E. coli* por choque térmico.

La transformación de células de *E. coli* se utiliza para amplificar el DNA plasmídico. Se emplearon células competentes previamente preparadas y almacenadas a -80°C. Se transformaron per choque térmico según el siguiente protocolo:

1. Descongelar en hielo el tubo que contiene una alícuota de 50 μL células competentes.
2. Agregar **X** μL de la ligación o producto de la reacción LR clonasa ó de plásmido. Incubar en hielo (30 min).
3. Realizar un choque térmico de 90 seg-2 min a 42°C. Inmediatamente después pasar a hielo durante 1 min.
4. Agregar 900 μL de LB líquido e incubar durante 60 min a 37°C.
5. Centrifugar 2 min a 13000 rpm. Eliminar 800 μL de sobrenadante.
6. Resuspender las células y sembrar en 2 placas de LB sólido con el antibiótico de selección adecuado.
7. Incubar las placas a 37°C durante 16-18 h.

4.1.5. Transformación de células competentes de *A. tumefaciens* por electroporación.

Se emplearon células competentes previamente preparadas y almacenadas a -80°C. La transformación de células de *A. tumefaciens* se realiza con plásmidos binarios, que después se introducen en las plantas mediante transformación *floral dip* (ver apartado 4.3.2).

1. Descongelar una alícuota (50 μL) de células electrocompetentes en hielo. Agregar 0,5 μL del plásmido (dilución 1:10 en agua de la *miniprep*). Agitar suavemente e incubar 5 min. en hielo.
2. Esterilizar previamente las cubetas de electroporación con etanol. Enfriarlas y agregar la mezcla de células y DNA.

3. Electroporar a 1,7 kV. Inmediatamente, transferir las células a tubo con 1 mL de medio de cultivo YEB fresco (sin antibióticos). Incubar las células a 28°C durante 1-2 h para recuperarlas de la electroporación.
4. Plaquear diferentes volúmenes en medio YEB con antibióticos selectivos añadidos (Rif, Spc, Cb). Volumen de plaqueo 50 µL y 200 µL.
5. Incubar las placas a 28°C durante 2-3 días hasta la aparición de colonias.

4.1.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación de fragmentos de DNA se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*; PCR) (Saiki et al. 1989) utilizando oligonucleótidos específicos y DNA codificante (cDNA), genómico (gDNA) o DNA de colonias como molde. Para la amplificación de fragmentos de DNA por PCR se utilizaron dos tipos de enzimas de DNA polimerasa termoestable; una no comercial, utilizada para la comprobación de clonajes y colonias, y una comercial para clonajes y mutagénesis. La enzima comercial utilizada fue la *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity*, que se caracteriza por tener una baja tasa de error. Estas enzimas disponen de sus propias soluciones y se emplearon siguiendo las indicaciones del fabricante. Las secuencias de los oligonucleótidos se detallan en el apartado 3.4.

Condiciones y método de PCR: En cada ciclo de PCR hay tres etapas que necesitan temperaturas diferentes: Desnaturalización del DNA, hibridación de los oligonucleótidos a las secuencias complementarias de DNA y síntesis de las cadenas de DNA complementarias en dirección 5' a 3'. Se prepara una mezcla de reacción con los siguientes componentes (concentración final de la reacción) : tampón PCR 1x, dNTPs 0,2mM, oligonucleótidos directo y reverso 0,5 µM (cada uno), 3-5U de *Taq polimerasa* y agua miliQ hasta un volumen final de 25µL. El programa utilizado consta de una etapa de desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, una etapa de amplificación de 30 ciclos que consta de i) desnaturalización de 30 seg a 94°C, ii) hibridación de 30 seg (temperatura específica de cada pareja de cebadores), y ii) extensión a 72°C (el tiempo dependiendo del tamaño a amplificar). Finalmente, se programa una etapa de extensión final de 3 min a 72°C.

Una vez finalizada la reacción, analizar los productos de PCR mediante electroforesis de DNA en gel de agarosa.

4.1.7. Separación de DNA en geles de agarosa.

Los productos de PCR o los fragmentos de DNA procedentes de las digestiones que se utilizaron se separaron en geles de agarosa/TBE 1% (p/v) con el colorante de ácidos nucleicos GelRed de BIOTIUM (1:10000) o Bromuro de Etidio, en TBE 1x, incluyendo en todos los casos un marcador de peso molecular para conocer el tamaño de banda.

Soluciones para la electroforesis de DNA:

Tampón de carga 6X: 30% (v/v) glicerol, 0,25% (p/v) xilencianol FF, 0,25% (p/v) azul de bromofenol, 0,5 M EDTA pH 8,0.

Tampón 10x TBE: 0,089 M-Tris base, 0,089 M ácido bórico, 20 mM EDTA pH 8,0.

4.1.8. Purificación de DNA.

Los fragmentos de DNA, tanto lo que provienen de geles de agarosa como los productos de PCR de interés se purificaron con el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* de Qiagen® siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.1.9. Secuenciación de DNA.

La determinación de las secuencias de DNA (obtenido según apartado 4.1.1B) fue realizado por el Servicio de Secuenciación del CRAG mediante secuenciación automática utilizando el sistema *Applied Biosystems* de Pharmacia (*Automated Laser Fluorecence*). Este sistema se basa en el método del *dye terminator*. Las lecturas varían de 500 a 800 pares de bases (base pair, bp). Las secuencias fueron procesadas informáticamente mediante el uso de programas gratuitos disponibles en Internet, como *Serial cloner*, *Bioedit*, *ClustalW*, *BLAST* de *INCB*, *Fasta*, *Genedoc* y con *NTI vector* (Invitrogen).

4.1.10. Extracción de RNA en planta.

La extracción de RNA de plantas se realizó con el método semiautomático *Maxwell Simply RNA* de Promega, basado en la purificación de RNA mediante *beads* magnéticas. En el caso de las plántulas de *A. thaliana* y *C. hirsuta* se emplearon aprox. 30 plántulas (~100mg), o en los experimentos de hojas, 5 hojas en día 30 de desarrollo. Se congelaron con nitrógeno líquido y posteriormente, trituradas con *Tissue-Lyser* de Qiagen, se añadieron dos perlas de vidrio (4mm, casa comercial Merck) en un tubo de 2 mL con la muestra, manteniendo en nitrógeno líquido y removiendo dos veces 1 min con una frecuencia de 30 s⁻¹.

4.1.11. Cuantificación de ácidos nucleicos.

El DNA o RNA presente en las muestras se cuantificó mediante *NanoDrop 1000* de *ThermoScientific* a 260 nm. Un valor de DO=1 corresponde aproximadamente a 50 µg/mL de DNA y a 40 µg/mL de RNA. La pureza de los ácidos nucleicos nos la proporciona el *software* del *nanodrop*, a través del cálculo de la relación 260/280 (nm). En las cuantificaciones de RNA el valor ideal es 2, en el caso del DNA el valor ideal es 1.8.

4.1.12. Retrotranscripción.

Esta técnica se ha empleado para amplificar la primera cadena de cDNA a partir del RNA total, utilizando como cebador un oligo (dT) proporcionado en el *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche) y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante partiendo de 1 µg de RNA purificado en volumen final de 10 µL (como se ha descrito anteriormente).

4.1.13. PCR Cuantitativa (*Real-time quantitative PCR*, RT-qPCR).

La RT-qPCR se llevó a cabo utilizando una dilución 1:10 en ddH₂O del cDNA obtenido anteriormente. Además de las tres réplicas biológicas por tratamiento, cada muestra se analizó realizando 2-3 réplicas técnicas con el objetivo de minimizar errores en el pipeteo. Cada reacción contiene 2 µL de cDNA diluido (15-25 ng/µL), 5 µL *Light Cycler*® 480 SYBR Green I

Master Mix, 0,3 µL del oligonucleótido directo (10 mM; concentración final de 300 nM), 0,3 µL del cebador reverso (10 mM; concentración final de 300 nM) y 2,4 µL de H₂O. Los oligonucleótidos específicos empleados aparecen descritos en la Tabla M8 (apartado 3.4). La reacción se llevó a cabo en un *Roche Light Cycler® 480*, siguiendo un programa basado en una desnaturalización inicial a 3 min. a 94°C y 40 ciclos de desnaturalización a 30 seg a 94°C durante 30 seg, e hibridación y extensión 30 seg 60°C. Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software *Light Cycler® 480 1.5.0-SP3* y se exportaron al programa Microsoft® Office Excel 2003. Los cálculos de expresión relativa se realizaron tomando los valores medios de las réplicas técnicas y, posteriormente, las medias obtenidas de las tres réplicas biológicas, normalizándolas con los valores obtenidos en cada muestra para un gen constitutivo de referencia.

4.2. Técnicas de biología molecular de proteínas.

4.2.1. Obtención de extractos totales proteicos.

Para realizar la extracción total de proteína en condiciones desnaturalizantes se utilizaron ~60-100 plántulas (según el experimento) y se conservaron en nitrógeno líquido.

1. Mezclar las plántulas/material vegetal congelado con el EB en una proporción 1:1 p/v (1mg de peso fresco en 1 µl de EB) a RT hasta obtener una mezcla homogénea.
2. Pasar el material a tubos *ependorf®* y centrifugar a 14000g 3 min a RT.
3. Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo y medir la concentración del sobrenadante usando el kit de Pierce *BCA Protein Assay*, para todas las muestras (siguiendo las instrucciones del fabricante) y realizar una recta patrón con concentraciones conocidas de BSA.
4. Preparar alícuotas de 1 µg de proteína total añadiendo tampón de muestra 1×SDS-PAGE.

Solución de extracción (EB): 40 mM Tris-HCL pH 6,8; 4% p/v of SDS, 5% glicerol e inhibidores de proteasas (siguiendo las indicaciones del fabricante, Sigma).

Para realizar la extracción total de proteína en condiciones nativas se utilizó el mismo protocolo pero con la siguiente solución de extracción:

Solución de extracción en condiciones nativas (EB nativas): (Recomendado en el kit de inmunoprecipitación)

0,5% Igepal CA630, 150 mM NaCl, 10 mM TRIS pH 7,5, 0.5 EDTA, 2.5mM MgCl₂, DNAsa 1µg/µL y cocktail de inhibidores de proteasas (*Proteases Inhibitor Cocktail; PIC*) según recomendaciones del fabricante (Roche).

Tras extraer las proteínas se añade el tampón de carga TM para que estén las muestras a 1x y se mantienen durante 3 min a 95°C. tras esto las muestras se pueden conservar congeladas a -80°C.

Tampón de carga 2x TM: Tris 125 mM pH 6,8; bromofenol 0,04%; SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v). Justo antes de usar añadir β-mercaptoetanol 10%.

4.2.2. Separación electroforética de las proteínas.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida o SDS-PAGE (del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Las proteínas migran en el gel como consecuencia del campo eléctrico aplicado. En función de su tamaño, las distintas proteínas migran con mayor o menor velocidad. El gel de electroforesis está compuesto por dos geles de distintos porcentajes de acrilamida, el gel separador (% variable en función del tamaño de las proteínas que se separan, suele oscilar entre el 10-15%) y el gel empaquetador al 4%.

Procedimiento para la preparación de geles de proteínas:

1. Ensamblar el sistema de preparación del gel (*Mini-Protean*[®], Bio Rad) proporcionado por el fabricante.
2. Preparar la solución del gel separador y verter 8 mL entre los cristales.
3. Añadir 200 μ L de isopropanol para crear un frente horizontal y prevenir del contacto con el oxígeno que actúa impidiendo la polimerización.
4. Dejar polimerizar el gel durante 30 min. (El tiempo dependerá de diversos factores).
5. Preparar la solución del gel empaquetador y verterla sobre el gel separador hasta el extremo superior.
6. Encajar un peine que nos proporcionará la forma de los pocillos donde se cargará la muestra.
7. Dejar polimerizar durante 30 min.
8. Tras la polimerización, cargar las muestras junto a un marcador molecular.
9. Aplicar un amperaje constante de 20 mA por gel durante 1:30-2:00h a RT.

4.2.3. Transferencia de proteínas e inmunodetección.

A partir del gel SDS-PAGE se realiza la transferencia de las proteínas a membranas de PVDF. Estas membranas se activan durante 30 seg. en metanol 100 %, permitiendo que las proteínas se unan a la membrana.

Para la transferencia se utiliza un *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* de BioRad siguiendo las indicaciones del fabricante para realizar una transferencia húmeda con las siguientes condiciones: 1 h a 4°C con un voltaje fijado a 100V.

Tampón de transferencia (a 4°C) : 6,07g Tris Base, 28,83g glicina, 200 mL de metanol (10%) i 1800 mL de H₂O.

Immunodetección quimioluminiscente:

La detección de las proteínas se realiza por quimioluminiscencia utilizando anticuerpo específicos contra el proteína de fusión o la proteína a detectar y un anticuerpo secundario conjugado con una peroxidasa que rompe el reactivo quimioluminiscente ECL (Amersham).

Procedimiento:

1. Bloquear con tampón TBST 1X + 2% (p/v) de leche en polvo durante 1h a RT en agitación.
2. Retirar el bloqueo y añadir el anticuerpo primario en tampón TBST 1X con 0,5 % de leche en polvo. Incubar con el anticuerpo primario durante la noche a 4°C en agitación.
3. Lavar las membranas 3 veces durante 15 min. con la solución de TBST con 0,5 % de leche en polvo a RT en agitación.
4. Incubar 30 min. con el anticuerpo secundario (anti-cuerpo primario) en tampón TBST 1X 0,5 % de leche en polvo a RT en agitación.
5. Lavar las membranas 3 veces durante 15 min. con la solución de TBST con 0,5 % de leche en polvo a RT en agitación.
6. Tras el último lavado, preparar el reactivo comercial ECL Plus (Amersham) mezclando el reactivo A con el B (siguiendo las indicaciones del fabricante), dejándolo atemperar durante 5 min. protegido de la luz.
7. Eliminar el exceso de reactivo con papel de filtro y eliminar las posibles burbujas.
8. Para la detección y tratamiento de la señal quimioluminiscente generada se utilizaron los sistemas LAS4000[®] de Fujifilm o en el caso de los western realizados en el grupo del Dr. Graf se revelaron con sistema "X-ray Film" (Amersham).

Soluciones:

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

4.2.4. Inmunoprecipitación de proteínas.

Para realizar la inmunoprecipitación se utilizaron plántulas crecidas durante 7 días en LD y mantenidas en oscuridad durante 6h. Las plántulas se congelan en N₂ líquido y se trituran en un mortero hasta obtener un material homogéneo, siempre manteniendo las condiciones de frío para evitar la degradación. Para la extracción se utiliza la solución de extracción en condiciones nativas (anteriormente descrita).

Inmunoprecipitación:

Este ensayo consiste en aislar complejos formados por la proteína objeto de estudio y sus interactores en un extracto proteico total con ayuda del anticuerpo soportado en las columnas μ Columns (μ Macs). Una vez realizada la inmunoprecipitación, se eluyen las proteínas capturadas por el anticuerpo y se separan por electroforesis. Posteriormente, mediante digestión con tripsina, se separan.

Para la inmunoprecipitación utilizamos *beads*[®] magnéticas (μ Macs[™]) que contienen anticuerpo α -GFP. Se siguieron las recomendaciones y las soluciones del fabricante. A continuación, se presenta el protocolo que modificamos levemente.

1. Incubar el material vegetal mínimo 1 hora a 4°C en agitación.
2. Colocar las columnas en un separador imantado (*μ Macs Separator*).
3. Calibrar las columnas (con los reactivos y metodología que recomienda el fabricante).

4. A 4°C, pasar la extracción de proteína total.
5. Eliminar el material no unido con un lavado astringente.
6. Eluir el complejo de interés (la proteína de interés con los putativos interactores), siguiendo las indicaciones del fabricante (manteniendo las *beads* en la columna.) Tras la inmunoprecipitación se recomienda realizar un inmunoblot con un pequeño volumen del material inmunoprecipitado para comprobar si el proceso ha ido bien.

Preparación de los péptidos para LC-MS/MS

Día 1: Filtrado de la muestra proteica (*Filter Aided Sample Preparation; FASP*)

Tras tener el material inmunoprecipitado.

1. Mezclar la proteína inmunoprecipitada con la solución UA (100 µg de proteína:100 µL de solución UA) y cargarlo el extracto proteico en una columna de filtrado (Amicon Ultra-0.5 mL Filtros de centrifuga).
2. Centrifugar a 10000g, RT, durante 10 min.
3. Añadir 100 µL de solución UA al filtro y centrifugar a 10000g durante 40 min.
4. Descartar el volumen eluido del tubo colector.
5. Añadir 50 µL de 10 mM DTT a la solución de UA, centrifugar a 14000g durante 30 min.
6. Descartar el volumen eluido del tubo colector.
7. Añadir 50 µL de IAA en solución UA.
8. Agitar a 600 rpm en un "Thermo-Mixer" durante 1 min. e incubar sin agitación durante 5 min.
9. Centrifugar a 14000g durante 30 min y descartar el volumen eluido del tubo colector.
10. Añadir 100 µL de UA.
11. Centrifugar a 14000g durante 30 min y descartar el volumen eluido del tubo colector.
12. Transferir el filtro a un nuevo tubo colector.
13. Digerir con Tripsina (proporción 1:25, Buffer de Tripsina: proteína en el filtro). Incubar durante 14-18h a 37°C. (Volumen Final, VF=100 µL)

Día2 (Tras la digestión):

14. Centrifugar a 14000g durante 40 min.
15. Añadir 50 µL de 0,5M NaCl.
16. Centrifugar a 14000g durante 20 min.
17. Añadir 10% (respecto al volumen) de TFA para tener una concentración final de 1% en la elución.

Purificación de los péptidos con columnas Sep-Pack®

18. Humedecer las columnas con 1mL de metanol 100%.
19. Posteriormente, humedecer las columnas con 1mL de 80% acetonitrilo y 0,1% de TFA en agua.
20. Equilibrar las columnas con 1mL de 0,1% TFA en agua (repetir 2 veces).
21. Añadir a la muestra 0,1% de TFA en agua. Comprobar el pH. Para que los péptidos se unan a la columna la solución tendría que tener: pH <3. Si es superior, añadir 1% de TFA.

22. Cargar la muestra en la columna.
23. Lavar el tubo donde estaba la muestra con 200 μ L de 0,1% TFA y cargarlo en la columna.
24. Lavar la columna con 1mL de 0,1%TFA (repetir dos veces).
25. Eluir los péptidos con 800 μ L de 60% acetonitrilo en 0.1% TFA.
26. Concentrar los péptidos en *SpeedVac* durante 1 hora mínimo.
27. Conservar los péptidos a -80°C

Los siguientes pasos, por ejemplo la inyección de las muestras, fueron realizados por los especialistas del grupo para una precisa y correcta ejecución. Del mismo modo, los datos producidos tras las lecturas por LC-MS/MS también fueron pre-filtrados por uno de los especialistas del grupo (Silvia Martínez).

Soluciones:

Solución UA (Urea Acid, **UA**): 100 μ L de 8M Urea (Sigma, U5128) en 10 mM Tris-HCl (pH=8).

Solución IAA (Iodoacetamida): 0.05 M iodoacetamida en UA. Preparar 0.1 mL por muestra.

Dithiothreitol (DTT) en solución de UA. Tripsina, Stock 0.4 μ g/ μ l.

0.5 M NaCl en agua. Preparar 0.05 mL por muestra.

TFA **Trifluoroacético** (Trifluoroacetic acid,).

Nota: La soluciones de UA y IAA tienen que prepararse diariamente.

4.2.5. Anticuerpos utilizados

Anticuerpos primarios:

α -GFP (policlonal de conejo-Invitrogen): Dilución de trabajo 1:1000

α -PHYA (monoclonal de ratón específico anti-phyA): Dilución de trabajo 1:5000

Anticuerpos secundarios:

- α -ratón HRP (Pierce): Dilución de trabajo 1:10000.

- α -conejo HRP (Pierce): Dilución de trabajo 1:10000

4.2.6. Doble híbrido (Y2H)

El sistema de doble híbrido (*Yeast Two Hybrid*, Y2H) es una aproximación para validar interacciones proteína-proteína. Se parte de células competentes de levadura.

Protocolo para generar células competentes de levadura adaptado del *Nature Protocols* de (Gietz et al. 2007).

1. Inocular una colonia de la cepa de levadura que se quiere regenerar en 25 mL en un cultivo líquido YPDA, incubar durante 12-16 horas en un incubador con agitación a 200

rpm.

2. Repartir 1L de YPDA en dos erlenmeyers.
3. Añadir el pre-cultivo en 500 mL de YPDA (OD 0,1 \approx 1×10^6 células/mL).
4. Incubar el Erlenmeyer a 28-30°C en agitación a 200 rpm durante mínimo 4 horas. (OD 1 \approx 1×10^7 células/mL).
5. Centrifugar los cultivos a 2000g durante 5 min y eliminar el sobrenadante.
6. Lavar las células con 250 mL de agua estéril.
7. Resuspender en 5mL de agua estéril.
8. Transferir a un tubo cónico de 15 mL y centrifugar las células a 2000g durante 5 min.
9. Resuspender las células en 5 mL de FCC.
10. Alicuotar en volúmenes de 50 μ L.
11. Almacenar a -80°C.

FCC (5% v/v glicerol, 10% v/v DMSO).

YPDA: Ver la sección de medios de levaduras apartado 1.4

Transformación de levaduras para el ensayo Y2H:

Preparar la siguiente mezcla: 240 μ L 50% PEG, 36 μ L 10x LiAc (1M), 10 μ L ssDNA (10mg/ml), 69 μ L agua estéril (Volumen total de 360 μ L para 1 transformación). Agitar la mezcla con vórtex. El ssDNA (DNA de esperma de salmón congelado a -20°C) se desnaturaliza durante 3 min a 95°C.

1. Dejar descongelar las células competentes en hielo. Centrifugar el tubo 1 min a 14000 rpm. Retirar el sobrenadante con cuidado.
2. Agregar los 360 μ L de la mezcla. Añadir 5 μ L del plásmido de DNA (0,1 μ g/ μ L). Incubar a 28-30°C en agitación durante 30 min.
3. Añadir 36 μ L de DMSO. Incubar en baño a 42°C durante 15 min.
4. Centrifugar a 14000 rpm durante 1 min. Aspirar el sobrenadante y resuspender las células en 200 μ L de agua estéril. Plaques 50 μ L y 100 μ L en dos placas del medio adecuado de selección.
5. Incubar placas a 30°C durante 2-5 días.

Análisis de la interacción mediante el sistema Y2H :

1. Transformar la cepa pJ694 α con el plásmido con la proteína fusionada al BD (BD-X) y la cepa YM4271a con el plásmido con la proteína fusionada al AD (AD-Y) y plaques cada una por separado en medio SD-LW.
2. Inocular dos cultivos de 2 mL de medio YPDA con colonias frescas: uno expresa BD-X (tubo 1) y el otro AD-Y (tubo 2). Realizar este proceso por cada interacción que se quiera analizar. Crecer a 28°C durante 24 h con agitación.
3. Preparación de *mating*. Añadir en un tubo de 10 mL (tubo 3) 500 μ L de cultivo del tubo 1 (BD-X) y 500 μ L del cultivo del tubo 2 (AD-Y). Mezclar e incubar durante 48 h a 28°C sin agitación.
4. Preparación de enriquecimiento para las células diploides: Inocular 2 mL de SD-LW (tubo 4) con 200 μ L del tubo 3 e incubar durante 48 h a 28°C con agitación.
5. Preparar 3 diluciones del cultivo del tubo 4: sin diluir, 10^{-1} y 10^{-2} .

6. Plaquear en forma de gota 5 o 10 μL de las diluciones en medio de agar SD-LW (comprobación de *mating*) y SD-HLW (comprobación de la interacción de las proteínas).

Medios y Soluciones:

LiAc 1M: Sigma #L-6883. Preparar 100 mL 1M, ajustar el pH a 7.5 y autoclavar.

PEG 50%: MW= 3350, Sigma #P-3640. Utilizar al 50% p/v de PEG3350, añadir agua y autoclavar.

4.3. Metodología vegetal

Para los tratamientos de luz, las semillas de *A. thaliana* y de *C. hirsuta* se esterilizaron superficialmente antes de sembrarlas en placas de medio (0,5xMS). Una vez sembradas, las placas se estratificaron en oscuridad a 4°C (3-5 d), proceso que permite la rotura de la dormición de las semillas y asegura su germinación sincronizada una vez las ponemos en las condiciones de luz y temperatura adecuadas. Tras la estratificación, las placas se pasaron a la cámara correspondiente para inducir la germinación y crecimiento.

4.3.1. Esterilización y siembra de semillas.

La esterilización de las semillas se llevó a cabo para todos aquellos experimentos que las semillas fueron sembradas en placa.

1. Embeber las semillas en de 0,1% Tween-20 (v/v) durante 20 min.
2. Eliminar la solución de Tween-20. Agregar 1 mL de una solución hipoclorito sódico 10% (v/v), 0,1% Tween-20 (v/v). Agitar y dejar actuar 10 min. (no exceder el tiempo de tratamiento, ya que puede reducir la viabilidad de las semillas).
3. Lavar las semillas con 1mL de agua estéril 5 veces consecutivas. Retirar el agua del último lavado de la esterilización.
4. Las semillas están listas para sembrar, según el método más apropiado de los que se describen a continuación.

A) Selección de semillas T1 procedentes de plantas transformadas con *A. tumefaciens*.

Se siembran unas 1500 semillas por placa en grupo sobre el medio de cultivo de selección.

1. Resuspender las semillas en 2,5 mL de solución estéril de 0,1% agarosa (p/v).
2. Volcar la solución de agarosa con semillas sobre el medio sólido 0,5xMS que contiene el antibiótico de selección (ppt) y antibiótico Cf (inhibe el crecimiento de *A. tumefaciens* sin afectar el crecimiento de la planta).
3. Distribuir homogéneamente las semillas por toda la superficie de la placa y dejar seca en la campana.

B) Siembra de semillas individuales sobre el medio de cultivo.

Para facilitar el recuento de plántulas y para los experimentos fisiológicos de medidas de la longitud de hipocotilos, se siembran sobre el medio de cultivo unas 100 semillas por placa

(9,5 cm de diámetro) una a una.

1. Resuspender las semillas en agua del último lavado de esterilización.
2. Pipetear las semillas con una pipeta P1000 y dejarlas caer una a una sobre el medio sólido correspondiente tocando la punta de la pipeta el medio.

Para facilitar la recogida de plántulas para los experimentos de extracción de RNA o proteína se siembra sobre el medio de cultivo unas 100 semillas por placa (9,5 cm de diámetro) y se pone sobre el medio una membrana autoclavada de nilón.

Independientemente del sistema de sembrado utilizado, una vez finalizada la siembra de las semillas, las placas se sellan con cinta porosa micropore®.

4.3.2. Transformación de plantas por *floral dip*.

Se emplearon plantas de *A. thaliana* (Ecotipo Col-0, silvestres y mutantes *phyA-501*) y *C. hirsuta* (Ecotipo Ox) y cultivos de *A. tumefaciens* con la cepa C58C1 (GV2260) portadora de la construcción correspondiente en cada caso. La metodología de transformación de plantas fue la previamente descrita por (Clough & Bent 1998).

1. Preparar tiestos de 11,5 cm de diámetro con la superficie de sustrato cubierta por una rejilla de plástico. Sembrar las semillas equidistantes para obtener 6-7 plantas por tiesto.
2. A las 4-6 semanas desde la siembra (plantas con inflorescencias de 5-7 cm de longitud), cortar las inflorescencias a ras de roseta. A los 9-10 d las inflorescencias secundarias estarán óptimas para transformar.
3. Dos días antes de la transformación inocular 2 mL de medio YEB con los antibióticos adecuados y la cepa de *A. tumefaciens* portadora de la construcción de interés (precultivo). Incubar 20 h a 28°C con agitación (200 rpm).
4. Inocular un cultivo de 1L de medio de YEB (suplementado con los antibióticos adecuados) con 1 mL de precultivo. Incubar 20 h a 28°C con agitación (200 rpm).
5. Centrifugar el cultivo (10 min. a 4000g). Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 300 mL de 5% (p/v) sacarosa. Justo antes de transformar las plantas agregar 0,02% (v/v) Siluet al cultivo de *A. tumefaciens*.
6. Trasvasar el cultivo a un recipiente adecuado. Sumergir las inflorescencias de las plantas durante 5 min colocando el tiesto boca abajo.
7. Dejar los tiestos en posición horizontal en una bandeja sobre papel de filtro que absorbe el exceso de solución de *A. tumefaciens*. Mantener en el fitotrón la bandeja tapada durante 2-4 d y con baja densidad lumínica.
8. Retirar el plástico que cubre la bandeja y el papel de filtro. Poner las plantas en posición vertical. Transferir al invernadero y dejar crecer 4 semanas hasta la primera cosecha de semillas.

4.3.3. Transformación transitoria en *N. benthamiana* para localización subcelular.

Se transformaron plantas de *N. benthamiana* para experimentos de localización subcelular. Esta técnica, al igual que la anterior, consiste en introducir material genético exógeno en las células

vegetales mediante la acción de la bacteria *A. tumefaciens*. Sin embargo, en este caso se transforman las células de las hojas de manera no permanente. El procedimiento se detalla a continuación:

1. Inocular 5mL de medio YEB líquido (con antibióticos selectivos) con una colonia transformada con la construcción de interés (comprobada previamente por PCR). Incubar durante 48h a 28°C y 200 rpm.
2. Inocular un cultivo de 20 mL de YEB (con antibióticos selectivos) con 0,5% del volumen del total del precultivo del día anterior. Incubar a 28°C y 200 rpm hasta conseguir una $DO_{600} = 0,5-1$ (aprox. 15-20 horas) en función de la saturación del pre-cultivo empleado para la inoculación.
3. Medir la DO e igualarla en todos los cultivos.
4. Centrifugar 10 min. a 3500 rpm a RT.
5. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento con suavidad con la solución de agroinfiltración con relación 1:1 (v cultivo: v de solución de agroinfiltración)
6. Incubar de 2-4h a RT.

Solución de agroinfiltración:

MgCl₂ 10 mM

MES 10 mM (pH=6)

Acetosirigona 150 µM (disolución en DMSO)

Las plantas de tabaco óptimas son de unas tres semanas de edad, cuando aún no tienen flores. El proceso consiste en inyectar de forma muy lenta la solución de agroinfiltración por la parte abaxial de las hojas. En la mayoría de las agroinfiltraciones se utilizó una transformación adicional con el plásmido Ptrans5'TEV (donde está clonado el gen que codifica para la proteína supresora del silenciamiento HC-PRO del *Potyvirus (Tobacco Etch Virus, TEV)*, proporcionado por el Dr. Juan José López-Moya. La actividad transitoria de esta proteína ayuda a evitar el silenciamiento post-transcripcional inducido por la introducción de la agroinfiltración. Tras 3-5 días de la agroinfiltración se observan fragmentos de hoja al microscopio confocal para estudiar la localización de la proteína de interés.

4.3.4. Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (*Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC*).

Con este experimento se puede ensayar la interacción entre dos proteínas *in vivo* en base a la reconstrucción de una proteína fluorescente YFP a partir de la fusión de sus dos mitades unidas a proteínas capaces de interactuar. Este ensayo se realizó en plantas de tabaco (*N. benthamiana*). El protocolo a seguir es igual al de la localización subcelular, pero en el momento de poner el *A. tumefaciens* a incubar con la solución hay que unir a volúmenes iguales de las dos interacciones que se quieren testear.

4.3.5. Extracción rápida de DNA genómico de planta para su genotipado.

Para la extracción de DNA se siguió un protocolo de extracción descrito en (Edwards et al. 1991).

1. Cortar el tejido joven vegetal e introducirlo en un tubo *ependorf* con 2 perlas de cristal.
2. Poner las gradillas en el *tissue-lyser* y triturar el material durante 1,5 min. a 30 s^{-1} . (repetir dos veces).
3. Sacar los tubos y mantenerlos en hielo. Añadir 400 μL de tampón de extracción. Agitar con vórtex. A partir de aquí trabajar a RT.
4. Centrifugar a 13000 rpm (5-10 min). Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo.
5. Añadir 400 μL de isopropanol. Incubar a RT durante 2 min.
6. Centrifugar a 13000 rpm (5-10 min). Descartar el sobrenadante.
7. Lavar el sedimento (que contiene el DNA) con 500 μL de 70% (v/v) etanol. Agitar con vórtex y centrifugar a 13000 rpm (2 min). Descartar el sobrenadante y dejar secar por completo el sedimento a TA durante 10 min.
8. Añadir 50 μL de TE 1X o agua.

4.3.6. Genotipado de plantas por PCR.

La técnica de la PCR se utiliza para detectar la presencia de un transgen introducido en la planta, para detectar plantas mutantes procedentes de colecciones por inserciones de un T-DNA (SALK, Gabi-Kat), mutaciones puntuales, utilizando oligonucleótidos específicos para cada caso en concreto. Se utilizó 3-5 μL de DNA molde procedente de la extracción de genómica descrita en el apartado anterior y el par de oligonucleótidos adecuados.

4.3.7. Tratamientos y ensayos en plantas.

La intensidad y la proporción de las diferentes longitudes de onda se ha medido gracias a un espectrómetro *SpectroSense2* que se encuentra asociado a un sensor de cuatro canales, que mide el rojo lejano (Far Red, FR), rojo (Red, R), azul (Blue, B), y el PAR.

Los tratamientos de luz se realizaron en una cámara de cultivo (Inkoa o Percival) a 22°C . Los tratamientos de luz W se han realizado mediante 4 tubos halógenos.

La sombra por proximidad: Se generó enriqueciendo la luz W con luz FR (λ , 727 nm) utilizando lámparas LED híbridas (*Quantum devices*) QB1310CS-670-735 resultando en un ratio R:FR en sombra simulada total de 0,05.

La sombra por dosel: Se generó enriqueciendo la luz W con luz FR utilizando lámparas LED híbridas (*Quantum devices*) QB1310CS-670-735 resultando en un ratio R:FR en sombra simulada total de 0,025. En condiciones de W es 1,5.

Se muestran diversos tipos de ensayos con condiciones lumínicas diferentes. A continuación, se resumen las condiciones de luz utilizadas para distintos tipos de ensayos (**Figura M1**).

Ensayo de **alargamiento de hipocotilo:** Las plantas germinaron (día 0, d0) y en el caso de *A.thaliana* (**Figura M1A**) crecieron durante 2 días (d2) en luz blanca continua (W); mientras que en el caso de *C. hirsuta* (**Figura M1B**) crecieron durante d3 W. Posteriormente se mantuvieron en W o se transfirieron a W enriquecida con luz FR (W+FR) hasta el día 7 (d7) a 22°C .

Ensayos de **RT-qPCR en sombra: (Figura M1C)** Tanto en el caso de *A.thaliana* como de *C.hirsuta* las plantas crecieron en W durante d7 a 22°C. Se recolectaron muestras antes (0h) y después de 1h y/o 4h, 8h de W+FR.

Ensayo de **alargamiento de hipocotilo en desetiación** en luz monocromáticas continuas: las plantas se irradiándolas durante 2 horas con luz W (d0), en luz blanca continua (W) (**Figura M1D**). Posteriormente las placas se mantuvieron en oscuridad (Dark, D) o se irradiaron con distintas intensidades de FRc, Bc o Rc hasta el día 4 (d4).

Ensayo de **RT-qPCR e inublot: (Figura M1E)** Tanto en el caso de *A.thaliana* como de *C.hirsuta* las plantas se irradiaron con W por dos horas. Se mantuvieron en oscuridad y se recolectó material a los 3, 5 y 7 días (según experimento concreto).

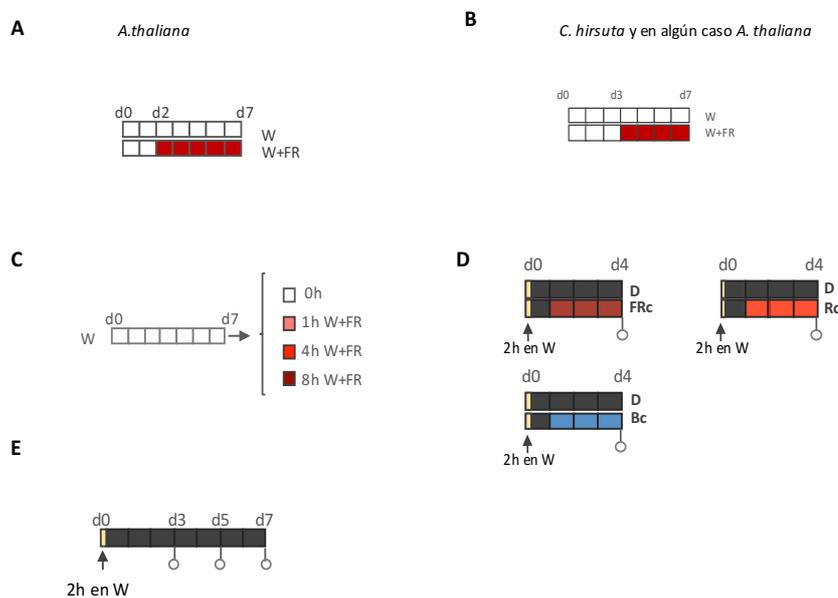


Figura M1. Tratamientos de luz utilizados durante esta tesis.

4.3.8. Medidas de los hipocotilos.

Las medidas de la longitud de los hipocotilos de las plántulas se realizaron sobre imágenes digitales utilizando el programa ImageJ® (*National Institute of Health ImageJ software*, Bethesda, MD, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Para ello las plántulas se colocaron planas sobre la placa de agar antes de tomar las fotografías. Se analizó un mínimo de 20 plántulas por tratamiento.

4.3.9. Análisis de fenotipos dependientes de DEX:

En plántulas: germinaron en placas suplementadas con 0 (-DEX) o 5 μM DEX (+DEX) y se crecieron en condiciones de W+FR. A los 7 días se observó el fenotipo.

En plantas adultas: Tras la estratificación durante 4 días a 4°C se indujo la germinación de las semillas transfiriéndolas a 22°C con W. En d7, plántulas de aspecto similar se pasaron a tiestos individuales y se crecieron en SD. A partir de la tercera semana (d21 desde la germinación), en

el caso de líneas inducibles (por ejemplo, *35S:ATHB4-GR*) el tratamiento diferencial con W+FR se combinó con aplicaciones de 10µL de 5µM Dexametasona (+DEX) o como tratamiento mock: 50% etanol (-DEX) en la región del meristemo apical (indicadas con flechas). Se aplicó durante 7 días pero fue interrumpido por dos días (**ver Figura R1.4**).

4.3.10. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos. (clorofilas y carotenoides).

Estos análisis fueron realizados por Rosa Rodríguez del laboratorio del Dr. M. Rodríguez-Concepción (CRAG) siguiendo un método de extracción de pigmentos y detección por HPLC de la serie *Agilent 1200 (Agilent Technologies)*. Se partió de unos 4 mg de tejido liofilizado por muestra y se utilizaron 4 muestras biológicas. Se muestra la media de 4 muestras y el Error estándar (*Standard Error*; SE). Se utilizó como un patrón interno la cantaxantina, carotenoide no presente en plantas, para no haya posibilidad de confusión con los picos de los pigmentos de las plantas. Los picos individuales en los cromatogramas se cuantificaron integrando el área de los picos, utilizando el programa suministrado por el proveedor *Agilent Technologies*.

4.4. Análisis Bioinformáticos.

Además de los programas mencionados con anterioridad en esta tesis se han utilizado estos recursos informáticos:

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/>

Análisis de secuencias de DNA y proteínas:

BLAST: <http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>

MultiAlign: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

Programas para diseño de clonajes *in silico* :

Genevestigator: <https://www.genevestigator.com/gv/>

Vector NTI 10 (Invitrogen): para generar mapas de plásmidos.

Serial cloner: http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html

Imágenes de microcopia:

Programa proporcionado por la casa comercial del microscopio OLYMPUS FV1000

Programa del LC-MS/MS:

Programa: *Q Exactive Benchtop Orbitrap LC-MS/MS*

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J. et al., 2000. The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends in cell biology*, 10(1), pp.17–24.
- Al-Sady, B. et al., 2008. Mechanistic duality of transcription factor function in phytochrome signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6), pp.2232–2237.
- Al-Sady, B. et al., 2006. Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Molecular cell*, 23(3), pp.439–46.
- Ariel, F.D. et al., 2007. The true story of the HD-Zip family. *Trends in Plant Science*, 12(9), pp.419–426.
- Arsovski, A.A. et al., 2012. Photomorphogenesis. *The Arabidopsis book*, 10, p.e0147.
- Ausubel, F.M. et al. eds., 2001. *Current Protocols in Molecular Biology*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Bauer, D. et al., 2004. Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in Arabidopsis. *The Plant cell*, 16(6), pp.1433–45.
- (Belda-Palazón et al. 2012) Belda-Palazón, B. et al., 2012. Aminopropyltransferases Involved in Polyamine Biosynthesis Localize Preferentially in the Nucleus of Plant Cells. J. L. Heazlewood, ed. *PLoS ONE*, 7(10), p.e46907.
- Botto, J.F. et al., 1996. Phytochrome A Mediates the Promotion of Seed Germination by Very Low Fluences of Light and Canopy Shade Light in Arabidopsis.
- Bou-Torrent, J., Salla-Martret, M., Brandt, R., Musielak, T., Palauqui, J.-C., Martínez-García, J.F., et al., 2012. ATHB4 and HAT3, two class II HD-ZIP transcription factors, control leaf development in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, 7(11), pp.1382–1387.
- Bou-Torrent, J. et al., 2014. Plant proximity perception dynamically modulates hormone levels and sensitivity in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, 65(11), pp.2937–47.
- Bou-Torrent, J. et al., 2015. Regulation of carotenoid biosynthesis by shade relies on specific subsets of antagonistic transcription factors and co-factors. *Plant Physiology*, 169(3), p.pp.00552.2015.
- Boylan, M.T. & Quail, P.H., 1991. Phytochrome a overexpression inhibits hypocotyl elongation in transgenic Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(23), pp.10806–10810.
- Brandt, R. et al., 2012. Genome-wide binding-site analysis of REVOLUTA reveals a link between leaf patterning and light-mediated growth responses. *The Plant Journal*, 72(1), pp.31–42.

- Cantón, F.R. & Quail, P.H., 1999. Both phyA and phyB Mediate Light-Imposed Repression of PHYA Gene Expression in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 121(4), pp.1207–1215.
- Carabelli, M. et al., 2007. Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genes & Development*, 21(15), pp.1863–1868.
- Carabelli, M. et al., 1993. The Arabidopsis Athb-2 and -4 genes are strongly induced by far-red-rich light. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 4(3), pp.469–79.
- Casal, J.J., 1996. Phytochrome A enhances the promotion of hypocotyl growth caused by reductions in levels of phytochrome B in its far-red-light-absorbing form in light-grown Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology*, 112(3), pp.965–73.
- Casal, J.J., 2012. Shade avoidance. *The Arabidopsis book*, 10, p.e0157.
- Casal, J.J. et al., 2002. The Serine-Rich N-Terminal Domain of Oat Phytochrome A Helps Regulate Light Responses and Subnuclear Localization of the Photoreceptor. *PLANT PHYSIOLOGY*, 129(3), pp.1127–1137.
- Castillon, A., Shen, H. & Huq, E., 2007. Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends in Plant Science*, 12(11), pp.514–521.
- Causier, B., Ashworth, M., et al., 2012. The TOPLESS interactome: a framework for gene repression in Arabidopsis. *Plant physiology*, 158(1), pp.423–38.
- Causier, B., Lloyd, J., et al., 2012. TOPLESS co-repressor interactions and their evolutionary conservation in plants. *Plant signaling & behavior*, 7(3), pp.325–8.
- Chen, F. et al., 2012. Phosphorylation of FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL1 is a key mechanism defining signaling dynamics of phytochrome a under red and far-red light in arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(5), pp.1907–1920.
- Choi, G. et al., 1999. Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature*, 401(6753), pp.610–613.
- Christie, J.M. et al., 2012. Plant UVR8 photoreceptor senses uv-b by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges. *Science*, 335(6075), pp.1492–1496.
- Ciarbelli, A.R. et al., 2008. The Arabidopsis Homeodomain-leucine Zipper II gene family: diversity and redundancy. *Plant Molecular Biology*, 68(4–5), pp.465–478.
- Cifuentes-Esquivel, N. et al., 2013. The bHLH proteins BEE and BIM positively modulate the shade avoidance syndrome in Arabidopsis seedlings. *The Plant Journal*, 75(6), pp.989–1002.
- Ciolfi, A. et al., 2013. Dynamics of the Shade-Avoidance Response in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 163(1), pp.331–353.

- Clough, R.C. & Vierstra, R.D., 1997. Phytochrome degradation. *Plant, Cell and Environment*, 20(6), pp.713–721.
- Clough, S.J. & Bent, A.F., 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), pp.735–743.
- Colón-Carmona, A. et al., 2000. Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome in vitro. *Plant physiology*, 124(4), pp.1728–38.
- Debrieux, D., Trevisan, M. & Fankhauser, C., 2013. Conditional involvement of COP1 in the degradation of Phytochrome A. *Plant physiology*, 161(April), pp.2136–2145.
- Dehesh, K. et al., 1993. *Arabidopsis* HY8 locus encodes phytochrome A. *The Plant cell*, 5(9), pp.1081–1088.
- Devlin, P.F. et al., 1999. Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time. *Plant physiology*, 119(3), pp.909–15.
- Devlin, P.F., Yanovsky, M.J. & Kay, S.A., 2003. A Genomic Analysis of the Shade Avoidance Response in *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY*, 133(4), pp.1617–1629.
- Duek, P.D. & Fankhauser, C., 2005. bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. *Trends in Plant Science*, 10(2), pp.51–54.
- Edwards, K., Johnstone, C. & Thompson, C., 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research*, 19(6), p.1349.
- Fairchild, C.D., Schumaker, M.A. & Quail, P.H., 2000. HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes & development*, 14(18), pp.2377–91.
- Fankhauser, C. et al., 1999. PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5419), pp.1539–41.
- Fankhauser, C. & Chen, M., 2008. Transposing phytochrome into the nucleus. *Trends in Plant Science*, 13(11), pp.596–601.
- Folta, K.M. et al., 2003. Primary inhibition of hypocotyl growth and phototropism depend differently on phototropin-mediated increases in cytoplasmic calcium induced by blue light. *Plant physiology*, 133(4), pp.1464–70.
- Franklin, K.A., Davis, S.J., et al., 2003. Mutant analyses define multiple roles for phytochrome C in *Arabidopsis* photomorphogenesis. *The Plant cell*, 15(9), pp.1981–9.
- Franklin, K.A., Praekelt, U., et al., 2003. Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 131(3), pp.1340–6.
- Franklin, K.A., 2008. Shade avoidance. *New Phytologist*, 179(4), pp.930–944.
- Franklin, K.A. & Quail, P.H., 2010. Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *Journal of Experimental Botany*, 61(1), pp.11–24.
- Freddolino, P.L., Gardner, K.H. & Schulten, K., 2013. Signaling mechanisms of LOV domains: new

- insights from molecular dynamics studies. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 12(7), pp.1158–70.
- Freiman, R.N. & Tjian, R., 2002. A Glutamine-Rich Trail Leads to Transcription Factors. *Science*, 296(5576).
- Gallemi, M., 2013. Aproximació als mecanismes moleculars implicats en la regulació de la síndrome de fugida de l'ombra en *Arabidopsis*. Tesis doctoral.
- Gallemi, M. et al., 2017. A non-DNA-binding activity for the ATHB4 transcription factor in the control of vegetation proximity. *New Phytologist*.
- Galstyan, A., Cifuentes-Esquivel, N., et al., 2011. The shade avoidance syndrome in *Arabidopsis*: a fundamental role for atypical basic helix-loop-helix proteins as transcriptional cofactors. *The Plant Journal*, 66(2), pp.258–267.
- Gan, X. et al., 2016. The *Cardamine hirsuta* genome offers insight into the evolution of morphological diversity. *Nature plants*, 2(11), p.16167.
- Gommers, C.M.M. et al., 2013. Shade tolerance: When growing tall is not an option. *Trends in Plant Science*, 18(2), pp.65–71.
- Gregis, V. et al., 2006. AGL24, SHORT VEGETATIVE PHASE, and APETALA1 redundantly control AGAMOUS during early stages of flower development in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 18(6), pp.1373–82.
- Gu, X., Wang, Y. & He, Y., 2013. Photoperiodic regulation of flowering time through periodic histone deacetylation of the florigen gene FT. X. Chen, ed. *PLoS biology*, 11(9), p.e1001649.
- Hagmann, M., Georgiev, O. & Schaffner, W., 1997. The VP16 paradox: herpes simplex virus VP16 contains a long-range activation domain but within the natural multiprotein complex activates only from promoter-proximal positions. *Journal of virology*, 71(8), pp.5952–62.
- Halliday, K.J. & Fankhauser, C., 2003. Phytochrome-hormonal signalling networks. *New Phytologist*, 157(3), pp.449–463.
- Han, Y.-J., Song, P.-S. & Kim, J., 2007. Phytochrome-mediated photomorphogenesis in plants. *Journal of Plant Biology*, 50(3), pp.230–240.
- Hao, Y. et al., 2012. Interactions between HLH and bHLH Factors Modulate Light-Regulated Plant Development. *Molecular Plant*, 5(3), pp.688–697.
- Hay, A. & Tsiantis, M., 2016. *Cardamine hirsuta*: a comparative view. *Current Opinion in Genetics & Development*, 39, pp.1–7.
- Hay, A.S. et al., 2014. *Cardamine hirsuta* : a versatile genetic system for comparative studies. *The Plant Journal*, 78(1), pp.1–15.
- Heijde, M. & Ulm, R., 2012. UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends in plant*

- science, 17(4), pp.230–7.
- Hennig, L. et al., 2002. Phytochrome E controls light-induced germination of Arabidopsis. *Plant physiology*, 128(1), pp.194–200.
- Hill, K., Wang, H. & Perry, S.E., 2008. A transcriptional repression motif in the MADS factor AGL15 is involved in recruitment of histone deacetylase complex components. *The Plant Journal*, 53(1), pp.172–185.
- Hiltbrunner, A. et al., 2006. FHY1 and FHL Act Together to Mediate Nuclear Accumulation of the Phytochrome A Photoreceptor. *Plant and Cell Physiology*, 47(8), pp.1023–1034.
- Hiltbrunner, A. et al., 2005. Nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor requires FHY1. *Current Biology*, 15(23), pp.2125–2130.
- Hiratsu, K. et al., 2003. Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in Arabidopsis. *Plant Journal*, 34(5), pp.733–739.
- Hisada, A. et al., 2000. Light-induced nuclear translocation of endogenous pea phytochrome A visualized by immunocytochemical procedures. *The Plant cell*, 12(7), pp.1063–78.
- Hoagland, D. R. Arnon, D.I., 1938. Full text of "The water-culture method for growing plants without soil"
- Hornitschek, P. et al., 2009. Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. *The EMBO journal*, 28(24), pp.3893–902.
- Hornitschek, P. et al., 2012. Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. *Plant Journal*, 71(5), pp.699–711.
- Huq, E. et al., 2004. PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 Is a Critical bHLH Regulator of Chlorophyll Biosynthesis. *Science*, 305(5692), pp.1937–1941.
- Huq, E. & Quail, P.H., 2002. PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 21(10), pp.2441–2450.
- Ikeda, M. & Ohme-Takagi, M., 2009. A Novel Group of Transcriptional Repressors in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 50(5), pp.970–975.
- Jang, I.-C. et al., 2010. Arabidopsis PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR Proteins Promote Phytochrome B Polyubiquitination by COP1 E3 Ligase in the Nucleus. *THE PLANT CELL ONLINE*, 22(7), pp.2370–2383.
- Jiao, Y., Lau, O.S. & Deng, X.W., 2007. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews Genetics*, 8(3), pp.217–230.
- Johnson, C.M. et al., 1957. Comparative chlorine requirements of different plant species. *Plant and Soil*, 8(4), pp.337–353.

- Johnson, E. et al., 1994. Photoresponses of Light-Grown phyA Mutants of Arabidopsis (Phytochrome A Is Required for the Perception of Daylength Extensions). *Plant Physiology*, 105(1), pp.141–149.
- Josse, E.-M. & Halliday, K.J., 2008. Skotomorphogenesis: The Dark Side of Light Signalling. *Current Biology*, 18(24), pp.R1144–R1146.
- Jung, J.-H. et al., 2016. Phytochromes function as thermosensors in Arabidopsis. *Science*, 354(6314), pp.886–889.
- Kagale, S., Links, M.G. & Rozwadowski, K., 2010. Genome-Wide Analysis of Ethylene-Responsive Element Binding Factor-Associated Amphiphilic Repression Motif-Containing Transcriptional Regulators in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 152(3), pp.1109–1134.
- Kagale, S. & Rozwadowski, K., 2011. EAR motif-mediated transcriptional repression in plants: an underlying mechanism for epigenetic regulation of gene expression. *Epigenetics*, 6(2), pp.141–6.
- Ke, J. et al., 2015. Structural basis for recognition of diverse transcriptional repressors by the TOPLESS family of corepressors. *Science advances*, 1(6), p.e1500107.
- Keuskamp, D.H. et al., 2010. Auxin transport through PIN-FORMED 3 (PIN3) controls shade avoidance and fitness during competition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(52), pp.22740–4.
- Kevei, E., Schafer, E. & Nagy, F., 2007. Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes. *Journal of Experimental Botany*, 58(12), pp.3113–3124.
- Khanna, R. et al., 2004. A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. *The Plant cell*, 16(11), pp.3033–44.
- Khanna, R. et al., 2007. The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor PIF5 Acts on Ethylene Biosynthesis and Phytochrome Signaling by Distinct Mechanisms. *THE PLANT CELL ONLINE*, 19(12), pp.3915–3929.
- Kim, D.-H. et al., 2002. A phytochrome-associated protein phosphatase 2A modulates light signals in flowering time control in Arabidopsis. *The Plant cell*, 14(12), pp.3043–56.
- Kinoshita, T. et al., 2001. phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature*, 414(6864), pp.656–660.
- Kircher, S. et al., 2002. Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *The Plant cell*, 14(7), pp.1541–55.
- Kleine, T., Lockhart, P. & Batschauer, A., 2003. An Arabidopsis protein closely related to Synechocystis cryptochrome is targeted to organelles. *The Plant Journal*, 35(1), pp.93–103.

- Łabuz, J. et al., 2012. The expression of phototropins in Arabidopsis leaves: developmental and light regulation. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), pp.1763–1771.
- Leivar, P. et al., 2009. Definition of Early Transcriptional Circuitry Involved in Light-Induced Reversal of PIF-Imposed Repression of Photomorphogenesis in Young Arabidopsis Seedlings. *The Plant Cell*, 21(11), pp.3535–3553.
- Leivar, P. et al., 2012. Dynamic antagonism between phytochromes and PIF family basic helix-loop-helix factors induces selective reciprocal responses to light and shade in a rapidly responsive transcriptional network in Arabidopsis. *The Plant cell*, 24(4), pp.1398–419.
- Leivar, P. et al., 2008. The Arabidopsis Phytochrome-Interacting Factor PIF7, Together with PIF3 and PIF4, Regulates Responses to Prolonged Red Light by Modulating phyB Levels. *THE PLANT CELL ONLINE*, 20(2), pp.337–352.
- Leivar, P. & Quail, P.H., 2011. PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends in Plant Science*, 16(1), pp.19–28.
- Li, J. et al., 2011. Phytochrome signaling mechanisms. *The Arabidopsis book*, 9, p.e0148.
- Li, L. et al., 2012. Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture. *Genes & Development*, 26(8), pp.785–790.
- Li, Q.-H. & Yang, H.-Q., 2007. Cryptochrome signaling in plants. *Photochemistry and photobiology*, 83(1), pp.94–101.
- Long, J.A. et al., 2006. TOPLESS Regulates Apical Embryonic Fate in Arabidopsis. *Science*, 312(5779), pp.1520–1523.
- Lorrain, S. et al., 2007. Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *The Plant Journal*, 53(2), pp.312–323.
- Luccioni, L.G. et al., 2002. Brassinosteroid Mutants Uncover Fine Tuning of Phytochrome Signaling. *PLANT PHYSIOLOGY*, 128(1), pp.173–181.
- Mannervik, M. et al., 1999. Transcriptional Coregulators in Development. *Science*, 284(5414).
- Martínez-García, J.F. et al., 2010. Regulatory Components of Shade Avoidance Syndrome. In *Advances in Botanical Research*. pp. 65–116.
- Martínez-García, J.F. et al., 2014. The shade avoidance syndrome in Arabidopsis: the antagonistic role of phytochrome a and B differentiates vegetation proximity and canopy shade. E. Huq, ed. *PloS one*, 9(10), p.e109275.
- Martínez-García, J.F., Huq, E. & Quail, P.H., 2000. Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5467), pp.859–63.
- Mazur, M.J. & van den Burg, H.A., 2012. Global SUMO Proteome Responses Guide Gene Regulation, mRNA Biogenesis, and Plant Stress Responses. *Frontiers in Plant Science*, 3,

- p.215.
- Monte, E. et al., 2003. Isolation and characterization of phyC mutants in Arabidopsis reveals complex crosstalk between phytochrome signaling pathways. *The Plant cell*, 15(9), pp.1962–80.
- Morgan, D.C. & Smith, H., 1978. The relationship between phytochrome-photoequilibrium and Development in light grown *Chenopodium album* L. *Planta*, 142(2), pp.187–193.
- Nagatani, A., 2004. Light-regulated nuclear localization of phytochromes. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(6), pp.708–711.
- Nagatani, A., Chory, J. & Furuya, M., 1991. Phytochrome B is not detectable in the hy3 mutant of arabidopsis, which is deficient in responding to end-of-day far-red light treatments. *Plant and Cell Physiology*, 32(7), pp.1119–1122.
- Nagatani, A., Reed, J.W. & Chory, J., 1993. Isolation and Initial Characterization of Arabidopsis Mutants That Are Deficient in Phytochrome A. *Plant physiology*, 102(1), pp.269–277.
- Nagy, F. & Schäfer, E., 2002. Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), pp.329–355.
- Neff, M.M., Fankhauser, C. & Chory, J., 2000. Light: an indicator of time and place. *Genes & development*, 14(3), pp.257–71.
- Ni, M., Tepperman, J.M. & Quail, P.H., 1998. PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell*, 95(5), pp.657–67.
- Oglicht, A. et al., 2010. Structure and Function of Plant Photoreceptors. *Annu. Rev. Plant Biol*, 61, pp.21–47.
- Oh, E. et al., 2004. PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell*, 16(11), pp.3045–58.
- Ohgishi, M. et al., 2004. Functional analysis of each blue light receptor, cry1, cry2, phot1, and phot2, by using combinatorial multiple mutants in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8), pp.2223–8.
- Ohgishi, M. et al., Negative autoregulation of the Arabidopsis homeobox gene ATHB-2.
- Parks, B.M. & Quail, P.H., 1993. hy8, a new class of arabidopsis long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *The Plant cell*, 5(1), pp.39–48.
- Pauwels, L. et al., 2010. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature*, 464(7289), pp.788–91.
- Pfluger, J. & Zambryski, P., 2004. The role of SEUSS in auxin response and floral organ patterning.

- Development (Cambridge, England), 131(19), pp.4697–707.
- Quail, P. et al., 1995. Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science*, 268(5211), pp.675–680.
- Quail, P.H., 2002. PHYTOCHROME PHOTSENSORY SIGNALLING NETWORKS. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(2), pp.85–93.
- Quail, P.H., 2010. Phytochromes. *Current biology : CB*, 20(12), pp.R504-7.
- Quail, P.H. et al., 1994. The phy Gene Family: Function and Expression. In *Plant Molecular Biology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 391–400.
- Quail, P.H., 1997. The phytochromes: A biochemical mechanism of signaling in sight? *BioEssays*, 19(7), pp.571–579.
- Quail, P.H., Ni, M. & Tepperman, J.M., 1999. Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature*, 400(6746), pp.781–784.
- Rajani, S. & Sundaresan, V., 2001. The Arabidopsis myc/bHLH gene ALCATRAZ enables cell separation in fruit dehiscence. *Current biology : CB*, 11(24), pp.1914–22.
- Reed, J.W. et al., 1993. Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development. *The Plant cell*, 5(2), pp.147–57.
- Reed, J.W. et al., 1994. Phytochrome A and Phytochrome B Have Overlapping but Distinct Functions in Arabidopsis Development. *Plant physiology*, 104(4), pp.1139–1149.
- Reymond, M.C. et al., 2012. A Light-Regulated Genetic Module Was Recruited to Carpel Development in Arabidopsis following a Structural Change to SPATULA. *The Plant Cell*, 24(7), pp.2812–2825.
- Rockwell, N.C. & Lagarias, J.C., 2006. The structure of phytochrome: a picture is worth a thousand spectra. *The Plant cell*, 18(1), pp.4–14.
- Roig-Villanova, I. et al., 2006. Identification of primary target genes of phytochrome signaling. Early transcriptional control during shade avoidance responses in Arabidopsis. *Plant physiology*, 141(1), pp.85–96.
- Roig-Villanova, I. et al., 2007. Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins. *The EMBO journal*, 26(22), pp.4756–67.
- Roig-Villanova, I. & Martínez-García, J.F., 2016. Plant Responses to Vegetation Proximity: A Whole Life Avoiding Shade. *Frontiers in Plant Science*, 7, p.236.
- Ryu, H. et al., 2014. Control of early seedling development by BES1/TPL/HDA19-mediated epigenetic regulation of ABI3. *Nature communications*, 5, p.4138.
- Ryu, J.S. et al., 2005. Phytochrome-Specific Type 5 Phosphatase Controls Light Signal Flux by Enhancing Phytochrome Stability and Affinity for a Signal Transducer. *Cell*, 120(3), pp.395–

406.

- Sadanandom, A. et al., 2015. SUMOylation of phytochrome-B negatively regulates light-induced signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(35), pp.11108–13.
- Saijo, Y. et al., 2008. *Arabidopsis* COP1/SPA1 Complex and FHY1/FHY3 Associate with Distinct Phosphorylated Forms of Phytochrome A in Balancing Light Signaling. *Molecular Cell*, 31(4), pp.607–613.
- Saiki, R.K. et al., 1989. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(16), pp.6230–4.
- Salla-Martet, M., 2012. Control hormonal i genètic de la síndrome de fugida de l'ombra en *arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral.
- Salter, M.G., Franklin, K.A. & Whitelam, G.C., 2003. Gating of the rapid shade-avoidance response by the circadian clock in plants. *Nature*, 426(6967), pp.680–683.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (David W., 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawa, S. et al., 2002a. 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*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 32(6), pp.1011–22.
- Sawa, S. et al., 2002b. 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*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 32(6), pp.1011–22.
- Schena, M., Lloyd, A.M. & Davis, R.W., 1993. The HAT4 gene of *Arabidopsis* encodes a developmental regulator. *Genes & development*, 7(3), pp.367–79.
- Seo, H.S. et al., 2004. Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes & development*, 18(6), pp.617–22.
- Sessa, G. et al., 2005. A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 19(23), pp.2811–2815.
- Shalitin, D. et al., 2002. Regulation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature*, 417(6890), pp.763–767.
- Sharrock, R.A. & Clack, T., 2002. Patterns of expression and normalized levels of the five *Arabidopsis* phytochromes. *Plant physiology*, 130(1), pp.442–56.
- Shen, H. et al., 2008. Light-Induced Phosphorylation and Degradation of the Negative Regulator PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 from *Arabidopsis* Depend upon Its Direct Physical Interactions with Photoactivated Phytochromes. *THE PLANT CELL ONLINE*, 20(6), pp.1586–

- 1602.
- Shen, Y. et al., 2007. Phytochrome Induces Rapid PIF5 Phosphorylation and Degradation in Response to Red-Light Activation. *PLANT PHYSIOLOGY*, 145(3), pp.1043–1051.
- Silverstein, R.A. & Ekwall, K., 2005. Sin3: a flexible regulator of global gene expression and genome stability. *Current Genetics*, 47(1), pp.1–17.
- Sitaraman, J., Bui, M. & Liu, Z., 2008. LEUNIG_HOMOLOG and LEUNIG perform partially redundant functions during Arabidopsis embryo and floral development. *Plant physiology*, 147(2), pp.672–81.
- Smith, H., 1982. Light Quality, Photoperception, and Plant Strategy. *Annual Review of Plant Physiology*, 33(1), pp.481–518.
- Smith, H., 2000. Phytochromes and light signal perception by plants--an emerging synthesis. *Nature*, 407(6804), pp.585–591.
- Smith, H. & Whitelam, G.C., 1997. The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant Cell and Environment*, 20(6), pp.840–844.
- Somers, D.E. et al., 1991. The hy3 Long Hypocotyl Mutant of Arabidopsis Is Deficient in Phytochrome B. *THE PLANT CELL ONLINE*, 3(12), pp.1263–1274.
- Song, C.-P. & Galbraith, D.W., 2006. AtSAP18, An Orthologue of Human SAP18, is Involved in the Regulation of Salt Stress and Mediates Transcriptional Repression in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 60(2), pp.241–257.
- Sorin, C. et al., 2009a. ATHB4, a regulator of shade avoidance, modulates hormone response in Arabidopsis seedlings. *The Plant Journal*, 59(2), pp.266–277.
- Sorin, C. et al., 2009b. ATHB4, a regulator of shade avoidance, modulates hormone response in Arabidopsis seedlings. *The Plant Journal*, 59(2), pp.266–277.
- Sridhar, V. V et al., 2004. Transcriptional repression of target genes by LEUNIG and SEUSS, two interacting regulatory proteins for Arabidopsis flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(31), pp.11494–9.
- Stacey, M.G. et al., 2006. Expression analyses of Arabidopsis oligopeptide transporters during seed germination, vegetative growth and reproduction. *Planta*, 223(2), pp.291–305.
- Steindler, C. et al., 1999. Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development (Cambridge, England)*, 126(19), pp.4235–45.
- Sultan, S.E. & Schmitt, J., 2000. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in plant science*, 5(12), pp.537–42.
- Szemenyei, H., Hannon, M. & Long, J.A., 2008. TOPLESS Mediates Auxin-Dependent Transcriptional Repression During Arabidopsis Embryogenesis. *Science*, 319(5868),

- pp.1384–1386.
- Tao, Y. et al., 2008. Rapid Synthesis of Auxin via a New Tryptophan-Dependent Pathway Is Required for Shade Avoidance in Plants. *Cell*, 133(1), pp.164–176.
- Tiley, L.S. et al., 1992. The VP16 transcription activation domain is functional when targeted to a promoter-proximal RNA sequence. *Genes & development*, 6(11), pp.2077–87.
- Toledo-Ortiz, G. et al., 2010. Subcellular Sites of the Signal Transduction and Degradation of Phytochrome A. *Plant and Cell Physiology*, 51(10), pp.1648–1660.
- Tron, A.E. et al., 2002. Redox regulation of plant homeodomain transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), pp.34800–34807.
- Turchi, L. et al., 2013. Arabidopsis HD-Zip II transcription factors control apical embryo development and meristem function. *Development*, 140(10), pp.2118–2129.
- Turchi, L. et al., 2015. Interplay of HD-Zip II and III transcription factors in auxin-regulated plant development. *Journal of experimental botany*, 66(16), pp.5043–53.
- Wang, L., Kim, J. & Somers, D.E., 2013. Transcriptional corepressor TOPLESS complexes with pseudoresponse regulator proteins and histone deacetylases to regulate circadian transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(2), pp.761–6.
- Whitelam, G.C., 1993. Phytochrome A Null Mutants of Arabidopsis Display a Wild-Type Phenotype in White Light. *THE PLANT CELL. ONLINE*, 5(7), pp.757–768.
- de Wit, M., Ljung, K. & Fankhauser, C., 2015. Contrasting growth responses in lamina and petiole during neighbor detection depend on differential auxin responsiveness rather than different auxin levels. *The New phytologist*, 208(1), pp.198–209.
- Wu, G. & Spalding, E.P., 2007. Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of Arabidopsis seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47), pp.18813–8.
- Yamashino, T. et al., 2003. A Link between circadian-controlled bHLH factors and the APRR1/TOC1 quintet in Arabidopsis thaliana. *Plant & cell physiology*, 44(6), pp.619–29.
- Yanovsky, M.J., Casal, J.J. & 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 and Environment*, 18(7), pp.788–794.
- Yu, X. et al., 2010. The Cryptochrome Blue Light Receptors. *The Arabidopsis book*, 8, p.e0135.
- Zhu, Y. et al., 2000. Phytochrome B binds with greater apparent affinity than phytochrome A to the basic helix-loop-helix factor PIF3 in a reaction requiring the PAS domain of PIF3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), pp.13419–13424.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

~	Aproximado		
λ	Longitud de onda		
%	Porcentaje	2,4-D	Ácido 2,4-diclorfenoxiacético
AD	Dominio de Activación	mL	Mililitros
AmpR	Resistencia a ampicilina	mm	Milímetros
APB	Motivo de unión a phyB	mRNA	RNA mensajero
ATHB4	<i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> <i>HOMEBOX PROTEIN 4</i>	mV	Milivots
ATHB2	<i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> <i>HOMEBOX PROTEIN 2</i>	ng	Nanogramos
Aux	Auxinas	NPA	Ácido naftiltalamico
B	Luz azul	Nt	Región N-terminal
Bc	Luz azul continua	NLS	Señal de localización nuclear
BD	Dominio de unión al DNA	O/N	Toda la noche
BRs	Brasinosteroides	p	Promotor
cDNA	DNA complementario	PAR	<i>Phytochrome Rapidly Regulated</i>
Cm	Centímetro	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Ct	Región C terminal	Pfr	Forma activa de los fitocromos
D	Oscuridad	Phot	Fototropinas
DEX	Dexametasona	phy	Fitocromos
DNA	Ácido desoxiribonucleico	PIFs	<i>Phytochrome Interacting Factor</i>
dNTP	desoxiribonucleótido	PIL1	<i>Phytochrome interacting factor-like 1</i>
EMS	Etil Meta sulfonato	Pr	Forma inactiva de los fitocromos
EOD-FR	Luz roja lejana al final del día	Ppt	Basta
FR	Luz roja lejana	R	Luz roja
FRc	Luz roja lejana continua	Rc	Luz roja continua
g	Gramos	R:FR	Razón entre luz roja y luz roja lejana
GAs	Giberalinas	RNA	Ácido ribonucleico
GR	Receptor de glucocorticoides	RNAi	RNA interferente
h	Horas	rpm	Revoluciones por minuto
HAT2	<i>Homeobox-leucine zipper protein HAT2</i>	RT	Temperatura ambiente
HD	Homeodominio	RT-qPCR	Retrotranscripción por PCR
HD-Zip	Homeodominio Zip	SAS	Síndrome de la huida de la sombra
HKRD	Dominio histidina quinasa	SAUR	<i>Small- Auxin Up-RNA</i>
HygR	Resistencia a higromicina	SD	Día corto
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido	Seg	Segundos
kDa	kilodalton	t-DNA	DNA transferencia
Km	kanamicina	T^a	Temperatura
KmR	Resistencia a kanamicina	Tm	Temperatura de melting
kV	kilovolt	V	Volts
L	Litros	vs	<i>versus</i>
LD	Día largo	v/v	Relación volúmen volumen
Long	Longitud	v/p	Relación volúmen peso
M	Molar	W	Luz blanca
mg	Miligramos	Wc	Luz blanca
μg	Microgramos	W+FR	Sombra simulada
μL	Microlitros		
μm	Micromolar		
min	Minutos		

Secuencias aminoacídicas:

F Phe, fenilalanina
S Ser, serina
Y Tyr, tirosina
K Lys, lisina
W Trp, triptófano
L Leu, leucina
P Pro, prolina
H His, histidina
D Asp, ácido aspártico
R Arg, arginina

I Ile, isoleucina
T Thr, treonina
Q Gln, glutamina
E Glu, ácido glutámico
G Gly, glicina
M Met, metionina
A Ala, alanina
N Asn, asparagina
C Cys, cisteína
V Val, valina

