

5. DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

El clon PHOR1 (per *Photoperiod responsive 1*) es va aïllar en un crivellatge diferencial per RT-PCR *differential display* entre fulles de plantes salvatge de patatera *S. demissum* crescudes sota condicions inductores (SD) i no inductores (SD+NB) de la tuberització. Les patateres *S. demissum* i moltes de les varietats de *S. tuberosum* ssp. *andigena* són estrictament fotoperiòdiques per a la tuberització, i tuberitzen exclusivament en condicions de SD. Les condicions de fotoperíode són percebudes per les fulles les quals, en condicions favorables, sintetitzen un estímul inductor de la tuberització que es transportat als estolons per a induir la formació de tubèrculs. Els missatgers expressats a nivells més elevats en les fulles de les plantes crescudes en SD estarien per tant implicats en la síntesi d'aquest estímul inductor, o en els canvis que ocorren en les fulles per tal d'ajustar l'eficiència de fotosíntesi a l'increment en la demanda de fotoassimilats que representen els tubèrculs en formació. El clon *PHOR1* corresponia a un transcrit de 1.5 Kb amb una expressió més abundant a les fulles de les plantes crescudes en condicions inductores per a la tuberització (SD) que a les crescudes en condicions no inductores de LD. Mitjançant el crivellatge d'una llibreria de cDNA de *S. demissum* s'aïllà un cDNA complet amb un insert de 1492 pb, el qual inclou una pauta oberta de lectura de 1260 pb (el número d'accés d'aquesta seqüència és AJ306423). Aquest cDNA conté un triplet de parada 9 nucleòtids en front de l'ATG, el que és indicatiu de que correspon a un còpia sencera del mRNA. L'anàlisi *Southern*, demostrà que aquest gen és present en un baix número de còpies (un màxim de 3 gens) als genomes de *S. demissum* i *S. tuberosum* ssp. *andigena*. D'altre banda, l'anàlisi *northern* va mostrar que el gen és actiu a tots el teixits de la planta. A les plantes no induïdes per a la tuberització (LD) els nivells de transcrit són relativament baixos a fulles i tiges,

moderats a estolons i elevats a les arrels. També es detecten nivells moderats de transcrit als tubèrculs, flors i fruits madurs. Els nivells de mRNA són superiors a tots el teixits de les plantes crescudes en condicions inductores per a la tuberització (SD) excepte a les arrels. També es va observar que els nivells d'expressió d'aquest transcrit mostrava una forta dependència de la llum. Els nivells d'expressió a fulles, tiges i en menor grau a estolons variaven al llarg del dia, els nivells de *PHORI* mRNA essent alts a primera hora del dia (un hora després d'encendre les llums) i disminuint tot seguit, fins arribar a ser indetectables al final del període de llum. L'anàlisi dels nivells de mRNA, mitjançant una cinètica d'expressió al llarg de 24 hores, en fulles de plantes crescudes en condicions de SD i SD+NB, va mostrar un pic d'acumulació del RNA missatger a l'inici del període de llum, immediatament després d'encendre les llums, tant en condicions de SD com de SD+NB. En condicions de SD s'observà també un segon pic d'expressió just a l'inici del període fosc, després d'apagar les llums, el qual no es detecta a les plantes crescudes en condicions de SD+NB, tot i que aquestes sí mostren un petit pic de mRNA després del NB. Aquest resultat demostra que l'expressió de *PHORI* presenta un ritme diürn, amb oscil·lacions característiques depenent de que les plantes s'hagin crescut en condicions de SD o SD+NB, sent per tant fortament depenent del fotoperíode.

Les plantes transgèniques portadores d'una construcció antisentit del cDNA *PHORI* (α -*PHORI*) amb nivells reduïts d'expressió d'aquest transcrit (presenten en LD un fenotip semi-nan degut a una reducció en la llargària dels entrenusos a la part apical de la tija. Aquest fenotip és semblant al de les plantes transgèniques amb nivells reduïts d'expressió del transcrit *StGA20ox1* que codifica l'enzim GA 20-oxidasa (Carrera et al., 2000). En efecte, igual que s'ha observat per les plantes antisentit per l'enzim GA 20-oxidasa, en condicions inductores de la tuberització (SD) les plantes α -*PHORI* formen tubèrculs abans que les plantes salvatges, tuberitzant ja als 15 dies, mentre que les salvatges requereixen 21 dies per a induir la tuberització. Alhora, el número de tubèrculs és major a les plantes α -*PHORI*, el que estaria d'acord amb que aquestes plantes presenten un bloqueig en la síntesi o en la resposta a les hormones GAs. Dades preliminars apuntaven en aquesta direcció ja que s'observà que el fenotip semi-nan de les plantes α -*PHORI* revertia quan eren tractades amb concentracions saturants de GA₃. D'altre banda, hi ha forces dades experimentals que posen en evidència la implicació de les GAs en el procés d'allargament de la tija i de formació de tubèrculs a patatera. Apart

de les dades derivades de les plantes transgèniques portadores de la construcció antisentit pel gen GA 20-oxidasa (Carrera *et al.*, 1999), s'ha descrit un mutant biosintètic a patatera, anomenat *gal*, el qual presenta un bloqueig en el pas de 13-hidroxilació que catalitza la conversió de GA₁₂ en GA₅₃ (Bamberg i Hanneman, 1991). Les plantes mutants *gal* són totalment nanes i poden formar tubèrculs en condicions no inductores de LD, encara que en aquestes condicions necessiten molt de temps per a tuberitzar. Aquest fet semblaria indicar que existeix una relació entre el control fotoperiòdic de la tuberització i les GAs, ambdues vies de transducció del senyal tenint algun punt de convergència. En efecte, els resultats obtinguts amb les plantes *S. tuberosum* ssp. *andigena* transgèniques portadores de la construcció antisentit pel gen *phyB*, amb nivells reduïts d'acumulació d'aquest fotoreceptor així ho confirmen. Aquestes plantes tuberitzen sota qualsevol condició fotoperiòdica, i presenten un fenotip allargat com si haguessin estat tractades amb GAs, alhora que presenten nivells elevats d'expressió del transcrit *StGA20ox1* (Jackson *et al.*, 2000). Per tant, aquests resultats suggeririen que PHYB mediarà el control fotoperiòdic de la tuberització, a través de la inducció de canvis bé en la biosíntesi, en el metabolisme i/o en la sensibilitat a GAs (Kamiya i García-Martínez. 1999).

Malgrat que totes aquestes evidències semblarien recolzar la hipòtesi que el fenotip semi-nan de les plantes α -*PHOR1* és originat per un bloqueig en algun pas de la ruta de biosíntesi de GAs, altres aspectes serien més aviat indicatius d'un paper de la proteïna PHOR1 com a intermediari en la resposta a aquestes hormones. Per exemple, les plantes α -*PHOR1* mostren un fenotip semi-nan en condicions de LD, però reverteixen a un fenotip normal quan són traslladades a condicions fotoperiòdiques de SD (inductores per a la tuberització). Aquest fenotip és difícil d'explicar en termes d'una activitat biosintètica, a no ser que assumim que existeix una segona còpia gènica la qual s'activa únicament en condicions de SD.

1.1 PHOR1 no presenta similitud amb cap dels enzims biosintètics de GAs coneguts.

Recentment, s'ha clonat nombrosos gens corresponents als enzims implicats en la ruta de biosíntesis de les GAs. S'han caracteritzat els enzims implicats en la majoria dels passos de síntesis, restant només per aïllar els gens que codifiquen per a les monoxigenases responsables de la conversió de l'*ent*-kaurenoic a *ent*-7-hidroxi-kaurenoic i la conversió d'aquest a GA₁₂-aldehid. La comparació de seqüències aminoacídiques dels enzims biosintètics de diferents espècies vegetals ha mostrat l'elevada similitud que existeix entre ells, el que ha permès d'identificar una sèrie de dominis o residus característics conservats per exemple entre totes les dioxigenases de la ruta de biosíntesi de les GAs (De Carolis i De Luca, 1994; Xu et al., 1995; Wu *et al.*, 1996; García-Martínez *et al.*, 1997; Heden i Phillips, 2000). La comparació de la seqüència aminoacídica deduïda a partir del clon *PHOR1* amb les seqüències aminoacídiques dels enzims biosintètics coneguts, va mostrar que *PHOR1* no presentava cap similitud o domini conservat en comú amb aquests enzims, ni cap domini característic que fes pensar que podria correspondre a una monoxigenasa de tipus P-450 implicada en els passos de conversió de l'*ent*-kaurenoic a GA₁₂ aldehid. Per tant, semblaria que *PHOR1* no correspon a un enzim biosintètic de les GAs, tot i que el fenotip de les plantes transgèniques, i el fet que aquest fenotip pot revertir-se per aplicació exògena de GA₃ així ho suggerien.

1.2. Les plantes transgèniques α -*PHOR1* presenten una sensibilitat reduïda a les GAs.

Tal i com hem vist a la introducció, els mutants de GAs es divideixen en tres grups coneguts com a mutants biosintètics, mutants allargats i mutants insensibles.

Els mutants biosintètics o deficients en GAs, on s'inclou el mutant nan de patata *gal*, es caracteritzen per presentar mutacions que afecten algun dels gens que codifiquen pels enzims de la ruta de síntesi. Aquests mutants presenten nivells reduïts de GA₁ (producte final de la via), i els efectes de la mutació com per exemple la reducció en la llargària dels entrenusos, són revertits totalment per aplicació exògena de GAs. L'expressió dels gens biosintètics GA 20-oxidasa i GA 3-hidroxilasa, regulats per retroalimentació

negativa, es veu incrementada en aquests mutants, perquè els nivells de GA₁ són menors. L'aplicació exògena de GAs, d'altre banda, redueix l'expressió d'aquests gens.

Els mutants allargats estan causats per mutacions recessives i es caracteritzen per mostrar un fenotip allargat, al mateix temps que presenten una reducció en els nivells endògens de GAs. Aquests mutants alhora són insensibles a l'aplicació de GAs exògenes i resistents a l'aplicació d'inhibidors dels enzims biosintètics, comportant-se per tant com si estiguessin sobresaturats en aquestes hormones. S'ha vist que aquests mutants estan afectats en algun dels passos de la via de transducció del senyal de les GAs. El fet que algunes d'aquestes mutacions reverteixen el fenotip causat pels mutants biosintètics confirmaria aquesta observació, actuant els seus productes gènics com a reguladors negatius de la ruta de senyalització de les GAs.

Els mutants insensibles són mutants fenotípicament idèntics als mutants biosintètics i presenten també nivells elevats dels transcrits corresponents als enzims GA 20-oxidasa i GA 3 -hidroxilasa. A diferència dels mutants biosintètics el fenotip d'aquest mutants no és revertit per l'aplicació exògena de GAs i tampoc ho són els nivells elevats d'expressió dels missatgers corresponents als enzims GA 20-oxidasa i GA 3 -hidroxilasa. Aquests mutants presenten nivells alts de GAs endògenes, degut a que presenten nivells incrementats d'expressió dels enzims biosintètics. Aquestes mutacions afecten o bé la percepció per la cèl.lula o la sensibilitat a les GAs, o algun pas en la via de transducció del senyal de les GAs. S'ha vist que molts dels productes gènics afectats per aquestes mutacions actuen com a reguladors negatius de la via de senyalització de les GAs.

- **Les línies *α-PHORI* requereixen concentracions més elevades de GAs que les plantes silvestres per a induir el creixement de la tija.**

La caracterització de mutants afectats en la síntesi o resposta a les GAs ha demostrat el paper rellevant d'aquestes hormones en molts dels processos de creixement i desenvolupament de les plantes superiors, controlant entre d'altres l'allargament de la tija, l'expansió de les fulles, la germinació de les llavors i la floració. Estudis en que s'ha analitzat la resposta induïda per aplicació de GA₃ o dels diferents intermediaris de síntesi han estat crucials per a l'identificació dels mutants biosintètics, i la caracterització del pas de síntesi afectat. Recentment, la caracterització de nous mutants afectats en la resposta a GAs ha posat en evidència que molts d'ells presenten una resposta parcial o nula a l'aplicació exògena de GAs. Aquests mutants estan potencialment afectats en algun pas de la via de percepció o transducció del senyal de GAs i per tant mostren una alteració en la resposta específica a aquestes hormones (Ross *et al.*, 1997). Els estudis dosis-resposta basats en l'estudi del creixement de la planta induït en resposta a l'aplicació de concentracions creixents de la hormona, han mostrat constituir un excel·lent criteri per a diferenciar entre mutants biosintètics, i mutants afectats en la sensibilitat, senyalització o resposta a GAs. Així, corbes dosi-resposta dutes a terme amb els mutants nans de civada on es mesurà el màxim d'allargament de les fulles induïdes per diferents concentracions de GAs, va permetre classificar aquests mutants en tres classes (Chandler i Robertson, 1999). La primera classe respon a concentracions de GAs entre 10⁻⁸-10⁻⁶ M, igual que les plantes salvatges. En aquesta classe s'inclou el mutant *grd* (per *GA responsive dwarf*) que correspon a un mutant biosintètic bloquejat als passos inicials de la via (Grosslindermann *et al.*, 1992). La segona classe precisa de concentracions 100 cops més elevades de GAs (10⁻⁶-10⁻³ M) que les plantes salvatges per a donar la mateixa resposta. Aquí s'inclou el mutant *gse* (per *GA sensitivity*), el qual és defectiu en un component de la via de senyalització de les GAs. L'última classe, on s'inclou el mutant *elo* (*elongation*), que no respon a cap concentració de GAs. Aquesta classe inclou mutants defectius en algun procés específic requerit per l'allargament de les fulles.

Tenint en consideració aquests resultats, es va decidir tornar a avaluar la resposta de les plantes *α-PHORI* al tractament amb GAs, però utilitzant diferents concentracions de la hormona. Els resultats obtinguts d'aquests experiments dosi-resposta, demostren que les plantes *α-PHORI* presenten una resposta o sensibilitat reduïda a les GAs. Aquestes plantes presenten una llargària dels entrenusos de 3-4 cm front dels 6 cm que s'observen

a les plantes salvatges. L'aplicació de GA₃ indueix un increment gradual en la llargària dels entrenusos, més gran a mida que les concentracions de GAs són majors. No obstant, la concentració de GAs requerida per a induir un allargament de la tija en les plantes *α-PHORI* és dos ordres de magnitud major que la requerida per a produir la mateixa resposta a les plantes salvatges. En efecte, mentre que concentracions de 10⁻⁷-10⁻⁴ M GA₃ són suficients per a induir un allargament de la tija en les plantes salvatges, en les plantes *α-PHORI* es requereixen concentracions entre 10⁻⁵-10⁻⁴ M per a induir un creixement visible de la tija. Aquests resultats confirmarien que PHOR1 no és un enzim implicat en la ruta de biosíntesi de les GAs, doncs en aquest cas les plantes *α-PHORI* haurien de respondre a les mateixes concentracions de GAs que les plantes salvatges, i ho fan a concentracions 100 cops més elevades. D'altra banda, PHOR1 tampoc correspondria a una proteïna amb una funció específica en l'allargament de la tija, doncs les plantes transgèniques responen parcialment a l'aplicació de GAs i estan també afectades en altres processos de desenvolupament diferents de l'allargament de la tija (temps de tuberització, llargària i contingut en clorofil·la de les fulles, etc.). Aquests resultats mostren que les plantes *α-PHORI* presenten una sensibilitat reduïda a les GAs, molt semblant a la del mutant *gse* de civada, el que indicaria que PHOR1 és un possible component de la via de transducció del senyal de GAs.

- **Les plantes *α-PHORI* mostren nivells alterats d'expressió dels gens *StGA20ox1* i *StGA2ox***

El mutant insensible *gai* d'*Arabidopsis* presenta nivells elevats dels transcrits corresponents als gens biosintètics GA 20-oxidasa (*GA5*) i GA 3 -hidroxilasa (*GA4*). Els nivells d'aquests dos missatgers, per altre banda, no reverteixen en resposta a l'aplicació exògena de GAs, com succeeix als mutants biosintètics.

La caracterització d'altres mutants en la via de transducció del senyal de GAs, ha mostrat que aquests també presenten una alteració en la regulació per retroalimentació negativa de l'expressió dels gens biosintètics GA 20-oxidasa i GA 3 -hidroxilasa (Peng et al., 1997; 1999) i en la regulació per retroalimentació positiva del gen GA 2-oxidasa (Thomas et al., 1999). Aquests resultats suggereixen que les respostes de regulació de

l'expressió dels enzims biosintètics i d'allargament de la tija estarien regulades per la mateixa via de percepció i transducció del senyal en resposta a les GAs (Crowling *et al.*, 1998). L'increment dels nivells dels mRNAs GA 20-oxidasa i 3-hidroxilasa en aquests mutants no sembla venir donat per una disminució en els nivells endògens de GAs, ja que aquestes plantes presenten un contingut més elevat de GAs (Talon *et al.*, 1990). Al contrari, els nivells elevats dels mRNAs GA 20-oxidasa i GA 3-hidroxilasa semblen obeir a un bloqueig en la via de percepció i senyalització de les GAs, tal com ho indica el fet que l'aplicació exògena de GAs o d'inhibidors de la síntesi de GAs no varien els nivells d'aquests transcrits (Cowling *et al.*, 1998).

Els resultats obtinguts mitjançant experiments *northern*, en que els RNAs totals extrets de fulles de plantes salvatges i de les plantes α -*PHOR1*, es van hibridar amb les sòndes de cDNA corresponents als enzims biosintètics GA 20-oxidasa (*StGA20ox1*) i GA 2-oxidasa (*StGA2ox*), mostraren que les plantes transgèniques α -*PHOR1* presenten nivells elevats del transcrit *StGA20ox1* i nivells reduïts del transcrit *StGA2ox*, en comparació a les plantes salvatges. L'anàlisi dels nivells endògens de GAs, va mostrar que aquestes plantes acumulen nivells elevats de GAs en comparació a les plantes salvatges. Aquests resultats suggereixen que les plantes α -*PHOR1* presenten una alteració en la regulació dels gens biosintètics similar a la descrita per *gai* i, per tant, reforcen la hipòtesi que PHOR1 és una nova proteïna involucrada en la ruta de senyalització de les GAs. Seria bo comprovar si els tractaments amb GAs exògenes o tractaments amb inhibidors de la ruta de biosíntesi de GAs com l'ancimidol o el paclobutrazol, fan variar els nivells d'acumulació d'aquests transcrits, confirmant així un bloqueig de la regulació per retroalimentació d'aquests gens.

És important destacar que les plantes α -*PHOR1*, a més a més d'una disminució en la llargària dels entrenusos situats a la part apical de la planta, presenten una tuberització avançada, en condicions inductores de SD tuberitzant abans i donant un número major de tuberculs que les plantes salvatges. Aquestes plantes presenten també altres fenotips addicionals, com una relació menor entre la llargària/amplada dels folíols de les fulles (aquests són més amples), similar a l'observat en plantes transgèniques amb nivells reduïts del transcrit *StGA20ox1*. Les fulles d'aquestes plantes són també d'un color verd més fosc (major contingut en clorofil·la) i tenen un pecíol més curt, que les plantes

salvatges. Aquests caràcters se sap que són regulats per les GAs, el que seria indicatiu d'una funció general de PHOR1 en la senyalització de GAs.

D'altre banda, en els experiments d'hibridació *northern* amb cèl.lules BY2 de tabac, en que RNAs totals preparats a partir de suspensions control o de les suspensions que sobre-expressen la proteïna de fusió PHOR1:GFP, es van hibridar amb la sonda *NtGA2ox* de tabac corresponent al gen biosintètic GA 2-oxidasa, es va observar que l'expressió del missatger *NtGA2ox* era molt més elevada a les cèl.lules que sobre-expressen PHOR1. Aquest resultat seria indicatiu de que les cèl.lules BY2 que sobre-expressen la proteïna PHOR1:GFP són més sensibles als nivells endògens de GAs que les cèl.lules control, i com a resultat de la regulació per retroalimentació positiva del gen, aquestes cèl.lules acumularien nivells més alts del mRNA *NtGA2ox*. Aquest resultat posa en evidència de nou la funció de la proteïna PHOR1 en la via de percepció i/o senyalització de les GAs, alhora que demostra una funció reguladora positiva de PHOR1 en aquesta via.

L'expressió del gen *StGA20ox1* corresponent a l'enzim GA 20-oxidasa, mostra oscil·lacions durant els períodes de llum/foscor, presentant un ritme diürn característic controlat pel fotoperíode. Els canvis cíclics al llarg de 24 hores en els nivells de transcrit de *StGA20ox1* són possiblement causats per una regulació del gen per la llum, la qual resulta en un increment en els nivells d'expressió al llarg de les hores de dia. Això donaria lloc a una acumulació de GA₁ que assoliria nivells màxims ja entrat el període fosc, tot inhibint durant la segona meitat del període fosc l'expressió del gen *StGA20ox1*, per un mecanisme de retroalimentació negativa. A *Sorghum bicolor* s'ha observat que els nivells de GAs entre la GA₁₂ i GA₁, presenten oscil·lacions amb un ritme diürn característic. Els mutants *ma₃^R* de *S. bicolor*, deficientes en PHYB, presenten alteracions en els canvis cíclics dels nivells de GA₂₀, indicatius de canvis en els nivells d'expressió del gen GA 20-oxidasa, similars als observats pel transcrit *StGA20ox1* a les plantes transgèniques de patatera amb nivells reduïts de PHYB. Aquestes plantes presenten nivells elevats del transcrit *StGA20ox1* i variacions en les oscil·lacions rítmiques en els nivells d'expressió d'aquest transcrit, tot i que l'expressió d'aquest gen encara presenta regulació per retroalimentació negativa pel producte final de la via (Jackson *et al.*, 2000). Un resultat sensiblement diferent és l'obtingut a les plantes α -

PHOR1, les quals mostraren nivells més elevats del transcrit *StGA20ox1* que les plantes salvatges, a totes les hores del dia però molt especialment durant la segona meitat de la nit. És precisament en aquest període de la nit quan els alts nivells d'acumulació de GA₁ indueixen per retroalimentació negativa una disminució en l'expressió del gen. A les plantes α -*PHOR1* la sensibilitat a GAs està reduïda. Aquestes plantes no responen tant bé a l'increment en els nivells de GA₁ com les plantes salvatges i, per tant, la inhibició per retroalimentació negativa de l'expressió de *StGA20ox1* és menor. En aquestes plantes el transcrit *StGA20ox1* continua acumulant-se durant la segona meitat de la nit, observant-se a les 8h nivells de mRNA cinc cops més elevats que a les plantes control. Aquests resultats estan doncs d'acord amb que les plantes α -*PHOR1* presenten una sensibilitat reduïda a les GAs, degut a un bloqueig en la ruta de senyalització d'aquestes hormones.

L'expressió de *PHOR1* mostra també oscil·lacions al llarg del dia, amb un ritme diürn caracteritzat per diferents pics d'expressió en condicions de SD o SD+NB, indicatiu de que l'expressió d'aquest gen és fortament depenent de les condicions de llum o de fotoperíode. Si comparem el ritme diürn d'acumulació durant les 24 hores d'aquests transcrits s'observa que l'increment d'expressió d'un coincideix amb la davallada d'expressió de l'altre. Els pics màxims d'acumulació de *PHOR1* coincideixen amb els punts de mínima expressió de *StGA20ox1* i al revés. Aquesta observació, junt amb el fet que el ritme diürn d'expressió de *StGA20ox1* es troba alterat a les plantes transgèniques α -*PHOR1*, suggereix que possiblement *PHOR1* és un element integrador entre la via de senyalització del fotoperíode i les GAs.

- **Les plantes transgèniques α -*PHOR1* presenten un increment en els nivells endògens de GAs.**

La determinació dels nivells endògens de GAs a les plantes α -*PHOR1* va posar en evidència que aquestes plantes tenen un contingut elevat en GAs en comparació a les plantes control. Cal destacar però que els nivells de GA₂₀, a les línies transgèniques α -*PHOR1* són de quatre a sis cops més elevats que els de les plantes salvatges, vers a uns nivells de GA₁ que són significativament iguals als d'aquestes. Aquests resultats suggereixen que, a patatera, l'expressió del gen GA 3 -hidroxilasa (*StGA3ox*), no és tan fortament subjecte a regulació negativa per GAs, com ho és l'expressió del gen biosintètic *StGA20ox1*. Això faria que mentre que els nivells de *StGA20ox1* estarien incrementats a les plantes α -*PHOR1*, el que resultaria en una acumulació de GA₂₀ en aquestes plantes. L'expressió de *StGA3ox* no es veuria sensiblement afectada, essent els nivells d'aquest transcrit essent significativament iguals als de les plantes salvatges. A patatera s'han aïllat dos gens *StGA3ox*: *StGA3ox1* i *StGA3ox2*. Pel gen *StGA3ox1* s'ha demostrat que els nivells de transcrit es troben incrementats als mutants nans *gal1*, i que disminueixen per aplicació exògena de GA₃, el que demostra que aquest gen sí està negativament regulat per GAs (Bou, 2000). No es tenen però dades sobre el gen *StGA3ox2* i per tant podria ser que aquest gen no estès regulat per GAs. De fet, com s'ha mostrat a la introducció, el control de l'expressió dels gens dioxigenases és molt complex. La regulació dels nivells d'expressió de les diferents dioxigenases depèn de les condicions de llum, dels nivells de GAs, i del teixit i estadi de desenvolupament de la planta, entre d'altres. Per tant, aquests gens semblarien estar controlats per diferents elements en les vies de senyalització de la llum i les GAs. D'altre banda, s'ha observat a més d'una espècie que les diferents còpies gèniques que codifiquen per un mateix enzim són sovint regulades de manera diferent per la llum o retroalimentació negativa per GAs. Per tant, caldria comparar els nivells dels transcrits *StGA3ox1* i *StGA3ox2* i estudiar les seves cinètiques d'expressió al llarg de 24 hores, en plantes salvatges i les plantes transgèniques α -*PHOR1*, per tal de veure com varien en aquestes plantes. Si els nivells de transcrit *StGA3ox2* són normals en aquestes plantes, estaria indicant que la via de senyalització de les GAs, en la que participaria PHOR1, no controlaria l'expressió d'aquest gen.

- **PHOR1 és un possible element integrador entre les vies de senyalització del fotoperíode i les GAs.**

Mitjançant experiments *northern* hem pogut observar que l'expressió de *PHOR1* presenta oscil·lacions al llarg del dia amb un ritme diürn caracteritzat per diferents pics d'acumulació en condicions de SD i SD+NB, el que indica una dependència del fotoperíode. Els nivells de transcrit *PHOR1*, així com els nivells de proteïna són, per altre banda, superiors a les plantes crescudes en condicions de SD. Per tant, és possible que la regulació de l'expressió de *PHOR1* estigui relacionada amb el control de la inducció de la tuberització. Com hem vist a la introducció, hi ha evidències que indiquen que tant la inducció de la tuberització com de la floració, processos ambdós sota una forta dependència del fotoperíode, estan en part mitjançades per canvis en els nivells i/o sensibilitat a les GAs. Al llarg d'aquest treball hem demostrat que les plantes amb una reducció en els nivells de PHOR1 mostren també una menor sensibilitat a les GAs, per tant és possible que les diferències observades en els nivells d'acumulació de PHOR1, entre plantes crescudes en SD o SD+NB, formin part d'un mecanisme per integrar el fotoperíode i la senyalització de les GAs.

No obstant, el fet de que les plantes transgèniques amb nivells reduïts de PHOR1 tuberitzin en condicions inductores de SD abans que les plantes salvatges, no estaria d'acord amb el fet de que en aquestes últimes, els nivells d'acumulació de PHOR1 són majors en les plantes crescudes en condicions inductores de la tuberització (SD) que en les crescudes en condicions no inductores de LD. Tot i que existeix una alta probabilitat que PHOR1 jugui un paper important en el control fotoperiòdic de la tuberització, els mecanismes de regulació implicats en aquest control són encara obscurs. De fet, les plantes α -*PHOR1* malgrat presentar un fenotip semi-nan molt evident en LD o en SD+NB, en SD reverteixen a un fenotip normal, mostrant una llargària dels entrenusos similar al de les plantes salvatges. De moment, no es tenen dades que puguin explicar aquesta observació. Caldrà realitzar més estudis amb aquestes plantes, crescudes tant en condicions de SD com de SD+NB o LD, per tal d'obtenir alguna indicació de quin podria ser el mecanisme responsable d'aquest creixement diferencial. En aquest sentit, serà força interessant d'estudiar les possibles modificacions post-traduccionals (fosforilació, etc.) de la proteïna PHOR1, així com les interaccions amb d'altres proteïnes, per veure com aquestes es correlacionen amb les condicions de fotoperíode, i amb la resposta a GAs.

Per altre banda, hi ha forces evidències que indiquen que el transport de GAs o d'un regulador de la síntesis de GAs des de les fulles als estolons, representa una part

important dels mecanismes implicats en la regulació fotoperiòdica de la tuberització. Les plantes transgèniques amb nivells reduïts de PHYB, per exemple, presenten a fulla nivells elevats d'expressió del transcrit *StGA20ox1* i alts nivells de GA₁. Les plantes α -PHYB tenen un fenotip allargat i un menor contingut en clorofil·les, però tuberitzen independentment del fotoperíode, formant tubèrculs tan en SD com en SD+NB o LD. Curiosament, les plantes crescudes en condicions inductores de SD presenten a les parts aèries de la planta (àpex, fulles, tija i nusos) nivells majors d'acumulació del transcrit *StGA3ox1* que les plantes crescudes en condicions no inductores de LD o SD+NB (Bou, 2000). Als estolons, es dóna en canvi la situació contrària, ja que no es detecta el missatger *StGA3ox1* en condicions inductores de SD, però s'observa una forta acumulació d'aquest transcrit en plantes crescudes en condicions no inductores de SD+NB. Aquestes resultats són consistents amb les dades que demostraven que durant la inducció de la tuberització els nivells de GAs actives a la punta dels estolons baixen considerablement, i que en canvi es mantenen elevats en condicions no inductores. A més a més, s'ha vist que la GA₁ produïda a les fulles com a resultat de l'activitat GA 3 -hidroxilasa, no sembla ser una GA mòbil que s'exporta a la resta de la planta, sinó que té una actuació local essent ràpidament inactivada a GA₈ per acció de la GA 2-oxidasa (Bou, 2000). Per tant només la GA₁ directament produïda a l'estoló inhibiria la formació del tubèrcul. Tots aquests resultats demostren que el procés d'inducció de la tuberització està controlat per un mecanisme de regulació complex on els nivells i la sensibilitat a les GAs hi juguen un paper important juntament amb el transport de les GAs o d'algun regulador de la biosíntesi i/o sensibilitat d'aquestes hormones des de les fulles fins als estolons,. El fenotip observat a les plantes α -PHYB, juntament amb els resultats dels experiments en que es varen empeltar fulles de les plantes α -PHYB en plantes salvatges no induïdes per a la tuberització, i viceversa, semblarien indicar que el PHYB és en últim terme el responsable del control d'aquests canvis en resposta a les condicions de fotoperíode. En condicions no inductores, PHYB estimularia el transport des de les fulles als estolons bé d'alguna GA o d'algun regulador de la biosíntesi o de l'acció de les GAs, sent aquest el possible senyal transmissible inhibidor de la tuberització regulat per aquest fotoreceptor.

En un futur, la determinació dels nivells de GAs tan a les fulles, com a la tija i als estolons de les plantes transgèniques α -PHYB, en comparació amb les plantes salvatges,

permetrà de comprovar el control que PHYB exerceix sobre les GAs, en quant al seu transport. Per altre part, l'anàlisi dels nivells d'expressió de PHOR1 al les fulles i estolons de les plantes α -PHYB ajudaria a confirmar si PHOR1 té un paper important en la senyalització de les GAs i possiblement en el control fotoperiòdic de la tuberització, actuant com a element integrador entre aquestes dues vies (fotoperíode i GAs).

2. PHOR1 té un domini *armadillo* responsable de la migració de la proteïna al nucli i un domini N-terminal CPI que en absència de GAs reté la proteïna al citoplasma.

La comparació de la seqüència aminoacídica de la proteïna PHOR1 amb el banc de dades van revelar que aquesta proteïna conté un domini *armadillo* amb 7 motius repetits al seu extrem C-terminal, que presenta un 30% d'identitat amb el domini "*arm-repeat*" de la proteïna ARMADILLO de *Drosophila*. Els diferents motius repetits de PHOR1 conserven el consens descrit per aquest domini proteic, i malgrat que la similitud a nivell de seqüència aminoacídica no és molt elevada (la similitud entre el diferents dominis repetits d'ARMADILLO és només del 40%), la naturalesa química dels residus importants per a mantenir l'estructura superhèlix característica d'aquest domini, és molt conservada en tots els elements repetits.

El primer domini "*arm-repeat*" va ser descrit a la proteïna ARMADILLO de *Drosophila* (Riggelman *et al.*, 1989) que té un paper important en la determinació de la polaritat dels segments de l'abdomen durant el desenvolupament inicial de la larva de la mosca. Des de llavors, s'han identificat i clonat un gran número de proteïnes que contenen aquest domini. Entre elles la proteïna β -catenina humana, homòloga a la proteïna ARMADILLO de *Drosophila*, la Plakoglobina, i les β -importines, entre d'altres (Hatzfeld, 1999). A plantes, s'ha pogut comprovar que un gran número de ESTs mostren homologies amb aquest domini. El domini "*arm-repeat*" s'ha identificat també en algunes proteïnes per a les que es²¹⁹coneix la funció com les β -importina d'*Arabidopsis* (Harley *et al.*, 1997) i d'arròs (Kazuhiro *et al.*, 1998) o la proteïna ARC1 (*Arm Repeat Containing 1*) de *Brassica*, aïllada en un experiment de doble híbrid per a

cercar proteïnes que interaccionessin amb el domini quinasa del locus *S-receptor kinase* (SRK, Gu *et al.*, 1998). El domini "*arm-repeat*" és un domini d'interacció proteïna-proteïna, i moltes de les proteïnes que tenen un domini *armadillo* juguen un paper crucial en la coordinació i regulació d'importants processos cel·lulars donat a la seva capacitat d'interacció amb una elevada varietat de proteïnes diferents. Per exemple, la proteïna β -catenina és capaç d'interaccionar a través d'aquest domini amb la proteïna APC (*Adenomatous polyposis coli*), la família de factors de transcripció Tcf/LEF-1 i la E-cadherina, i a través d'aquestes interaccions exerceix un paper regulador important en la via de transducció del senyal Wnt/*Wingless* (Huber *et al.*, 1997).

El domini "*arm-repeat*" es caracteritza per presentar com a mínim cinc a sis còpies (en el cas de ARMADILLO/ β -catenina, 12 còpies) d'una seqüència de 42 aminoàcids, de similitud no gaire elevada (en alguns casos la similitud entre els diferents dominis repetits d'una mateixa proteïna és més baixa del 30%), però a la qual la naturalesa química d'alguns residus és altament conservada. Al consens descrit per aquests motius predomina un cor hidrofòbic, el qual és important per a mantenir una estructura d'hèlix superhèlix característica d'aquesta família de proteïnes. Actualment, s'ha resolt mitjançant raig X l'estructura tridimensional dels cristalls corresponents a les proteïnes β -catenina i β -karyophenin (o β -importines) (Huber *et al.*, 1997; Conti *et al.*, 1998), observant-se que el domini *armadillo* d'aquestes dues proteïnes es plega en una estructura tridimensional de tipus hèlix superhèlix pràcticament idèntica. L'estructura d'hèlix superhèlix d'aquestes proteïnes forma un ampli solc a la superfície que serveix com a lloc d'interacció amb moltes altres proteïnes. En el cas de la β -catenina aquest solc està carregat positivament, i és responsable de la interacció de β -catenina amb els dominis acídics d'APC, Tcf/LEF-1 i la E-cadherina. A les β -importines, en canvi, aquest solc està carregat negativament i és responsable de la interacció d'aquestes proteïnes amb les seqüències NLS (*Nuclear Localization Signal*) de diferents proteïnes, mitjançant el seu import cap a nucli (Conti *et al.*, 1998).

La proteïna ARMADILLO/ β -Catenina està involucrada en diferents processos de desenvolupament cel·lular en resposta al senyal Wnt/*Wingless*. La β -catenina forma part de les unions adherents, una de les estructures macromoleculares més importants alhora d'establir la correcta polaritat i l'arquitectura de les cèl·lules de l'epidermis. La β -catenina participa en la formació d'aquestes estructures mitjançant la interacció amb la

E-cadherina i la β -catenina, les quals per la seva part interaccionen amb el citoesquelet d'actina i amb la cèl·lula veïna a través d'un complex equivalent. Aquestes unions es desorganitzen quan es trenca la interacció E-cadherina/ β -catenina, com a conseqüència de la fosforilació de la β -catenina.

La proteïna homòloga de *Drosophila*, ARMADILLO, es troba també associada a les unions adherents en cèl·lules que no han rebut el senyal Wnt/*Wingless*. En resposta la glicoproteïna soluble *Wingless*, s'inicia però una cascada de senyalització que resulta en l'estabilització d'ARMADILLO al citosol, i la seva posterior migració al nucli, a on conjuntament amb els factors de transcripció Tcf/LEF-1 inicia la transcripció dels gens regulats per *Wingless*. L'estabilització d'ARMADILLO es dona gràcies a la hiperfosforilació de Dsh (*Dishevelled*), que inhibeix la funció de la Ser/Thr kinasa *glycogen synthase kinase-3* (GSK-3) /zeste white 3 (Zw3). La inhibició de GSK-3 dona lloc a una acumulació de la proteïna ARMADILLO al citosol, i la seva relocalització al nucli on interacciona amb els factors de transcripció TCF (*T-Cell Factor*) actuant com a co-activadors transcripcionals d'aquests factors HMG-box (van de Wetering et al., 1997). A les cèl·lules que no han rebut el senyal de Wnt/*Wingless* la proteïna GSK-3 està activa i fosforila ARMADILLO. Aquesta fosforilació regula negativament ARMADILLO ja que promou la seva interacció específica amb APC i la seva ubiquïtinació i posterior degradació. Les proteïnes β -catenina/ARMADILLO no tenen cap seqüència NLS de localització nuclear. La seva entrada al nucli, s'ha vist per altre banda que és independent de les β -importines i que es donaria per l'associació directa amb les proteïnes del porus nuclear (Fagotto et al., 1998). (Figura 1)

Figura 1. Mecanisme d'acció d'ARMADILLO/ β -catenina en resposta a la senyal de Wg/Wnt

La migració nuclear de la proteïna PHOR1 en resposta a l'aplicació exògena de GAs, observada a les cèl.lules *N. tabacum* BY-2, recorda en molts aspectes la migració al nucli en resposta al senyal Wnt/*Wingless* de les proteïnes ARMADILLO de *Drosophila* i la seva homòloga β -catenina de vertebrats. En experiments en que les cèl.lules BY-2 foren transformades de manera transitòria o estable amb la construcció *p35S-PHOR1-GFP* es va observar una localització ²²²citoplasmàtica de la proteïna de fusió en aproximadament el 40% de les cèl.lules i una localització nuclear en la resta. L'aplicació de GA₃ induïa una migració de la proteïna PHOR1:GFP al nucli a més a més del 90% de les cèl.lules. En canvi, quan les cèl.lules es pre-tractaren amb

l'inhibidor de la síntesis de Gas, ancimidol, es va observar una localització citoplasmàtica de la proteïna a més del 90% de les cèl.lules. Per a determinar quin dels dominis de PHOR1 era responsable d'aquesta migració depenent de GAs al nucli, es van preparar dues deleccions de la proteïna que comprenien els dominis *armadillo* i el domini CPI fusionats a GFP, i es van assajar per expressió transitòria en les cèl.lules BY2. L'expressió de la fusió ARM:GFP va mostrar una localització constitutiva al nucli, el que suggereix que aquest domini conté els senyals que determinen la localització nuclear de la proteïna. Aquest domini no presenta seqüències de localització nuclear (NLS). Per tant, podria entrar al nucli a través de l'interacció directa amb proteïnes del porus nuclear, com s'ha suggerit per a la proteïna ARMADILLO de *Drosophila*, tot i que no podem descartar que aquest domini interaccioni amb una altre proteïna amb un senyal NLS, la qual fos responsable de transportar PHOR1 al nucli.

D'altre banda, es va veure que la fusió CPI:GFP retenia una distribució nuclear regulada per GAs. La migració al nucli de la fusió CPI:GFP, no obstant, era deguda a una difusió passiva a través del porus nuclear degut al baix pes molecular d'aquesta proteïna de fusió (45 kDa). Això es va comprovar fusionant el domini CPI a la fusió GFP-GUS, ja que les cèl.lules que expressaven la fusió CPI:GFP:GUS mostraren una distribució citoplasmàtica de l'activitat GFP tant en presència d'ancimidol com de GA₃. Aquests resultats són consistents amb una funció del domini *armadillo* en la localització de la proteïna PHOR1 al nucli, mentre que el domini CPI seria responsable de la retenció de la proteïna al citoplasma, depenent de la presència de GAs. Possiblement, en absència de GAs, aquest domini media la interacció de PHOR1 amb proteïnes citoplasmàtiques que retenen la proteïna impedit la seva entrada al nucli.

El domini CPI és una seqüència de 70 aminoàcids localitzada a l'extrem N-terminal de la proteïna PHOR1. La comparació de la seqüència animo acídica de PHOR1 amb els banc de dades va mostrar que aquest domini es troba també present a l'extrem N-terminal d'un nombre elevat de ESTs d'*Arabidopsis* i també a d'altres proteïnes com la proteïna ARC1 de *B. napus*. Curiosament, molts dels ESTs contenen també el motiu repetit *armadillo*, tot i que en alguns casos s'observa el domini CPI sol a la proteïna i localitzat a l'extrem C-terminal.

Aquest domini, d'altre banda, s'ha vist que presenta certa homologia amb la proteïna UFD2 de llevat, la proteïna NOSA de *D. discoideum* i la proteïna CHIP humana, relacionades totes elles amb el sistema d'ubiquitinació i degradació per al proteasoma

(Koegl *et al.*, 1999). Aquestes homologies suggereixen que el domini CPI podria estar jugant també un paper en l'estabilitat de la proteïna mitjançant interacció amb els complexos implicats en la ubiquïtinació i degradació per el proteasoma de proteïnes específiques.

Els possibles llocs de *O-N*-acetilglucosaminació de la proteïna PHOR1, predits pels programes informàtics, no semblen ser importants per a la translocació de la proteïna PHOR1 al nucli. Els estudis de transformació transitòria de la proteïna PHOR1 (-SSSP):GFP amb la regió rica en serines i possible lloc *d'O-N*-acetilglucosaminació deleccionada no mostra cap diferència, en quan a la localització subcel·lular de la proteïna respecte a les transformades amb la proteïna PHOR1:GFP sencera.

3. PHOR1 interacciona amb la proteïna PIP1 (per *PHOR1 Interacting Protein 1*) a través del domini ARMADILLO.

El domini *armadillo* de la proteïna ARMADILLO/ -catenina media la interacció d'aquestes proteïnes amb la regió acídica de les proteïnes APC, la família de factors de transcripció Tcf/LEF-1 i la E-cadherina (Huber *et al.*, 1997). Els residus bàsics conservats als motius "*arm repetits*" són els responsables de la interacció de la -catenina amb aquestes proteïnes i són també altament conservats a la proteïna PHOR1, suggerint que aquest domini mediarà la interacció de PHOR1 amb els dominis acídics d'altres proteïnes.

Mitjançant experiments de doble híbrid a llevat i utilitzant una llibreria de cDNA de *S. lycopersicon* es van aïllar quatre clons anomenats *TH44*, *TH24*, *TH25* i *TH53* (per *two hybrid*) que semblaven interaccionar específicament amb el domini *armadillo* de la proteïna PHOR1. L'anàlisi de seqüència va mostrar que tres d'aquests clons (*TH24*, *TH25* i *TH53*) codificaven per una mateixa proteïna, essent només uns d'ells uns quants residus més llargs que els altres. A excepció d'aquests residus inicials, la seqüència aminoacídica deduïda d'aquests clons eren idèntiques entre sí. Els resultats obtingut

mitjançant experiments de *pull-down* confirmaren la interacció de la proteïna PHOR1 a través del seu domini *armadillo* amb la proteïna TH53 (corresponent a l'insert més llarg). En canvi, no es va poder confirmar la interacció de la proteïna TH44 amb PHOR1, ja que en les condicions utilitzades no sembla donar-se una interacció entre aquestes dues proteïnes. Això no vol dir que aquestes proteïnes no interaccionin “*in vivo*”, però podria ser que per a que la interacció es doni sigui necessària la implicació d'altres proteïnes, un entorn fisiològic precís o unes modificacions post-transcripcionals de la proteïna que no es donen *in vitro*. Alternativament, podria ser que el plegament de la proteïna TH44 fusionada a GST no sigui el plegament natiu de la proteïna i per aquesta raó la fusió GST:TH44 no és capaç de donar lloc a la interacció observada “*in vivo*”.

- **El clon Th53 codifica per una nova proteïna que conté un motiu F-box i domini Kelch.**

Mitjançant experiments de 5'-RACE es va obtenir la regió del missatger que mancava al cDNA parcial *TH53*. El cDNA complert es va anomenar *PIP1* (per *PHOR1 Interacting Protein 1*). Aquest té una mida de 1400 pb i conté un marc obert de lectura de 1185 pb, amb una seqüència 3' no codificant de 128 pb que inclou una cua poliA(+) de 53 pb. El cDNA presenta un codó de parada 65 nucleòtids davant de l'ATG d'inici de traducció, indicant que el cDNA *PIP1* conté la seqüència codificant sencera. La proteïna deduïda és de 395 aminoàcids.

La comparació de la seqüència aminoacídica de la proteïna PIP1 amb el banc de dades va mostrar que aquesta proteïna presentava 2 regions conservades, compreses per un motiu F-box i 6 còpies d'un motiu *kelch*. Cadascuna de les 6 còpies individuals del motiu repetit *kelch* en la proteïna, mostra conservat el consens descrit per aquest motiu. En aquests motius es conserven els residus ²²⁵ i distàncies importants per a mantenir l'estructura de -propeller característica de la superfamília de proteïnes amb còpies “*kelch*”.

El motiu F-box comprèn un motiu conservat de 40-50 aminoàcids, identificat per primer cop a la proteïna ciclina F humana (Elledge *et al.*, 1998). El consens per a aquest motiu està constituït per una seqüència **LpxEILxILsyLL**, a l'inici de la regió conservada i per una seqüència **VCKxWxxL** al mig d'aquest motiu, les quals es troben també conservades a la proteïna PIP1. Els projectes de seqüenciació genòmica han posat en evidència que el nombre de proteïnes que contenen motius F-box és elevat. Així per exemple, al genoma de llevat s'han identificat 16 proteïnes F-box, al genoma humà cinquanta, mentre que a *C. elegans* s'han trobat més de seixanta. El nombre de proteïnes F-box descrites a plantes es de moment reduït. Al genoma d'*Arabidopsis* s'ha trobat també un nombre elevat d'ORFs amb un motiu conservat F-box, que en alguns casos es coneix la seva funció. Així per exemple, les proteïnes F-box TIR1 (*Transport Inhibitor Response 1*) d'*Arabidopsis* regulen la resposta a auxines (Ruegger *et al.*, 1998), la COI1 (*Coronatine-Insensitive 1*) està implicada en la maduració de les anteres i en la resposta de defensa en front de patògens i insectes regulada pel jasmonat (Xie *et al.*, 1998), mentre que la proteïna UFO (*Unusual Floral Organs*) és requerida per a un normal creixement i diferenciació del meristem floral (Samach *et al.*, 1999). Recentment s'ha identificat dos gens d'*Arabidopsis* implicats en el control del rellotge circadià, anomenats *ZTL* (*ZEITLUPE*) i *FKF1* (*Flavin-binding, Kelch repeat, F-box 1*), els quals presenten també un motiu conservat F-box a la regió central de la proteïna. A més a més del motiu F-box, aquestes proteïnes presenten 2 altres motius conservats: un domini LOV (*light, oxygen, voltage*) a la regió N-terminal, que constitueix un dels subgrups de la família de dominis PAS, també present als receptors de llum blava, i un domini *kelch* a la regió C-terminal de la proteïna. Es pensa que la funció d'aquestes proteïnes seria la de percebre les condicions de llum i ajustar el rellotge circadià endogen a les condicions de fotoperíode. Aquesta funció és possiblement mitjançada a través de la degradació d'una o més proteïnes diana pel proteasoma, procés en que intervindrien els dominis *kelch* i F-box (Somers *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2000., Mizoguch i Coupland, 2000).

Les proteïnes F-box actuen com a components del complex proteic E3 ubiquitina lligase anomenat SCF (per *Skp1*, *Cullin* i *F-box protein*) (Elledge *et al.*, 1998). Aquest complex juga un paper crucial en la regulació de certes proteïnes, al determinar la seva degradació selectiva per proteòlisis dependent d'ubiquitinació. El complex E3 es pot definir com un complex enzimàtic que uneix proteïnes substrat i promou la transferència d'ubiquitines a aquestes proteïnes, marcant-les per ser reconegudes i degradades via

proteasoma. Actualment, s'han descrit quatre tipus diferents de complexos E3, anomenats SCF, APC, HECT, i *N-end rule*, possiblement existint un cinquè tipus anomenat Ring-H2 (Patton *et al.*, 1999; Peters, 1998; Bates i Viestra, 1999; Varshavsky, 1996; Deshaies, 1999; Callis i Vierstra, 2000). El complex SCF està format per 4 proteïnes diferents: la subunitat *Cullin*, la SKP1 (*Suppressor of Kinetochore Protein 1*), la RBX1 i una proteïna F-box (Patton *et al.*, 1998; Deshaies, 1999). La subunitat *Cullin* millor caracteritzada és la proteïna Cdc53 (per *Cell-division cycle 53*). Estudis d'estructura i funció d'aquesta proteïna han permès d'identificar una sèrie de residus a l'extrem N-terminal que són requerits per a la interacció amb la proteïna SKP1 (Patton *et al.*, 1998) i altres a l'extrem C-terminal, que són necessaris per a la interacció amb la proteïna RBX1 (del Pozo i Estelle, 1999). Estudis de doble híbrid i de immunoprecipitació van demostrar que la proteïna SKP1 interacciona a la vegada amb les proteïnes *Cullin* i F-box, fent de pont entre elles (Patton *et al.*, 1998), i que el motiu F-box present a la regió N-terminal d'aquestes proteïnes és el responsable de la interacció amb SKP1. Les proteïnes F-box, d'altre banda, presenten un domini característic d'interacció proteïna-proteïna al seu extrem C-terminal, de tipus “WD40 repeat” o “leucine-rich repeats”(LRRs), els quals s'han identificat a moltes d'aquestes proteïnes. A ZTL i FKF1, el domini d'interacció proteïna-proteïna és un domini de tipus “kelch repeat”. Aquest domini es troba també present a la proteïna PIP1 i a un gran número de ORFs d'*Arabidopsis* que presenten ambdós motius conservats F-box i “kelch repeat”. El motiu repetit *kelch* sembla, per tant, ser freqüent a les proteïnes F-box de plantes. Actualment s'ha demostrat que aquests dominis d'interacció proteïna-proteïna són els responsables de reconèixer i unir les proteïnes substrat, per a dirigir la seva ubiquitinació i posterior degradació pel proteasoma. Per exemple, s'ha vist que la proteïna Grr1 de llevat interacciona amb la proteïna fosforilada Cln2p a través del seu domini LLRs, mentre que el domini WD40 de -TRCP és requerit per a la seva interacció amb la proteïna -catenina (Winston *et al.*, 1999). El darrer component de SCF identificat és la proteïna Roc1 (per *Regulator of cullin 1*), la funció de la qual és unir l'E2 al complex SCF, al que s'uneix per interacció amb la proteïna *Cullin*, promovent així la transferència d'ubiquitines des d'E2 a la proteïna substrat (Kamura *et al.*, 1999). A la figura 2 es mostra el model proposat per a la proteïna F-box TIR1, amb una funció en la resposta a auxines.

Estudis portats a terme a diferents organismes eucariotes indiquen que els complexos SCFs estan implicats en la proteòlisi dependent d'ubiquitinació de proteïnes molt diferents, les quals intervenen en processos cel·lulars tan diversos com són la regulació del cicle cel·lular, la transducció de senyals o la regulació de la transcripció (Deshaies, 1999). El gran nombre de proteïnes F-box identificades, indiquen, d'altre banda, que aquestes proteïnes reconeixen proteïnes substrat específiques, les quals participen en processos cel·lulars regulats via degradació dependent d'ubiquitinació, tant al citosol com al nucli (Hershko i Ciechanover, 1998).

Figura 2. Regulació de la resposta a auxines per degradació dependent d'ubiquitinació d'un o més repressors específics al proteasoma.

Tal com es mostra al model, la resposta a auxines està inhibida per l'acció específica d'un o més repressors. El complex SCF^{TIR1} està involucrat en la resposta a aquestes hormones, al mediar la ubiquitinació d'aquests repressors i la posterior degradació al proteasoma. El complex SCF^{TIR1} està format per AtCUL1, ASK1 o ASK2, RBX1 i la proteïna F-box TIR1.

La funció d'aquest complex és regulada per la modificació dependent de RUB1 (per *Ubiquitin-related protein*) d'AtCUL1 (*Cullin*). AXR1 codifica per una de les subunitats de l'enzim activador de RUB1, anàleg a E1 (*ubiquitin activating enzyme*), i dimeritza amb l'altre subunitat anomenada ECR1 (*E1 C-terminal-related*), activant i transferint RUB a un enzim anomenat RCE1 (*RUB-Conjugating enzyme*). Recents estudis mostren que RUB es conjuga amb la proteïna *Cullin*.

El motiu *kelch*, per altre banda, es va identificar primerament com a un motiu repetit comprés per sis elements repetits en tàndem presents a la proteïna Kelch de *Drosophila* (Xue *et al.*, 1993). Actualment s'han identificat moltes altres proteïnes que formen part de la superfamília de proteïnes anomenada “*Kelch-repeat*” (Adams *et al.*, 2000). Aquestes proteïnes contenen un domini *kelch* comprés per motius repetitius d'uns 44-56 aminoàcids, amb una baixa homologia entre sí. Els sis motius repetits de la proteïna Kelch de *Drosophila* presenten, per exemple, una homologia del 25-50% entre ells i una homologia inclús menor, del voltant d'un 11% amb els motius individuals d'altres proteïnes. L'alineament múltiple entre els motius *kelch* de diferents proteïnes va mostrar que hi ha vuit residus molt conservats a tots ells, que inclouen quatre residus hidrofòbics seguits de dues glicines i separats per uns quants residus, dos residus aromàtics més característics (Bork *et al.*, 1994; Aravind i Koonin, 1999). Aquests residus conservats són importants per a l'estructura tridimensional –propeller característica d'aquest domini, la qual s'ha resolt per la proteïna galactosa oxidasa de fongs. La comparació de la seqüència primària de la galactosa oxidasa amb la d'altres membres d'aquesta superfamília de proteïnes prediuen que aquests haurien també de formar una estructura en –propeller molt semblant a la de la galactosa oxidasa (Aravind i Koonin, 1999; Ito *et al.*, 1994; Murzin, 1992). En aquesta estructura, els motius *kelch* individuals formen quatre làmines corresponents a una fulla del *propeller*, i les diferents fulles es troben inclinades al voltant d'un eix central. L'elevada conservació dels residus hidrofòbics i aromàtics situats sobre la làmina , juntament amb les dues glicines situades a la volta entre la segona i la tercera làmines mostren la importància d'aquests residus així com la seva distància per a que es formi aquesta estructura tridimensional.

En l'actualitat s'han caracteritzat la funció de més de 20 proteïnes *kelch* diferents, però s'han identificat un gran nombre d'ORFs amb similitud als dominis *kelch*, tant al genomes humà, de rates, ratolins, d'*Arabidopsis*, com de llevat i *C. elegans*. Totes aquestes proteïnes s'han agrupat en cinc subgrups diferenciats, en base al número de motius repetits que presenten i la seva posició vers a un altre domini conservat en la proteïna. Aquestes proteïnes s'han localitzat tant al citoplasma, al nucli, fora de la cèl.lula o com a proteïnes transmembrana, segons la proteïna, i s'ha vist que participen en moltes funcions diferents (Adams *et al.*, 2000 i referències). S'ha vist que moltes d'elles tenen activitats relacionades amb una interacció amb l'actina i amb

l'organització del citoesquelet, però altres tenen una funció a nivell de la membrana plasmàtica o dels orgànuls cel·lulars o una activitat reguladora de proteïna quinases (Robinson i Cooley, 1997; Soltysik-Espanola *et al.*, 1999; Eichinger *et al.*, 1996). La proteïna Ralp1 de *S. pombe* participa, per exemple, en la regulació de la morfologia i creixement cel·lulars (Fukui *et al.*, 1989; Mata i Nurse, 1997; Philips i Herskowitz, 1998), mentre que la proteïna Keap1 de mamífers participa en la regulació de l'expressió gènica, al segrestar el factor de transcripció Nrf2 al citoplasma (Itoh *et al.*, 1999). A *Arabidopsis* s'han caracteritzat les proteïnes ZTL i FKF1 les quals ajusten el rellotge circadià a les condicions de fotoperíode.

La proteïna PIP1 és la primera proteïna amb un domini *kelch* per a la que es descriu una interacció amb el domini *armadillo*, tot i que ambdós dominis es caracteritzen per la seva capacitat d'interacció amb una elevada varietat de proteïnes. L'anàlisi d'expressió específica de teixit, a plantes *S. tuberosum* ssp. *andigena* va mostrar que *PIP1* s'expressa a tots els teixits de la planta però, a l'igual que *PHOR1*, l'expressió és més abundant a les parts subterrànies, als estolons i arrels. A la regió N-terminal PIP1 presenta un domini F-box similar a l'observat a les proteïnes ZTL i FKF1 d'*Arabidopsis*, tot i que no presenta el domini PAS conservat en aquestes proteïnes. Com hem vist abans, el domini F-box està implicat en la unió de proteïnes substrat a les subunitats core de la ubiquitina lligasa, dirigint la seva ubiquitinació i posterior degradació per el proteasoma. Per tant PIP1 podria estar implicada en la degradació de PHOR1 pel proteasoma, un cop ha exercit la seva funció com a component intermediari en la transducció del senyal de GAs, tornant la via d'activació al seu estat basal no activat (veure el model hipotètic presentat a la Figura 3). Seria però necessari determinar la localització subcel·lular de la proteïna PIP1 per tal de caracteritzar si aquesta interacció es dona al nucli, un cop PHOR1 ha efectuat la seva funció intermediària o bé al citoplasma, on la seva funció seria la de regular l'abundància de la proteïna PHOR1, abans que aquesta es transporti al nucli, modulant així la resposta a les GAs.

Actualment s'estan analitzant plantes transgèniques *S. tuberosum* ssp. *andigena* transformades amb una construcció antisentit pel cDNA parcial *PIP1*. L'anàlisi del fenotip de les plantes que presentin nivells reduïts del transcrit *PIP1*, permetran determinar si aquestes plantes acumulen nivells més elevats de PHOR1 i alhora presenten alteracions en algun dels processos del desenvolupament regulats per GAs,

demonstrant així que la proteïna codificada pel gen *PIP1* té una funció moduladora de PHOR1.

4. Model hipotètic d'actuació de la proteïna PHOR1 en resposta a les GAs.

Tenint en compte tots els resultats obtinguts hem dissenyat un model hipotètic d'actuació de la proteïna PHOR1 en resposta a les GAs. Els resultats observats a les plantes transgèniques -PHOR1 semblen indicar que aquesta proteïna actua com a activador de la via de transducció d'aquestes hormones, ja que aquestes plantes presenten una reducció en la llargària dels entrenusos a la part apical de la planta i en condicions de SD tuberitzen abans que les plantes control. Aquestes plantes, per altre banda, tenen una sensibilitat reduïda a l'aplicació de GA₃, alhora que presenten nivells elevats de GAs endògenes i mostren una alteració en la regulació dels gens biosintètics GA 20-oxidasa i GA 2-oxidasa. Aquests resultats demostrarien que aquestes plantes responen pitjor a les GAs i per tant que la proteïna PHOR1 és necessària per activar la resposta a les GAs. Els resultats de la localització subcel.lular indiquen que la migració de la proteïna PHOR1 al nucli està regulada per les GAs. El fet de que la proteïna PHOR1 no presenta cap senyal de localització nuclear (NLS) suggereix que, tal i com s'ha vist per ARMADILLO/ -catenina, la translocació al nucli de PHOR1 pot ser mediada a través de la interacció directa amb proteïnes del porus nuclear. Els resultats de localització subcel.lular dels dominis CPI i ARM fusionats a GFP, indiquen que, en efecte, és el domini *armadillo* el responsable de la translocació de la proteïna al nucli, mentre que el domini CPI seria responsable de la retenció de la proteïna al citoplasma, quan no hi han GAs al medi.

La proteïna PHOR1 no presenta cap domini d'interacció amb el DNA ni cap domini d'activació com el que es troba present a la proteïna ARMADILLO/ -catenina, que l'hi confereix la funció de co-activador de la transcripció, a l'interaccionar amb els factors de transcripció TCF/LEF1. Això indicaria que la proteïna PHOR1 no actua com a un activador o co-activador transcripcional. Per contra, és possible que PHOR1 interaccioni amb algun altre proteïna amb una funció com a intermediari del senyal de GAs, o com a

regulador de la transcripció, i en presència de GAs estimuli el seu transport al nucli, permetent la progressió de la ruta d'activació dins del nucli o la unió al DNA d'aquest factor de transcripció hipotètic. El fet de que la proteïna PHOR1 interaccioni a través del seu domini *armadillo* amb la proteïna F-box PIP1 i que en el seu domini CPI presenti homologia amb el domini U-box de les proteïnes UDF-2 de llevat, suggereix que la proteïna PHOR1 podria participar en la formació d'un complex d'ubiquitinació semblant al SCFs descrit anteriorment. Aquest complex podria ser responsable de regular la vida mitja de PHOR1 o, alternativament, ser responsable de regular la vida mitja d'aquest intermediari o factor de transcripció. Segons aquesta segona alternativa, PHOR1 tindria una funció doble en la resposta a GAs, ja que a la vegada que regularia l'import al nucli d'aquest segon intermediari o factor hipotètic de transcripció, regularia la seva vida mitja al dirigir la seva ubiquitinació i posterior degradació pel proteasoma.

Actualment s'estan obtenint plantes transgèniques portadores d'una construcció antisentit pel cDNA *PIP1*. En experiments futurs caldria comprovar els nivells de proteïna PHOR1 en aquestes plantes transgèniques estan incrementats, i si aquestes plantes mostren una sensibilitat incrementada a les GAs. En efecte, si la funció de la proteïna PIP1 a patatera és la de reconèixer la proteïna PHOR1, interaccionant amb ella per a ubiquitinar-la i dirigir-la a degradació pel proteasoma, una disminució en els nivells de PIP1 hauria de produir un increment en els nivells d'acumulació de PHOR1. L'anàlisi del fenotip de les plantes *-PIP1*, permetrà determinar si aquestes presenten alteracions en els processos de desenvolupament regulats per llum o GAs, així demostrant que la proteïna codificada pel gen *PIP1* és un element més de les vies que participen en la regulació d'aquests processos.

Figura 3. Model hipotètic d'actuació de la proteïna PHOR1 en resposta a les GAs.

6. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. S'han obtingut sèrums immunes de conill en front dels dominis N-terminal i C-terminal de la proteïna PHOR1 expressats a *E. coli*. Els sèrums dels conills Nt3 i Ct6, foren capaços de reconèixer específicament les regions N-terminal i C-terminal de la proteïna PHOR1, i detectar a una dilució 1/10.000 fins 1 ng i 10 ng de les proteïnes NT i CT recombinants. Aquests sèrums són “quantitatius”, en quan a que poden ser utilitzats per a determinar l'abundància d'aquestes proteïnes en experiments de *western blot*.
2. Els sèrums Nt3 i Ct6 detecten una banda de 46 kDa als extractes totals de fulles de *S. tuberosum* ssp. *andigena*, la qual coincideix amb el pes molecular esperat per a la proteïna PHOR1. En experiments *western*, s'ha pogut comprovar que els nivells d'acumulació de la proteïna PHOR1 són més elevats a les fulles de les plantes crescudes en condicions inductores per a la tuberització (SD) que a les fulles de les plantes crescudes sota condicions no inductores (LD), a l'igual que es va veure en l'assaig *northern*. D'altra banda, els nivells de proteïna PHOR1 estan reduïts a les plantes transgèniques portadores d'una construcció antisentit pel transcrit *PHOR1* en comparació a les plantes salvatges.
3. En experiments de fraccionament subcel·lular d'extractes de fulles joves de *S. tuberosum* ssp. *andigena*, es va detectar gran part de la proteïna PHOR1 al sediment nuclear, essent indicatiu d'una localització de PHOR1 a l'interior del nucli.

4. Experiments d'expressió transitòria o estable de la proteïna de fusió PHOR1:GFP en cèl·lules BY2 de tabac mostraren una localització citoplasmàtica de la fluorescència emesa per la proteïna fluorescent verda al 40% de les cèl·lules transformades i una localització nuclear en la resta. L'aplicació de GA₃ indueix una migració al nucli de la proteïna de fusió, de manera que a les 4 hores després del tractament, el 100% de les cèl·lules transformades presenten una localització nuclear de la proteïna PHOR1:GFP. Per contra, en cèl·lules tractades amb l'inhibidor de síntesis de GAs ancimidol, la proteïna PHOR1:GFP es troba al citoplasma en el 100% de les cèl·lules transformades, el que demostra que la localització al nucli de la proteïna PHOR1:GFP depèn de la presència de GAs bioactives. La migració al nucli de la proteïna de fusió, d'altre banda, és transitòria ja que 12 hores després del tractament amb GA₃ s'observa de nou una localització citoplasmàtica de la fluorescència.

5. La comparació de la seqüència amino àcida deduïda per a la proteïna PHOR1 amb els bancs de dades va mostrar similitud significativa amb un grup de ESTs d'*Arabidopsis thaliana* i amb la proteïna ARC1 (*Arm Repeat Containing 1*) de *Brassica napus*. Aquestes proteïnes es caracteritzen per presentar un domini CPI molt conservat a la regió N-terminal i un domini repetit amb homologia a la proteïna de segmentació ARMADILLO de *Drosophila* a la regió C-terminal. El domini conservat CPI denominat així degut a que conté tres residus invariables Cys-Pro-Ile, presenta similitud amb el domini U-box de les proteïnes UFD2 de llevat, NOSA de *D. Discoideum* i CHIP humana, les quals estan relacionades amb el sistema d'ubiquitinació i degradació al proteasoma. El domini C-terminal repetit presenta 7 motius repetits *armadillo*, que conserven el consens descrit per aquest domini. Aquests motius repetits es caracteritzen per presentar conservats varis residus hidrofòbics, que intervenen en el plegament superhèlix del domini, alhora que uns residus bàsics localitzats a la superfície de la proteïna, que intervenen en la interacció proteïna-proteïna amb dominis àcids d'altres proteïnes

6. S'han realitzat experiments d'expressió transitòria en cèl·lules BY2 de tabac d'aquests diferents dominis fusionats a la proteïna fluorescent GFP. Els resultats obtinguts d'aquests experiments indiquen que el domini *armadillo* determinaria la localització al nucli de la proteïna PHOR1, possiblement a través de la seva interacció directa amb proteïnes del porus nuclear o mitjançant interacció amb una altre proteïna que promou el seu import al nucli. El domini CPI, per altre part, seria el responsable en absència de GAs de la retenció al citoplasma de la proteïna, possiblement mitjançant la interacció amb una proteïna citosòlica o per interacció amb el sistema d'ubiquitinació i degradació via proteasoma. La regió rica en serines entre aquests dos dominis, tot i constituir una possible diana de modificació post-transcripcional per *O*-N-acetilglucosaminació o fosforilació, no sembla tenir un paper important en la localització de la proteïna, ja que la seva delecció no fa variar els resultats de localització subcel·lular.
7. Les plantes transgèniques portadores de una construcció antisentit del cDNA *PHOR1* amb nivells reduïts de la proteïna PHOR1 (α -*PHOR1*), mostren en condicions de dies llargs (LD) fulles més amples, de color verd més fosc i pecíols més curts que les plantes salvatges, essent per tant semblants a les fulles de les plantes transgèniques amb nivells reduïts d'expressió del gen *StGA20ox1* corresponent a l'enzim GA 20-oxidasa.
8. Corbes dosi-resposta en que s'aplicaren diferents concentracions de GA₃ a fulles de les línies α -*PHOR1* i plantes control, mesurant la longitud dels quatre primers entrenusos després de dues setmanes de tractament, van demostrar que les plantes transgèniques α -*PHOR1* presenten una resposta menor al tractament amb GAs bioactives, essent necessari aplicar a aquestes plantes concentracions d'un o de dos ordres de magnitud superiors (10^{-5} M GA₃) que a les plantes salvatges per induir un allargament de la tija.
9. Les plantes transgèniques amb nivells reduïts de PHOR1, per altre banda, mostren nivells incrementats de GA₂₀, GA₂₉ i GA₈ i nivells lleugerament superiors de GA₁ en comparació a les plantes salvatges, el que estaria d'acord

amb l'observació que aquestes plantes mostren una resposta alterada al tractament amb GAs.

10. La regulació per retroalimentació dels enzims biosintètics GA 20-oxidasa i GA 2-oxidasa es troba alterada a les línies α -*PHOR1*, les quals presenten nivells elevats del missatger *StGA20ox1* i nivells reduïts del transcrit *StGA2ox* respecte de les plantes salvatges. Per altre banda, la sobre-expressió de la proteïna PHOR1:GFP a les cèl·lules BY2 de tabac resulta en un increment en els nivells d'expressió del gen biosintètic GA 2-oxidasa (*NtGA2ox*), el que suggereix que aquestes cèl·lules mostren una resposta incrementada a les GAs endògenes
11. El conjunt de resultats anteriors són indicatius d'una funció de la proteïna PHOR1 en la via percepció i/o senyalització de les GAs, demostrant una funció d'aquesta proteïna com a intermediari nuclear en la ruta de transducció del senyal d'aquestes hormones.
12. Experiments de doble híbrid en llevat utilitzant una llibreria de cDNA de fulla de *Solanum lycopersicon*, han permès d'aïllar quatre clons de cDNA que codifiquen per a proteïnes capaces d'interaccionar específicament amb la proteïna PHOR1 fusionada al domini d'unió al DNA de GAL4. Tres d'aquests clons (Th24, Th25 i Th53) codifiquen per a un mateix cDNA, mentre que el quart (Th44) correspon a un insert diferent. Les proteïnes codificades per aquests clons (TH53 i TH44) interaccionen amb PHOR1 a través del domini *armadillo*.
13. Mitjançant experiments de *pull-down* s'ha confirmat la interacció de la proteïna TH53 fusionada darrera de la proteïna GST (glutatió S-transferasa) amb la proteïna PHOR1 marcada per transcripció i traducció *in vitro*. S'ha demostrat també que la interacció de TH53 amb PHOR1 es dona a través del domini *armadillo*. Els experiments de *pull-down* no permeteren confirmar la interacció de PHOR1 amb la proteïna TH44, pel que aquesta es va descartar.
14. Per medi d'experiments 5' RACE es va completar el cDNA parcial TH53, aïllat per doble híbrid. El cDNA complert es va anomenar *PIPI* (per *PHOR1*

Interacting Protein 1) i codifica per una proteïna de 395 aminoàcids. La comparació de la proteïna PIP1 amb els bancs de dades mostra que aquesta proteïna presenta un domini F-box a la regió N-terminal i un domini conservat a la regió C-terminal comprès per sis motius *kelch* individuals repetits. Aquests motius repetits presenten el consens descrit pels motius *kelch*, conservant tant els residus característics com la distància entre residus, que són importants per mantenir l'estructura de -propeller típica d'aquesta superfamília de proteïnes.

15. El gen de *TH53* s'expressa majoritàriament a les parts subterrànies de la planta, als estolons i de manera molt abundant a les arrels. També s'observa expressió però a nivells molt baixos als tubercles. A la part aèria de la planta el missatger es detecta als nusos i entrenusos i en nivells inferiors a àpex, fulla i flor. Els nivells del transcrit *TH53* són inferiors als teixits de plantes crescudes en condicions inductores per a la tuberització (SD) que en condicions no-inductores (LD).
16. La presència d'un motiu F-box a la regió N-terminal de la proteïna PIP1 suggereix que aquesta podria estar implicada en dirigir la proteïna PHOR1 cap a la seva ubiquïtinació i degradació específica pel sistema proteasoma, regulant així l'estabilitat de la proteïna. Per tant, PIP1 actuaria com a modulador de la resposta a GAs, o tindria una funció en revertir la resposta a aquestes hormones, dirigint PHOR1 cap a degradació després d'haver actuat com a intermediari nuclear del senyal de GAs.

7. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Adams J, Kelso R, Cooley L. (2000). The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell Biol.* **10**, 17-24.

Adamse P, Jaspers P, Bakker JA, Kendrick RE and Koornneef M. (1988). Photophysiology and phytochrome content of long-hypocotyl mutant and wild-type cucumber seedlings. *Plant Physiol.* **87**, 264-268.

Ahmad M, Cashmore AR (1993). *HY4* gene of *A.thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**: 162-166.

Ahmad M, Cashmore AR (1996a). The *pef* mutants of *Arabidopsis thaliana* define lesions early in the phytochrome signaling pathway. *Plant J* **10**: 1103-1110.

Ahmad M, Cashmore AR (1996b). Seeing blue: the discovery of cryptochrome. *Plant Mol Biol* **30**: 851-861.

Ahmad M, Jarillo JA, Smirnova O, Cashmore AR (1998a). The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A in vitro. *Mol Cell* **1**: 939-948.

Ahmad M, Jarillo JA, Cashmore AR (1998b). Chimeric proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell* **10**: 197-207.

Ait-Ali T, Swain SM, Reid JB, Sun TP, Kamiya Y (1997). The *LS* locus of pea encodes the gibberellin biosynthesis enzyme *ent*-kaurene synthase A. *Plant J* **11**: 442-454.

Ait-Ali T (1998). 16th International Conference of Plant Growth Substances, Chiba Japan, p.48.

Ait-Ali T, Frances S, Weller JL, Reid JB, Kendrick RE, Kamiya Y (1999). Regulation of gibberellin 20-oxidase and gibberellin 3-hydroxylase transcript accumulation during de-etiolation of pea seedlings. *Plant Physiol* **121**:783-791.

Alba RM, Cordonnier-Pratt MM, Pratt LH (1997). Phytochrome gene family in tomato. A re-evaluation. Abstracts of the 5th International Congress of Plant Molecular Biology.

Albone KS, Gaskin P, MacMillan J, Sponsel VM (1984). Identification and localization of gibberellins in maturing seeds of the cucurbit *Sechium edule*, and a comparison between this cucurbit and the legume *Phaseolus coccineus*. *Planta* **162**: 560-565.

Amasino RM (1986). Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethyleneglycol. *Anal Biochem* **152**:304-307.

Ang LH, Chattopadhyay S, Wei N, Oyama T, Okada K, Batschauer A, Deng XW. (1998). Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of Arabidopsis development. *Mol Cell*. **1**, 213-22.

Aravid L and Koonin EV. (1999). Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by interactive database searches. *J. Mol. Biol.* **287**, 1023-1040.

Ashikari M, Wu J, Sasaki T and Yushimura A. (1999). Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene *Dwarf 1* encodes the α -subunit of GFP-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. **96**, 10284-10289.

Ausubel FM, Brent Rkigstone RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1991). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York. John Wiley & Sons.

Bagnall DJ, King RW, Whitelam GC, Boylan MT, Wagner D, Quail PH (1995) Flowering responses to altered expression of phytochrome in mutants and transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.. *Plant Physiol*. **108**,1495-1503.

Ballaré CL, Scopel AL and Sánchez RA. (1990). Far-red radiation reflected from adjacent leaves: and early signal of competition in plant canopies. *Science*. **247**, 329-332.

Ballaré CL, Barnes PW, Kendrick RE (1991). Photomorphogenic effects of UV-B radiation on hypocotyl elongation in wild-type and stable-phytochrome-deficient mutant seedlings of cucumber. *Physiol Plant* **83**: 652-658.

Bamberg HP and Hanneman RE. (1991). Characterization of a new gibberellin related dwarfism locus in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Am. Potato J.* **68**, 45-52.

Bartel P.L., Chien C-T., Sternglanz R. And Fields S. (using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In *Cellulat In t: A Practical Approach.*, ed. Hartley D.A. (Oxford University Press, Oxford) pp 153-179.

- Batschauer A** (1998). Photoreceptors of higher plants. *Planta* **206**: 479-492.
- Batutis EJ, Ewing EE** (1982). Far-red reversal of red light effect during long night induction of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiol* **69**:672-674.
- Beggs CJ, Wellman E** (1985). Analysis of light-controlled anthocyanin formation in coleoptiles of *Zea mays* L. The role of UV-B, blue, red, and far-red light. *Photochem. Photobiol* **41**: 481-486.
- Bensen RJ, Crane VC, Wang X, Duvick J, Briggs SP** (1995a). Maize GA-mutants: isolation, characterization, and gene cloning and expression. In: Abstracts of International Conference on Plant Growth Substances, (Abstr. 096). Minneapolis: Int. Plant Growth Substances Assoc.
- Bensen RJ, Johal GS, Crane VC, Tossberg JT, Schnable PS** (1995b). Cloning and characterization of the maize *An1* gene. *Plant Cell* **7**: 75-84.
- Bethke PC, Schuurink R, Jones RJ** (1997). Hormonal signalling in cereal aleurone. *J Exp Bot* **48**: 1337-1356.
- Bevan MW** (1984). Binary *Agrobacterium tumefaciens* vector for plant transformation. *Nucl Acids Res* **12**:8711-8721.
- Bhalerao R.P., Salchert K., Bako L., Szabados L., Muranaka T., Machida Y., Schaell Koncz C.** (1999) Regulatory interaction of PRL1 WD protein with Arabidopsis SNF1-like protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**,5322-7.
- Birnboim HC, Dolly J** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acid Res* **7**:1513-1523.
- Bognar LK, Hall A, Adam E, Thain SC, Nagy F, Millar AJ.** (1999) The circadian clock controls the expression pattern of the circadian input photoreceptor, phytochrome B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 14652-7.
- Bork P and Doolittle RF.** (1994). *Drosophila* kelch motif is derived from a common enzyme fold. *J. Mol. Biol.* **236**, 1277-1282.
- Bou J.** (2000). Tesi doctoral. Caracterització de gens que codifiquen l'activitat GA 3 - hidroxilasa de patatera i estudi de la seva funció en la tuberització.
- Boylan M, Douglas N, Quail PH** (1994). Dominant negative suppression of *Arabidopsis* photoresponses by mutant phytochrome A sequences identifies spatially discrete regulatory domains in the photoreceptor. *Plant Cell* **6**: 449-460.
- Briggs WR, Rice HV** (1972). Phytochrome: chemical and physical properties and mechanism of action. *Annu Rev Plant Physiol* **23**: 293-334.

Carol, Peng J, Harberd NP (1995). Isolation and preliminary characterization of gas1-1, a mutation causing partial suppression of the phenotype conferred by the gibberellin-insensitive (*gai*) mutation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. *Planta* **197**: 414-417.

Carrera E (1998).Tesi Doctoral: Clonaje de genes que codifican para el enzima GA 20-oxidasa: Estudio de su implicación en el proceso de tuberización.

Carrera E, Jackson SD, Prat S (1999). Feed-back control and diurnal regulation of gibberellin 20-oxidase transcript levels in potato. *Plant Physiol* **119**: 1-9.

Carrera E, Bou J, García-Martínez JL, Prat S (2000). Changes in GA 20-oxidase gene expression affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. *Plant J*, acceptat.

Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu D (1999). Cryptochromes: blue light photoreceptors for plants and animals. *Science* **284**: 760-765.

Castle LA, Meinke DW (1994). A *FUSCA* gene of *Arabidopsis* encodes a novel protein essential for plant development. *Plant Cell* **6**:25-41.

Chamovitz DA, Wei N, Osterlund MT, von Arnim AG, Staub JM, Matsui M, Deng XW. (1996). The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell*. **86**, 115-21.

Chattopadhyay S, Ang LH, Puente P, Deng XW, Wei N. (1998). *Arabidopsis* bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *Plant Cell*. **10**, 673-83

Chandler PM (1988). Hormonal regulation of gene expression in the “slender” mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* **175**: 115-120.

Chandler PM and Robertson M. (1999). Gibberellin dose-response curves and the characterization of dwarf mutants of barley. *Plant Physiol*. **120**, 623-632.

Chang C, Meyerowitz EM (1994). Eukaryotes have “two-components” signal transducers. *Res Microbiol* **145**: 481-486.

Chappell J (1995). Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 521-547.

Chappell J, Hahlbrock K (1984). Transcription of plant defense genes in response to UV light or fungal elicitor. *Nature* **311**: 76-78.

Cherry JR, Hondred D, Walker JM, Vierstra RD (1992). Phytochrome requires the 6kDa N-terminal domain for full biological activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5039-5043.

Cherry JR, Hondred D, Walker JM, Keller JM, Hershey HP, Vierstra RD (1993). Carboxy-terminal deletion analysis of oat phytochrome A reveals the presence of separate domains required for structure and biological activity. *Plant Cell* **5**: 565-575.

- Chiang HH, Hwang I, Goodman HM** (1995). Isolation of the *GA4* locus. *Plant Cell* **7**: 195-201.
- Chien C.T., Bartel P.L., Sternglanz R. and Frields S.** (1991). The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **88**, 9578-9582.
- Chory J, Peto D, Feinbaum R, Pratt L, Ausubel F** (1989). *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell* **58**: 991-999.
- Chory J, Peto CA** (1990). Mutations in the *DET1* gene affect cell-type-specific expression of light regulated genes and chloroplast development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 8776-8780.
- Chory J, Chatterje M, Cook RK, Elich T, Fankhauser C, Li J, Nagpal P, Neff M, Pepper A, Poole D, Reed J, Vitart V** (1996). From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 12066-12071.
- Chory J** (1997). Light modulation of vegetative development. *Plant Cell* **9**: 1225-1234.
- Chory J and Li J.** (1997). Gibberellins, brassinosteroids and light regulated development. *Plant Cell Environ.* **20**, 801-806.
- Christie JM, Jenkins GI** (1996). Distinct UV-B and UV-A/blue light signal transduction pathways induce chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* **8**: 1555-1567.
- Christie JM, Reymond P, Powell GK, Bernasconi P, Raibekas AA, Liscum E, Briggs WR** (1998). *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* **282**:1698-1701.
- Clack T, Mathews S, Sharrock RA** (1994). The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes-The sequences and expression of phyC and phyE. *Plant Mol Biol* **25**:413-427.
- Conti E, Uy Marc, Leighton L, Blobel G and Kuriyan J.** (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor Karuopherin . *94*, 193-204.
- Cowling RJ, Kamiy Y, Seto H, Harberd NP** (1998). Gibberellin dose-response regulation of *GA4* transcript levels in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **117**: 1195-1203.
- Crocker SJ, Hedden P, Lenton JR, Stoddart JL** (1990). Comparison of gibberellins in normal and slender barley seedlings. *Plant Physiol* **94**: 194-200.
- del Pozo J.C. and Estelle M.,** (1999a). The *Arabidopsis* cullin AtCULL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 15342-15347.

del Pozo J.C. and Estelle M. (1999b). Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. *Trends Plant Sci.* **4**, 107-112.

Del Pozo J.C. and Estelle M. (2000). F-box proteins and protein degradation: an emerging theme in cellular regulation. *Plant Molecular Biology*, **44**, 123-128.

Dellaporta S, Wood J, Hick J (1983). A plant DNA miniprep, version II. *Plant Mol Biol* **1**: 19-21.

Deng XW, Matsui M, Wei N, Wagner D, Chu AM, Feldman KA, Quail PH. (1992). *COP1*, an Arabidopsis regulatory gene, encodes a protein with a zinc-binding motif and a GB homologous domain. *Cell* **71**: 791-801.

Deng XW. (1994) Fresh view of light signal transduction in plants. *Cell.* **76**, 423-6.

Deshaies R.J. (1999). SCF and Cullin/RING H2-based ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 435-467.

Devlin PF, Rood SB, Somers DE, Quail PH and Whitelman GC. (1992). Photophysiology of the elongated internode (*ein*) mutant of *Brassica rapa*. *Plant Physiol.* **100**. 1442-1447.

Duncan JD, West CA (1981). Properties of kaurene synthetase from *Marah macrocarpus* endosperm. Evidence for the participation of separate but interacting enzymes. *Plant Physiol* **68**: 1128-1134.

Durley RC, MacMillan J, Pryce RP (1971). Investigation of gibberellins and other growth substances in the seed of *Phaseolus multiflorus* and of *Phaseolus vulgaris* by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochem* **10**

Echeverría M, Penon P and Delseny M. (1994). Plant ribosomal DNA external spacer binding factors: a novel protein binds specifically to a sequence close to the primary pre-rRNA processing site. *Mol. Gen. Genet.* **243**, 442-452.

Eichinger L, et al., (1996). A novel type of protein kinase phosphorylates actin in the actin-fragmin complex. *EMBO J.* **15**, 55477-5556.

Elledge S.J. and Harper JW. (1998). Proteolysis in cell cycle control and cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1377**, M61-M70.

Emmler K, Stockhaus J, Chua NH, Schäfer E (1995). An amino-terminal deletion of rice phytochrome A results in a dominant negative suppression of tobacco phytochrome A activity in transgenic tobacco seedlings. *Planta* **197**: 103-110.

Ewing EE (1987). The role of hormones in potato (*Solanum tuberosum* L.) Tuberization. In: Davies PJ (ed) *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*, 515-538.

- Ewing EE, Struik PC** (1992). Tuber formation in potato: Induction, initiation and growth. *Hort Rev* **14**: 89-197.
- Ezura H, Harberd NP** (1995). Endogenous gibberellin levels influence in-vitro shoot regeneration in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. *Planta* **197**: 310-305.
- Fagotto F., Gluck U. And Gumbiner B.M.** (1998). Nuclear localization signal-independent and Importin/Karyopherin-independent nuclear import of β -catenin. *Curr. Biol.* **8**, 181-190.
- Feinberg AP, Vogelstein B** (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specificity activity. *Anal Biochem* **132**:6-13.
- Feng Df, DoolittleRF** (1987). Progressive sequence alignment is a prerequisite to correct phylogenetic trees. *J Mol Evol* **25**:351-360.
- Foster KR, Miller FR, Childs KL, Morgan P.** (1994). Genetic regulation of development in *Sorghum bicolor*: VIII. Shootgrowth, tillering, flowering, gibberellin biosynthesis and phytochrome levels are differentially affected by dosage of the ma_3^R allele. *Plant Physiol.* **105**, 941-948.
- Fowler S, Lee Karen, Onouch H, Samach A, Richardson K, Morris B, Coyuplan G and Putterill J.** (1999) Molecular characterization of *GIGANTEA*: a circadian clock-controlled gene that reulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **18**, 4679-4688.
- Franckhauser C, Yeh K-C, Lagarias JC, Zhang H, Elich TD and Chory J.** (1999). PKS1, a substrate Phosphorylated by phytochromes that monitor light signaling in *Arabidopsis*. *Science.* **284**, 1539-1541.
- Freilich S, Oron E, Kapp Y, Nevo-Caspi Y, Orgad S, Segal D, Chamovitz DA.** (1999). The COP9 signalosome is essential for development of *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol.* **9**, 1187-90
- Fridborg I, Kuusk S, Moritz T and Sundberg E.** (1999). The *Arabidopsis* dwarf mutant *shi* exhibits reduced gibberellin responses conferred by overexpression of a new putative zinc finger protein. *Plant Cell.* **11**, 1019-1031.
- Fuglevand G, Jackson JA, Jenkins GI** (1996). UV-B, UV-A, and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**: 2347-2357.
- Fujioka S, Yamane H, Spray CR, Gaskin P, MacMillan J, Phinney BO, Takahashi N** (1988). Qualitative and quantitative analyses of gibberellins in vegetative shoots of normal, *dwarf-1*, *dwarf-2*, *dwarf-3* and *dwarf-5* seedlings of *Zea mays* L. *Plant Physiol* **88**: 1021-1036.

Fujisawa S, Yamaguchi I, Park KH, Hobayashi M, Takahashi N (1985). Qualitative and semiquantitative analyses of gibberellins in immature seeds of *Pharbitis purpurea*. *Agric Biol Chem* **49**: 27-33.

Fujisawa Y, Kato T, Ohki S, Ishikawa A, Kitano H, Sasaki T, Asahi T and Iwasaki Y. (1999). Suppression of the heterotrimeric G protein causes abnormal morphology, including dwarfism, in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*. **96**, 7575-7580.

Fukazawa J, Sakai T, Ishida S, Yamaguchi I, Kamiya Y, Takahashi Y. (2000). Repression of shoot growth, a bZIP transcriptional activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. *Plant Cell*. **12**, 901-15.

Fukui Y, et al., (1989). Characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* ral2 gene implicated in activation of the ras1 gene product. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5617-5622.

Gafni Y, Schechter I (1981). Isolation of a kaurene synthetase inhibitor from castor bean seedlings and cell suspension cultures. *Plant Physiol* **67**: 1169-1173.

Gale MD, Law CN, Marshall GA, Worland AJ (1975). The genetic control of gibberellic acid insensitivity and coleoptile length in a "dwarf" wheat. *Heredity* **34**: 393-399.

García-Martínez JL, López-Díaz I, Sánchez-Beltrán MJ, Phillips AL, Ward DA, Gaskin P, Hedden P (1997). Isolation and transcript analysis of gibberellin 20-oxidase genes in pea and bean in relation to fruit development. *Plant Mol Biol* **33**: 1073-1084.

Garcia-Martinez JL, Santes C, Croker SJ and Hedden P. (1991). Identification, quantification and distribution of gibberellins in fruits of *Pisum sativum* L. Cv. Alaska during pod development. *Planta*. **184**, 53-60.

Gärtner W, Hill C, Worm K, Braslavsky SE, Schaffner K (1996) Influence of expression system on chromophore binding and preservation of spectral properties in recombinant phytochrome. *Eur J Biochem* **236**: 978-983.

Gaskin P, Kirkwood PS, Lenton JR, MacMillan J, Radley ME (1980). Identification of gibberellins in developing wheat grain. *Agric Biol Chem* **44**: 158-193.

Gilroy S. (1996). Signal transduction in barley aleurone protoplasts is calcium dependent and independent. *Plant Cell*. **8**, 2193-2209.

Gilroy S and Jones RL. (1994). Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiol*. **15**, 1185-1192.

Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Baumeister W, Fried VA, Finley D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*. **94**, 615-23.

- Gomord V, Wee E, Faye L.** (1999). Protein retention and localization in the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Biochimie*. **81**, 607-18.
- Grebenok R.J., Pierson E., Lamberg G.M., Gong F-Ch., Alonso C.L., Haldeman-Cahill R., Carrigton J.C., and Galbraith D.W.** (1997). Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting. *The Plant Journal*. **11**, 573-586.
- Gregory LE** (1956). Some factors for tuberization in the potato. *Ann Bot* **41**: 281-288.
- Grosselindemann E, Lewis MJ, Hedden P and Graebe JE.** (1992). Gibberellin biosynthesis from gibberellin A₁₂-aldehyde in a cell-free system from germinating barley (*Hordeum vulgare* L. Cv. Himalaya) embryos. *Planta*. **188**, 252-257.
- Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK, Mandava NB, Worley JF, Warthen JD, Steffens GL, Flippen-Anderson JL, Cook JC** (1979). A unique plant growth promoting steroid from *Brassica napus* pollen. *Nature* **281**: 216-217.
- Gu Tiesheng, Mazzurco M, Sulaman W, Matias DD and Goring DR.** (1998). Binding of an arm repeat protein to ekr kinase domain of the S-locus receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**, 382-387.
- Gubler Fand Jacobsen JV.** (1992). Gibberellin-responsive elements in the promoter of a barley high-pI α -amylase gene. *Plant Cell*. **4**, 1435-1441.
- Gubler F, Kalla R, Roberts JK, Jacobsen JV.** (1995). Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI α -amylase gene promoter. *Plant Cell*. **7**, 1879-91.
- Guo H, Yang H, Mockler TC, Lin C** (1998). Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* **279**: 1360-1363.
- Halliday KJ, Hudson M, Ni M, Qin M, Quail PH** (1999). *Poc1*: An *Arabidopsis* mutant perturbed in phytochrome signaling because of a T DNA insertion in the promoter of *PIF3*, a gene encoding a phytochrome-interacting bHLH protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 5832-5837.
- Hammes PS, Nel PC** (1975). Control mechanisms in the tuberization process. *Potato Res* **18**: 262-272.
- Hannahan D** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-580.
- Harberd NP, Freeling M** (1989) Genetics of dominant gibberellin-insensitive dwarfism in maize. *Genetics* **121**:827-838.
- Harley MSS, Glenn RH and Natasha VR.** (1997). Importin from *Arabidopsis thaliana* in a nuclear import receptor that recognizes three classes of import signals. **114**, 411-417.

BIBLIOGRAFIA

Harlow E. and Lane D. (1988). Immunizations. In antibodies: a laboratory manual (US: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 53-138.

Harper J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomarsi K. and Elledge S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 Cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.

Hatzfeld M. (1999) The Armadillo family of structural proteins. *International Review of Cytology*. **186**, 179-224.

Hauser BA, Cordonnier-Pratt MM, Daniele-Vedele F, Pratt LH (1995). The phytochrome gene family in tomato includes a novel subfamily. *Plant Mol Biol* **29**:1143-1155.

Hedden P (1983). In vitro metabolism of gibberellins. In: *The Biochemistry and physiology of gibberellins*. Crozier A (ed), vol. 1, pp 99-150. Praeger, New York.

Hedden P, Kamiya Y (1997). Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 431-460.

Hedden P, Proebsting WM (1999). Genetic analysis of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol* **119**: 365-370.

Hedden P and Phillips AL. (2000). Manipulation of hormone biosynthetic gene in transgenic plants. *Curr. Opin Biotechnol.* **11**, 130-137.

Helliwell CA, Sheldon CC, Olive MR, Walker AR, Zeevaart JAD, Peacock WJ, Dennis ES (1998). Cloning of the *Arabidopsis ent*-kaurene oxidase gene *GA3*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9019-9024.

Helliwell CA, Poole A, Peacock WJ, Dennis ES (1999). *Arabidopsis ent*-kaurene oxidase catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol* **119**: 507-510.

Hendriks T, Vreugdenhil D, Stiekema WJ (1991). Patatin and four serine proteinase inhibitor genes are differentially expressed during potato tuber development. *Plant Mol Biol* **17**: 385-394.

Hershko A. And Ciechanover A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev Biochem.* **67**, 425-479.

Hincks KA, Millar AJ, Carré IA, Somers DE, Straume M, Meeks-Wagner DR and Kay SA. (1996). Conditional circadian dysfunction of the *Arabidopsis* early-flowering 3 mutant. *Science*. **274**. 790-792.

Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 405-439.

Hoecker U, Xu Y, Quail PH (1998). SPA1: a new genetic locus involved in phytochrome A-specific signal transduction. *Plant Cell* **10**:889-904.

- Hoffman PD, Batschauer A, Hays JB** (1996). *AT-PHH1*, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* related to microbial photolyases and plant blue light photoreceptors. *Mol Gen Genet* **253**: 259-265.
- Höfgen R, Willmitzer L** (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucl Acids Res* **16**: 9877.
- Hooley R, Beale MH and Smith SJ.** (1991). Gibberellin perception at the plasma membrane of *Avena fatua* aleurone protoplasts. *Planta*. **183**, 274-280.
- Huala E, Oeller PW, Liscum E, Han I-S, Larsen E, Briggs WR** (1997). *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**: 2120-2123.
- Huber, A.H., Nelson, W.J., and Weis, W.I.** (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of β -catenin. *Cell*, **90**, 871-882.
- Ingram TJ, Reid JB, Murfet IC, Gaskin P, Willis CL, MacMillan** (1984). Internode length in *Pisum*. The *Le* gene controls 3 β -hydroxylation of GA₂₀ to GA₁. *Planta* **160**: 455-463.
- Ito N, et al.,** (1994). Crystal structure of a free radical enzyme, galactose oxidase. *J. Mol. Biol.* **238**, 794-814.
- Itoh H, Tanaka-Ueguchi M, Kawaide H, Chen X, Kamiya Y, Matasuoka M** (1999). The gene encoding tobacco gibberellin 3 β -hydroxylase is expressed at the site of GA action during stem elongation and flower organ development. *Plant J* **20**: 15-24.
- Itoh K et al.,** (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive element by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* **13**, 76-86.
- Izawa T, Oikawa T, Tokutomi S, Okuno K, Shimamoto K.** (2000). Phytochromes confer the photoperiodic control of flowering in rice (a short-day plant). *Plant J.* **22**, 391-399.
- Jackson SD, Prat S** (1996). Control of tuberisation in potato by gibberellins and phytochrome B. *Physiol Plant* **98**: 407-412.
- Jackson SD, Willmitzer L** (1994). Jasmonic acid spraying does not induce tuberization in short-day requiring potato species kept in non-inducing conditions. *Planta* **194**: 155-159.
- Jackson SD, Heyer A, Dietze J, Prat S.** (1996). Phytochrome-B mediates the photoperiodic control of tuber formation in potato. *Plant J.* **9**, 159-166.
- Jackson SD** (1999). Multiple signalling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiol* **119**: 1-8.

Jackson AD, James PE, Carrer E, Prat S and Thomas B. (2000). Regulation of transcript levels of a potato gibberellin 20-oxidase gene by light and phytochrome B. *Plant Physiol.* **119**, 1-8.

Jacobsen SE, Olszewski NE (1993). Mutations at the *SPINDLY* locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* **5**: 887-896.

Jacobsen SE, Binkowski KA, Olszewski NE (1996). SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9292-9296.

Jiménez G., Paroush Z. and Ish-Horowicz D. (1997). Groucho acts as a corepressor for a subset of negative regulators, including Hairy and Engrailed. *Genes Dev.* **11**, 3072-3082.

Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, Levenson JD, Hunter T, Liu YC. (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science.* **286**, 309-12.

Johnson E, Bradley M, Harberd NP and Whitelman GC. (1994). Photoresponses of light-grown *phyA* mutants of *Arabidopsis* : Phytochrome A is required for the perception of daylength extensions. *Plant Physiol.* **195**, 141-149.

Jones HD, Smith SJ, Desikan R, Plakidou-Dymock S, Lovegrove A, Hooley R. (1998). Heterotrimeric G proteins are implicated in gibberellin induction of α -amylase gene expression in wild oat aleurone *Plant Cell.* **10**, 245-54.

Jordan BR (1995). The effects of ultraviolet-B radiation on plants: A molecular perspective. *Advan Bot Res* **22**: 97-162.

Kamiya Y, García-Martínez JL (1999). Regulation of gibberellin biosynthesis by light. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 398-403.

Kamura T., Conrad M.N. et al., (1999). The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2. *Genes Dev.* **13**, 2928-2933.

Karniol B, Chamovitz DA. (2000). The COP9 signalosome: from light signaling to general developmental regulation and back. *Curr Opin Plant Biol.* **3**, 387-93.

Kazuhiro S, Toshisuke I, Rikyu M, Mitsue M and Naoki Y. (1998). Cloning of a cDNA encoding an importin- and down-regulation of the gene by light in rice leaves. **212**, 279-286.

Keil M, Sánchez-Serrano JJ, Willmitzer L (1989). Both wound-inducible and tuber-specific expression are mediated by the promoter of a single member of the proteinase inhibitor II gene family. *EMBO J* **8**: 1323-1330.

Keith B, Brown S and Srivastava LM. (1982). *In vitro* binding of gibberellin A4 to extracts of cucumber measured by using DEAE-cellulose filters. *Proc Natl Acad Sci USA.* **79**, 1515-1519.

- Kendrick RE, Kronenberg GHM** (1994). In: Photomorphogenesis in Plants, Ed 2. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Kim BC, Tennessen DJ, Last RL** (1998). UV-B induced photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **15** (5): 667-674.
- Koda Y, Okazawa Y** (1983). Characteristic changes in the leaves of endogenous plant hormones in relation to the onset of potato tuberization. *Japan J Crop Sci* **52**: 592-597.
- Koda Y, Omer EA, Yoshihara T, Shibata H, Sakamura S, Okazawa Y** (1988). Isolation of a specific tuber-inducing substance from potato leaves. *Plant Cell Physiol* **29**: 1047-1051.
- Koegl M., Hoppe T., Schlenker S., Ulrich H.D., Maller T. U. And Jentsch S.** (1999). A novel ubiquitination factor E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, **96**, 635-644.
- Kondo K and Ishiura M.** (1999). The circadian clocks of plants and cyanobacteria. *Trends Plant Sci.* **4**, 171-176.
- Koornneef M, Rolff E, Spruit, CJP** (1980). Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Z Pflanzenphysiol* **100**: 147-160.
- Koornneef M, i van der Veen JH** (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Theor Appl Genet* **58**: 257-263.
- Koornneef M, Elgersma A, Hanhart CJ, van Loenen-Martinet EP, van Rign L, Zeevaart JAD** (1985). A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **65**: 33-39.
- Krauss A** (1985). Interaction of nitrogen nutrition, phytohormones, and tuberization. In: Li PH *Potato Physiology*. Academic Press, Inc. Orlando, p:209-230.
- Krauss A, Marschner H** (1982). Influence of nitrogen nutrition, daylength and temperature on contents of gibberellic and abscisic acid and on tuberization in potato plants. *Potato Res* **25**:13-21.
- Kubasek WL, Shirley BW, Mckillop A, goodman HM, Briggs W, Ausubel FM** (1992). Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* **4**: 1229-1236.
- Kumar D, Wareing PF** (1973). Studies on tuberization of *Solanum andigena*. II. Growth hormones and tuberization. *New Phytol* **73**: 833-840.
- Kumar D, Wareing PF** (1974). Studies on tuberization of *Solanum andigena*. *New Phytol.* **73**: 833-840.

- Kusaba S, Fukumoto M, Honda C, Yamaguchi I, Sakamoto T, Kano-Murakami Y.** (1998). Decreased GA1 content caused by the overexpression of OSH1 is accompanied by suppression of GA 20-oxidase gene expression. *Plant Physiol.* **117**, 1179-84.
- Kwok SF, Solano R, Tsuge T, Chamovitz DA, Ecker JR, Matsui M, Deng XW.** (1998). Arabidopsis homologs of a c-Jun coactivator are present both in monomeric form and in the COP9 complex, and their abundance is differentially affected by the pleiotropic cop/det/fus mutations. *Plant Cell.* **10**, 1779-90.
- Kwok SF, Staub JM, Deng XW.** (1999). Characterization of two subunits of Arabidopsis 19S proteasome regulatory complex and its possible interaction with the COP9 complex. *J Mol Biol.* **285**, 85-95.
- Laemmli UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685
- Lagarias JC, Lagarias DM** (1989). Self-assembly of synthetic phytochrome haloprotein in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5778-5780.
- Lanahan MB, Ho T-HD** (1988). Slender barley: a constitutive gibberellin-response mutant. *Planta* **175**: 107-114.
- Lange T, Hedden P, Graebe JE** (1994). Expression cloning of a gibberellin 20-oxidase, a multifunctional enzyme involved in gibberellin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8552-8556.
- Lange T, Robatzek S, Frisse A** (1997). Cloning and expression of a gibberellin 2,3 -hydroxylase cDNA from pumpkin endosperm. *Plant Cell* **9**: 1459-1467.
- Lange T.** (1998). Molecular biology of gibberellin synthesis. *Planta.* **204**, 409-419.
- Lauber M.H., Waizenegger I., Steinmann T., Schawarz H., Mayer U., Hwarg I., Lukowitz W. and Jürgens G.** (1997). The *Arabidopsis* KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin. *J. Cell Biol.* **139**, 1485-1493.
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H** (1977). RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**:4743-4751.
- Lenton JR, Hedden P, Gale MD** (1987). Gibberellin insensitivity and depletion in wheat- consequences for development. In: *Hormone action in plant development: A critical appraisal*, Hoad GV, Lenton JR, Jackson MB, Atkin RK (eds), pp 145-160, Butterworths, London, UK.
- Lercari B, Sodi F, Lipucci di Paola M** (1990). Photomorphogenic responses to UV radiation: Involvement of phytochrome and UV photoreceptors in the control of hypocotyl elongation in *Lycopersicon esculentum*. *Physiol Plant* **79**: 668-672.

- Lester DR, Ross JJ, Davies PJ, Reid JB** (1997). Mendel's stem length gene (*Le*) encodes a gibberellin 3-hydroxylase. *Plant Cell* **9**: 1435-1443.
- Li J, Ou-Lee TM, Raba R, Amundson RG, Last RL** (1993). Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* **5**: 171-179.
- Lin C, Ahmad M, Chan J, Cashmore AR** (1996). *CRY2*: a second member of the Arabidopsis cryptochrome gene family. *Plant Physiol* **110**:1047.
- Lin C, Yang H, Guo H, Mockler T, Chen J, Cashmore AR** (1998). Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 2686-2690.
- Lin, C.** (2000). Plant blue light receptors. *Trends Plant Sci.* **5**,337-342
- Liscum E, Hangarter RP** (1993). Phototropic mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal activities of multiple photosensory systems during light-stimulated apical-hook opening. *Planta* **191**: 214-221.
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L** (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* **163**:16-20.
- López-Juez E, Buurmeijer WF, Heeringa GH, Kendrick RE and Wesseliu JC.** (1990). Response of light-grown wild-type and long hypocotyl mutant cucumber plants to end-of-day far-red light. *Photochem Photobiol.* **52**, 143-149.
- López-Juez E, Nagatani A, Tomizawa K-I, Deak M, Kern R, Kendrick RE and Furuya M.** (1992). The cucumber long hypocotyl mutant lacks a light-stable PHYB-like phytochrome. *Plant Cell.* **4**. 241-251.
- Lopez-Juez E, Kobayashi M, Sakurai A, Kamira Y, Kendrick RE.** (1995). Phytochrome, gibberellins and hypocotyl growth. *Plant Physiol.* **107**, 131-140.
- Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM.** (1999) RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 11364-9.
- Lovegrove A, Barratt DHP, Beale MH and Hooley R.** (1998). Gibberellin photoaffinity labelling of two polypeptides in plant plasma membrane. *Plant J.* **15**, 311-320.
- Lumbreras V., Alba MM., Kleinow T., Koncz C., Pages M.** (2001) Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. *EMBO Rep.* **2**, 55-60.
- Lumsden PJ and Millar AJ, eds.** (1998). *Biological Rhythms and photoperiodism in plants.* BIOS Scientific Publisher Ltd.
- Mandava NB** (1988). Plant growth promoting brassinosteroids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **39**: 23-52.

BIBLIOGRAFIA

- Mancinelli AL** (1994). The physiology of phytochrome. In: Kendrick RE, Kronenberg GHM (eds) *Photomorphogenesis in plants*, 2nd edn, Kluwer, Dordrecht, pp 211-269.
- Martin C, Vernay R, Painot N** (1982). Physiologie végétale. Photopériodisme, tubérisation, floraison et phénolamides. *CR Acad Sc Paris* **295**: 565-568.
- Martin C, Gerats T** (1993). Control of pigment biosynthesis genes during petal development. *Plant Cell* **5**: 1253-1264.
- Martin DN, Proebsting WM, Parks TD, Dougherty WG, Lange T, Lewis MJ, Gaskin P, Hedden P** (1996). Feed-back regulation of gibberellin biosynthesis and gene expression in *Pisum sativum* L. *Planta* **200**: 159-166.
- Martin DN, Proebsting WM, Hedden P** (1997). Mendel's dwarfing gene: cDNAs from the Le alleles and the function of the expressed proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 8907-8911.
- Martin DN, Proebsting WM, Hedden P** (1999). The SLENDER gene of pea encodes a gibberellin 2-oxidase. *Plant Physiol.* **121**, 775-81.
- Mata J and Nurse P.** (1997). Tea1 and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell. *Cell.* **89**, 939-949.
- Mathews S, Lavin M, Sharrock RA** (1995). Evolution fo the phytochrome gene family and its utility for phylogenetic analyses of angiosperms. *Anal. Missouri Bot Garden* **82**: 296-321.
- Matsui M, Stoop CD, von Arnim AG, Wei N, Deng XW.** 1995Arabidopsis COP1 protein specifically interacts in vitro with a cytoskeleton-associated protein, CIP1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**, 4239-43.
- McClung CR.** (2000). Circadian rhythms in plants: a millennial view. *Physiol Plant.* **109**, 359-371.
- McCormac AC, Wagner D, Boylan MT, Quail PH, Smith H, Whitelam GC** (1993). Photoresponses of transgenic Arabidopsis seedlings expressing introduced phytochrome B-encoding cDNAs: evidence that phytochrome A and phytochrome B have distinct photoregulatory functions. *Plant J* **4**:19-27.
- McCrea P., C. Turck and B. Gumbier.** (1991). A homolog of *armadillo* protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-Cadherin. *Science.* **254**, 1359-1361.
- McMichael JrRW, Lagarias JC** (1990). Phosphopeptide mapping of *Avena* phytochrome phosphorylated by protein kinases *in vitro*. *Biochem* **29**: 3872-3878.
- McNellis TW, Deng X-W** (1995). Light control of seedling morphogenetic pattern. *Plant Cell* **7**: 1749-1761.

- Mechthild Hatzfeld.** (1999). The Armadillo family of structural proteins. *International review of cytology*. **186**, 179-224.
- Mendel G** (1866) *Experiments in Plant Hybridization*. Royal Horticultural Society of London, translation (1938), Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Mendu N, Silflow CD** (1993). Elevated levels of tubulin transcripts accompany the GA₃-induced elongation of oat internode segments. *Plant Cell Physiol* **34**: 973-983.
- Millar AJ, McGrath RB, Chua NH** (1994). Phytochrome phototransduction pathways. *Annu Rev Genet* **28**: 325-349.
- Millar AJ, Kay SA.** (1997). The genetics of phototransduction and circadian rhythms in *Arabidopsis*. *BioEssays*. **19**. 209-214.
- Miller J.R. and Moon R.T.** (1997). Analysis of the signaling activities of localization mutants of b-catenin during axis specification in *Xenopus*. *J. Cell Biol.* **139**, 229-243.
- Miséra S, Müller AJ, Weiland-Heidecker V, Jürgens G** (1994). The *FUSCA* genes of *Arabidopsis*: negative regulators of light responses. *Mol Gen Genet* **244**: 242-252.
- Monte E.** (1998). Tesi doctoral. Aïllament i caracterització de clons de cDNA de fulla de patata (*Solanum demissum*) induïts durant el procés de tuberització.
- Mullis KB, Faloona F, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **51**:263-273.
- Murashige T, Skoog F** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497.
- Murfet IC** (1990). Internode length and anatomical changes in *Pisum* genotypes *cry*^s and *cry*^c in response to extended daylength and applied gibberellin A₁. *Physiol Plant* **79**: 497-505.
- Muzin AG.** (1992). Structural principles for the propeller assembly of beta-sheets: the preference for seven-fold symmetry. *Proteins*.**14**, 191-201.
- Nakajima M, Takita K, Wada H, Mihara T Hasegawa M and Yamaguchi I.** (1997). Partial purification and characterization of a gibberellin-binding protein from seedlings of *Azukia angularis*. *Biochem Biophys Res Commun.* **241**, 782-786.
- Nelson DC, Lasswell J, Rogg LE, Cohen MA and Bartel B.** (2000). *FKF1*, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell.* **101**, 331-340.
- Ni M, Tepperman JM, Quail PH.** (1999). Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature.* **400**. 781-4.

Ogas J, Cheng JC, Sung ZR, Somerville C. (1997). Cellular differentiation regulated by gibberellin in the *Arabidopsis thaliana* pickle mutant. *Science*. **277**, 91-4.

Ogawa M, Kusano T, Katsumi M and Sano H. (2000). Rice gibberellin-insensitive gene homolog, *OsGAI*, encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level. **245**, 21-29.

Okazawa Y (1960). Studies on the relation between the tuber formation of potato plant and its natural gibberellin content. *Proc Crop Sci Soc Japan* **29**: 121-124.

Okazawa Y (1967). Physiological studies on the tuberization of potato plants. *J Fac Agric Hokkaido Univ* **55**: 267-347.

Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N, Deng XW. (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature*. **405**, 462-6.

Osterlund MT and Deng XW. (1998). Multiple Photoreceptors mediate the light-induced reduction of GUS-COP1 from *Arabidopsis* hypocotyl nuclei. *The Plant Journal*. **16**, 201-208.

Paiva E, Lister RM, Park WD (1983). Induction and accumulation of major tuber proteins of potato in stems and petioles. *Plant Physiol* **71**: 161-168.

Park DH et al., (1999). Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the *Arabidopsis* *GIGANTEA* gene. *Science*. **285**, 1579-1582.

Parks BM, Quail PH. (1993). *hy8*, a new class of *arabidopsis* long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *Plant Cell*. **5**, 39-48.

Patton EE, et al., (1998). Combinational control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't skip the F-box hypothesis. *Trends Genet*. **14**, 236-243.

Patton E.E., Willems A.R. and Tyers M. (1998). Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't skip the F-box hypothesis. *Trends Genet*. **14**, 236-243.

Pearson WR, Lipman DJ (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:2944-2948.

Peifer M., and Wieschaus E. (1990). The segment polarity gene *armadillo* encode a functionally modular protein that is the *Drosophila* homolog of human plakoglobin. *Cell*. **63**, 1167-1176.

Peng J, Harberd NP (1993). Derivative alleles of the *Arabidopsis* gibberellin-insensitive (*gai*) mutation confer a wild-type phenotype. *Plant Cell* **5**: 351-360.

Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP (1997). The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* **11**: 3194-3205.

- Peng J, Richards DE, Moritz T, Cano-Delgado A, Harberd NP.** (1999). Extragenic suppressors of the *Arabidopsis* *gai* mutation alter the dose-response relationship of diverse gibberellin responses. *Plant Physiol.* **119**, 1199-208.
- Penson SP, Schuurink RC, Fath A, Gubler F, Jacobsen JV and Jones RL.** (1996). CGMP is required for gibberellic acid-induced gene expression in barley aleurona. *Plant Cell.* **8**, 2325-2333.
- Pepper A, Delaney T, Washburn T, Poole D, Chory J** (1994). DET1, a negative regulator of light-mediated development and gene expression in *Arabidopsis*, encodes a novel nuclear-localized protein. *Cell* **78**: 109-116.
- Peters J.M.** (1998). SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 759-768.
- Phillips AL, Ward DA, Uknes S, Appleford NEJ, Lange T, Huttly AK, Gaskin P, Graebe JE, Hedden P** (1995). Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **24**: 603-615.
- Phillips J and Herskowitz.** (1998). Identification of Kel1P, a kelch domain-containing protein involved in cell fusion and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **143**, 375-389.
- Potts WC, Reid JB, Murfet IC** (1985). Internode length in *Pisum*. Gibberellins and the slender phenotype. *Physiol Plant* **63**: 357-364.
- Prat S, Fromer WB, Höfgen R, Keil M, Kossmann J, Köster-Töpfer M, Liu XJ, Müller B, Peña-Cortés H, Rocha-Sosa M, Sánchez-Serrano JJ, Sonnewald U, Willmitzer L** (1990). Gene expression during tuber development in potato plants. *FEBS L* **268** (2): 334-338.
- Prat S, L. Willmitzer and JJ Sánchez-Serrano.** (1989). Nuclear proteins binding to a cauliflower mosaic virus 35S truncated promoter. *Mol Gen. Gemet.* **217**, 209-214.
- Pratt, L H** (1995). Phytochromes: differential properties, expression patterns and molecular evolution. *Photochem Photobiol* **61**:10-21.
- Pratt LH, Cordonnier-Pratt MM, Hauser B, Caboche M** (1995). Tomato contains two differentially expressed genes encoding B-type phytochromes, neither of which can be considered an ortholog of *Arabidopsis* phytochrome B. *Planta* **197**: 203-206.
- Quail PH** (1994a). Photosensory perception and signal transduction in plants. *Curr Opin Genet Dev* **4**: 389-409.
- Quail PH** (1994b). Phytochrome genes and their expression. In: *Photomorphogenesis in Plants*, 2nd ed, Kendrick R E, Kronenberg GHM, ed Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp:71-104.

Quail PH (1997a). An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant Cell and Environment* **20**: 657-665.

Quail PH, Boylan MT, Parks BM, Short TW, Xu Y, Wagner D (1995). Phytochromes: Photosensory perception and signal transduction. *Science* **268**: 675-680.

Racca WR, Tizio R (1968). A preliminary study of changes in the content of gibberellin-like substances in the potato plant in relation to the tuberization mechanism. *Eur Potato J* **11**: 213-220.

Railton ID, Wareing PF (1973). Effects of daylength on endogenous gibberellins in leaves of *Solanum andigena*. *Physiol Plant* **28**: 88-94.

Raventos D, Meier C, Mattsson O, Jensen AB, Mundy J. (2000) Fusion genetic analysis of gibberellin signaling mutants. *Plant J.* **22**, 427-38.

Raventos D, Skriver K, Schlein M, Karnahl K, Rogers SW, Rogers JC, Mundy J. (1998) HRT, a novel zinc finger, transcriptional repressor from barley. *J Biol Chem.* **273**, 23313-20.

Rebers M, Kaneta T, Kawaide H, Yamaguchi S, Yang YY, Imai R, Sekimoto H, Kamiya Y (1999). Regulation of gibberellin biosynthesis genes during flower and early fruit development of tomato. *Plant J* **17**: 241-250.

Reed JW, Nagatani A, Elich TD, Fagan M, Chroy J (1994). Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in *Arabidopsis* development. *Plant Physiol* **104**: 1139-1149.

Reed JW, Foster KR, Morgan PW, Chory J. (1996) Phytochrome B affects responsiveness to gibberellins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **112**, 337-342.

Reed JW. (1999). Phytochromes are Pr-iptetic kinases. *Curr Opin Plant Biol.* **2**, 393-7.

Reed JW, Nagpal P, Poole DS, Furuya M and Chory J. (1993). Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B in the cell elongation and physiological responses through *Arabidopsis* development. *Plant Cell.* **93**, 147-157.

Reichel C, Marthur J, Ecker P, Lagenkemper K, Koncz C, Schell J, Reiss B and Maas C. (1996). Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cell. *Proc. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 5888-5893.

Riggleman B, Wieschaus E and Schedl P. (1989). Molecular analysis of the armadillo locus: Uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene. *Genes Dev.* **3**, 96-113.

Renault L. (1998). The 1 A crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller. *Nature.* **392**, 97-101.

- Ritchie S and Gilroy S.** (1998). Calcium-dependent protein phosphorylation may mediate the gibberellic acid response in barley aleurone. *Plant Physiol.* **116**, 765-776.
- Robertson M, Swain SM, Chandler PM and Olszewski NE.** (1998). Identification of a negative regulator of gibberellin action, HvSPY, in barley. *Plant Cell.* **10**, 995-1007.
- Robinson DN and Cooley.** (1997). *Drosophila* kelch is an oligomeric ring canal actin organizer. *J. Cell. Biol.* **138**, 799-810.
- Rocha-Sosa M, Sonnewald U, Frommer W, Stratmann M, Schell J, Willmitzer L** (1989). Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J* **8**:23-29.
- Rogers JC, Lanahan MB and Rogers SW.** (1994). The *cis*-acting gibberellin response complex high-pI α -amylase promoters. *Plant Physiol.* **105**, 151-158.
- Rood SB, Williams PH, Pearce D, Murofuchi N, Pharis P.** (1990). A mutant gene that increases gibberellin production in *Brassica rapa*. *Plant Physiol.* **93**, 1168-1174..
- Ruegger M., Dewey E., Gray W.M., Hobbie L., Turner J. and Estelle M.** (1998). The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and Yeast Grr1p. *Genes Dev.* **12**, 198-207.
- Samach A., Klenz J.E., Kohalmi S.E., Risseuw E., Haughn G.W. and Crosby W.L.** (1999). The *UNUSUAL FLORAL ORGANS* gene of *Arabidopsis thaliana* is a F-box protein required for normal partening and growth in the floral meristem. *Plant J.* **20**, 433-445.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- Sánchez-Serrano JJ, Schmidt R, Schell J, Willmitzer L** (1986). Nucleotide sequence of proteinase inhibitor II encoding cDNA of potato (*Solanum tuberosum*) and its mode of expression. *Mol Gen Genet* **203**: 15-20.
- Sattelmacher B, Marschner H** 1978. Relation between nitrogen, cytokinin activity and tuberization in *Solanum tuberosum* L. *Physiol Plant* **44**:65-68.
- Schwechheimer C, Deng XW.** (2000). The COP/DET/FUS proteins-regulators of eukaryotic growth and development. *Semin Cell Dev Biol.* **11**, 495-503.
- Schaffer R, Ramsay N, Samach A, Corned S, Putterill J, Carré I and Couplan G.** (1998). The late elongated hypocotyl mutation in *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell.* **93**, 1219-1229).
- Scott DB, Jin W, Ledford HK, Jung HS, Honma MA.** (1999). EAF1 regulates vegetative-phase change and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **120**, 675-84.

Serino G, Tsuge T, Kwok S, Matsui M, Wei N, Deng XW. (1999). *Arabidopsis cop8* and *fus4* mutations define the same gene that encodes subunit 4 of the COP9 signalosome. *Plant Cell*. **11**, 1967-80.

Shinomura T, Nagatani A, Hanzawa H, Kubota M, Watanabe M, Furuya M. (1996) Action spectra for phytochrome A- and B- specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**, 8129-8133.

Shinomura T, Uchida K, Furuya M. (2000) Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high-irradiance response of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **122**, 147-156.

Silverstone AL, Chang CW, Krol E, Sun T-p (1997). Developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene *GAI* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **12**: 9-19.

Silverstone AL, Mak PYA, Martínez EC, Sun T-p (1998). The *Arabidopsis RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal-transduction pathway. *Plant Cell* **10**: 155-169.

Simoens C, Alliotte T, Mendel R, Müller A, Schiemann J, Van Lijsebettens M, Schehl J, Van Montagu M and Inzé D. (1986). A binary vector for transferring genomic libraries to plants. *Nuc. Acids Res*. **14**, 1745-1757.

Skriver K, Olsen FL, Rogers JC and Mundy H. (1991). *Cis*-Acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 7266-7270.

Smith H. (1982). Light quality, photoperception and plant strategy. *Annu. Rev. Plant Physiol*. **33**, 481-518.

Smith H (1995). Physiological and ecological functions within the phytochrome family. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 289-315.

Smith MW, et al. (1998). The first step of gibberellin biosynthesis in pumpkin is catalysed by at least two copalyl diphosphate synthases encode by differentially regulated gene. *Plant Physiol*. **118**, 1411-1419.

Snyder RG, Ewing EE (1989). Interactive effects of temperature, photoperiod, and cultivar on tuberization of potato cuttings. *Hort Science* **24**: 336-338.

Soltysik-Espanola M, et al., (1999). Characterization of Mayven, a novel actin binding protein predominantly expressed in brain. *Mol. Biol. Cell*. **10**, 2361-2375.

Somers DE, Schultz TF, Milnamow M and Kay SA. (2000) ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell*. **101**, 319-329.

Somers DE, Sharrock RA, Tepperman JM, Quail PH (1991). The *hy3* long hypocotyl mutant of *Arabidopsis* is deficient in phytochrome B. *Plant Cell* **3**: 1263-1274.

- Somers DE, Devlin PF, Kay SA** (1998). Phytochromes and Cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **282**: 1488-1490.
- Southern E** (1975). Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods in enzymology*, Academic Press **68**:152-176.
- Sponsel VM** (1995). Gibberellin biosynthesis and metabolism. In: *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. ed PJ Davies, pp 66-97. Dordrecht: Martinus Nijhof.
- Spray CR, Kobayashi M, Suzuki Y, Phinney BO, Gaskin P, MacMillan J** (1996). The dwarf-1 (d1) mutation of *Zea mays* blocks three steps in the gibberellin biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10515-10518.
- Stacey GM, Hincks NS and von Arnim GA.** (1999). Discrete domains mediate the light-responsive nuclear and cytoplasmic localization of *Arabidopsis* COP1. *The Plant Cell*. **11**, 349-363.
- Steward FC, Moreno V, Roca WM** (1981). Growth form and composition of potato plants as affected by environment. *Ann Bot* **48** (2):1-45.
- Sun T-p, Goodman HM, Ausubel FM** (1992). Cloning of the *Arabidopsis* *GAI* locus by genomic subtraction. *Plant Cell* **4**: 119-128.
- Sun T-p, Kamiya Y** (1994). The *Arabidopsis* *GAI* locus encodes the cyclase *ent*-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **6**: **1509-1518**.
- Sun T-p** Gibberellin signal transduction. (2000). *Curr Opin Plant Biol*. **3**, 374-80.
- Swain SM, Olszewski NE** (1996). Genetic analysis of gibberellin signal transduction. *Plant Physiol* **112**: 11-17.
- Szekeress M, Németh K, Koncz-Kálmán Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Rédei GP, Nagy F, Schell J, Koncz C** (1996). Brassinoesteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* **85**: 171-182.
- Talon M, Koornneef M, Zeevaart JAD** (1990). Endogenous gibberellins in *Arabidopsis thaliana* and possible steps blocked in the biosynthetic pathways of the semidwarf *ga4* and *ga5* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7983-7987.
- Tanaka-Ueguchi M, Itoh H, Oyama N, Koshioka M, Matsuoka M.** (1998). Over-expression of a tobacco homeobox gene, NTH15, decreases the expression of a gibberellin biosynthetic gene encoding GA 20-oxidase. *Plant J*. **15**, 391-400.
- Taylor B, and Zhulin IB.** (1999). PAS domain: internal sensor of oxygen, redox potential and light. *Microbiol. Biol. R.* **63**, 479-506.

Tevini M, Tenamura AH (1989). UV-B effects on terrestrial plants. *Photochem Photobiol* **50**: 479-487.

Thomas B. (1998). Photoperiodism: an overview. In *biological rhythms and photoperiodism in plants* (Lumsden PJ and Miller AJ, eds), PP. 151-165, BIOS Scientific.

Thomas SG, Phillips AL, Hedden P (1999). Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 4698-4703.

Tizio R (1971). Action et rôle probable de certaines gibbérellines ($A_1, A_3, A_4, A_5, A_7, A_9$ et A_{13}) sur la croissance des stolons et la tuberisation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Res* **14**: 193-204.

Torii KU, McNellis TW, Deng XW. (1998). Functional dissection of Arabidopsis COP1 reveals specific roles of its three structural modules in light control of seedling development. *EMBO J.* **17**, 5577-87.

Torii KU, Stoop-Myer CD, Okamoto H, Coleman JE, Matsui M, Deng XW. (1999). The RING finger motif of photomorphogenic repressor COP1 specifically with the RING-H2 motif of a novel Arabidopsis protein. *J Biol Chem.* **274**, 27674-81.

Toyomasu T, Kawaide H, Mitsubashi W, Inoue Y, Kamiya Y (1998). Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiol* **118**: 1517-1523.

Ueguchi-Tanaka M, Fujisawa Y, Kobayashi M, Ashikari M, Iwasaki Y, Kitano H, Matsuoka M. (2000). Rice dwarf mutant d1, which is defective in the alpha subunit of the heterotrimeric G protein, affects gibberellin signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 11638-43.

van der Berg JH, Simko I, Davies PJ, Ewing EE, Halinska A (1995). Morphology and (^{14}C) gibberellin A_{12} metabolism in wild-type and dwarf *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* grown under long and short photoperiods. *J Plant Physiol* **146**: 467-473.

van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A. (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature.* **398**, 627-30.

van der Knaap E, Kim JH, Kende H. (2000) A novel gibberellin-induced gene from rice and its potential regulatory role in stem growth. *Plant Physiol.* **122**, 695-704.

van der Knaap E, Song WY, Ruan DL, Sauter M, Ronald PC, Kende H. (1999). Expression of a gibberellin-induced leucine-rich repeat receptor-like protein kinase in deepwater rice and its interaction with kinase-associated protein phosphatase. *Plant Physiol.* **120**, 559-70.

- van der Wetering M., Caballo R., van Beest M., van Es J., Loureiro J., Ypma A., Hursh D., Jones T., Bejsovec A., Peifer M., Mortin M and Clevers H.** (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell*. **88**, 789-799.
- Vierstra RD** (1994). Phytochrome degradation. In: Kendrick RE, Kronenberg GHM (eds) *Photomorphogenesis in Plants*, 2nd edn, Kluwer, Dordrecht, pp 141-162.
- Wagner D, Fairchild CD, Kuhn RM, Quail PH** (1996a). Chromophore-bearing NH₂-terminal domains of phytochromes A and B determine their photosensory specificity and differential light lability. *Plant Cell* **8**: 859-871.
- Wagner D, Koloszvari M, Quail PH** (1996b) Two small spatially distinct regions of phytochrome B are required for efficient signaling rates. *Plant Cell* **8**: 859-871.
- Wagner D, Hoecker U, Quail PH** (1997). RED1 is necessary for phytochrome B-mediated red light-specific signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**: 731-743.
- Wang ZY and Tobin EM.** (1998). Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED (CCA1)* gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell*. **93**, 1207-1217.
- Wei N, Chamovitz DA, Deng XW** (1994). Arabidopsis COP9 is a component of a novel signalling complex mediating light control of development. *Cell* **78**: 117-124.
- Weller JL, Ross JJ, Reid JB.** (1994). Gibberellins and phytochrome regulation of stem elongation in pea. *Planta*. **192**, 489-496.
- Weller JL, Murfet IC and Reid JB.** (1997). Pea mutants with reduced sensitivity to far-red light define an important role for phytochrome A in day-length detection. *Plant Physiol*. **114**, 1225-1236.
- Wenyan X. And Jyan-Chyun J.** (2000). F-box proteins in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, **5**, 454-457.
- Whitelam GC, Johnson E, Peng J, Carol P, Anderson ML** (1993). Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild type phenotype in white light. *Plant Cell* **5**: 757-768.
- Willert K. and R. Nusse** (1999). -catenin: A key mediator of Wnt signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 95-102.
- Williams J, Phillips AL, Gaskin P, Hedden P** (1998). Function and substrate specificity of the Gibberellin 3 -hydroxylase encoded by the Arabidopsis *GA4* gene. *Plant Physiol* **117**: 559-563.
- Wilson MI, Greenberg BM** (1993). Specificity and photomorphogenic nature of ultraviolet-B-induced cotyledon curling in *Brassica napus* L. *Plant Physiol* **102**: 671-677.

Wilson RN, Heckman JW, Somerville CR (1992). Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol* **100**: 403-408.

Wilson RN, Somerville CR (1995). Phenotypic suppression of the gibberellin-insensitive mutant (*gai*) of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **108**: 495-502.

Winkler RG, Freeling M (1994). Physiological genetics of the dominant gibberellin-nonresponsive maize dwarfs, *Dwarf8* and *Dwarf9*. *Planta* **193**: 341-348.

Winkler RG, Helentjaris T (1995). The maize *Dwarf3* gene encodes a cytochrome P450-mediated early step in gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 1307-1317.

Winston J.T., Koepf D.M. et al., (1999). A family of mammalian F-box proteins. *Curr. Biol.* **9**, 1180-1182.

Withelam G and Harberd N. (1994). Action and function of phytochrome family members revealed through the study of mutant and transgenic plants. *Plant Cell.* **17**, 615-625.

Wu K, Li L, Gage DA, Zeevaart JA. (1996). Molecular cloning and photoperiod-regulated expression of gibberellin 20-oxidase from the long-day plant spinach. *Plant Physiol.* **110**, 547-54.

Yanovsky MJ, Izaguirre M, Wagmaister JA, Gatz C, Jackson SD, Thomas B, Casal JJ. (2000). Phytochrome A resets the circadian clock and delays tuber formation under long days in potato. *Plant J.* **23**, 223-232.

Yeh KC, Lagarias JC. (1998). Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 13976-13981.

Xie D-X., Feys B., James S., Nieto-Rostro M., and Turner J.G., (1998). *COL1*-an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science.* **280**, 1091-1094.

Xu X, van Lammeren AM, Vermeer E, Vreugdenhil D (1998). The role of gibberellin, abscisic acid and sucrose in the regulation of potato tuber formation *in vitro*. *Plant Physiol* **117**:575-584.

Xu YL, Li L, Wu K, Peeters AJM, Gage DA, Zeevaart JAD (1995). The *GA5* locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: Molecular cloning and functional expression. *Proc Natl acad Sci USA* **92**: 6640-6644.

Xu YL, Gage DA, Zeevaart JAD (1997). Gibberellins and stem growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **114**:1471-1476.

Xue F and Cooley L. (1993). Kelch encodes a component of intercellular bridges in *Drosophila* egg chambers. *Cell.* **72**, 681-693.

Yamaguchi S, Smith MW, Brown RGS, Kamiya Y, Sun T-p (1998). Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3 -hydroxylase genes in germinating Arabidopsis seeds. *Plant Cell* **10**: 2115-2126.

Yamamoto YY, Matsui M, Ang LH, Deng XW. (1998). Role of a COP1 interactive protein in mediating light-regulated gene expression in arabidopsis. *Plant Cell.* **10**, 1083-94.

Yoshihara T, Anmanuma M, Tsutsumi T, Okamura Y, Matsuura H, Ichihara A (1996). Metabolism and transport of [2-¹⁴C] (+/-) jasmonic acid in the potato plant. *Plant Cell Physiol* **37**: 586-590.

Young I, Liscum E, Hangarter R (1992). Spectral-dependence of light-inhibited hypocotyl elongation in photomorphogenic mutants of Arabidopsis. Evidence for a UV-A photosensor. *Planta* **188**: 25-29.

Zagotta MT, Hicks KA, Jacobs CI, Hangarter RP and Meeks-Wagner DR. (1996). The *Arabidopsis* *ELF3* gene regulates vegetative photomorphogenesis and the photoperiodic induction of flowering. *Plant J.* **10**, 691-702.

Zhu Y, Tepperman JM, Fairchild CD, Quail PH. (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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 13419-13424.