Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Rol de las proteínas B-box en las respuestas de escape al sombreado en Arabidopsis thaliana

Crocco, Carlos Daniel

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Crocco, Carlos Daniel. (2012). Rol de las proteínas B-box en las respuestas de escape al sombreado en Arabidopsis thaliana. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Crocco, Carlos Daniel. "Rol de las proteínas B-box en las respuestas de escape al sombreado en Arabidopsis thaliana". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Rol de las proteínas B-box en las respuestas de escape al sombreado en *Arabidopsis thaliana*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. Carlos Daniel Crocco

Director de tesis: Dr. Javier Botto

Consejero de Estudios: Dr. Jorge Muschietti

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas Vinculadas a la Agricultura (IFEVA) - FAUBA - CONICET.

Buenos Aires, 2012

PÁGINA DEL JURADO

Dra. Gabriela Amodeo - Profesora Adjunta. BBE. FCEN. UBA.
Investigadora Independiente CONICET.

Dra. Mariana Obertello - Investigadora Asistente CONICET, INGEBI.

Dr. Pablo Cerdán - Profesor Adjunto. FBMC. FCEN. UBA.
Investigador Adjunto CONICET

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dedicar la finalización de esta Tesis Doctoral a todas aquellas personas que me han acompañado y facilitado su apoyo, consejo y ánimo a lo largo de este proceso, sin las cuales no hubiera sido posible lograr este objetivo.

En primer lugar agradecer a mi director de tesis, Javier Botto, no sólo por ofrecerme sus conocimientos y experiencia profesional, sino también por animarme y alentarme en cada una de las fases de la investigación. Hago extensivos estos agradecimientos a Marcelo Yanovsky por el interés que ha puesto en esta investigación y las valiosas sugerencias aportadas.

Agradezco a CONICET por el aporte entregado mediante su beca nacional de doctorado y a toda la gente del IFEVA, que de alguna u otra manera contribuyeron durante todos estos años para que pueda conducir todos los experimentos.

A mis compañeros de laboratorio, gracias por hacer más agradable el día a día, y hacer de nuestro lugar de trabajo un espacio más entretenido y distendido para investigar.

A todos con quienes comparto diferentes actividades fuera de la ciencia y hacen que la vida tenga un poco más de sustancia. Sin saberlo, también fueron una parte fundamental de este proceso.

Pero mi mayor agradecimiento se lo debo a mis padres, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado a lo largo de la vida. De ellos aprendí el sentido de la responsabilidad, la constancia y otros muchos valores que cultivé a través de su ejemplo. Les agradezco inmensamente todos los esfuerzos que han realizado para darme una educación.

A todos, mi más sincero agradecimiento.

RESÚMEN

Rol de las proteínas B-Box en las respuestas de escape al sombreado en *Arabidopsis thaliana*

Cuando las plantas crecen a altas densidades perciben la presencia temprana de plantas vecinas sensando los cambios en la calidad de luz que las rodea. Esta percepción es mediada principalmente por los fitocromos, una familia de fotorreceptores que detectan una reducción en la relación rojo:rojo lejano (R:RL) causada por la proximidad de plantas vecinas induciendo un conjunto de respuestas morfo-fisiológicos tales como la elongación de hipocotilo y tallo, dominancia apical, aceleración de la floración, entre otros. Este conjunto de respuestas plásticas constituye "el síndrome de escape al sombreado", SAS (del inglés, Shade Avoidance Syndrome). Si bien en los últimos años se ha comenzado a comprender los mecanismos moleculares involucrados en la SAS, aún nuestro conocimiento es escaso. En esta tesis estudiamos la función de las proteínas B-Box (BBX) en la señalización de la SAS en plántulas de *Arabidopsis thaliana,* enfocando nuestra atención en un subgrupo de esta familia que se caracteriza por presentar un doble dominio B-box en su región amino terminal. La caracterización fisiológica de algunos mutantes simples nos permitió demostrar que BBX18 y BBX24 promueven, mientras que BBX19, BBX21, BBX22 inhiben la respuesta de elongación por sombra. En particular, estudiamos el mecanismo de acción de BBX21 y BBX24 en la señalización de las SAS mediante aproximaciones genéticas-moleculares y fisiológicas. La escasa similitud que detectamos entre los transcriptomas asociados a BBX21 y BBX24 en respuesta a las señales de sombra sugiere que ambas proteínas participarían por vías distintas de señalización. En sombra prolongada, la función de BBX21 es inhibir la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en el crecimiento y proliferación celular, mientras que BBX24 promueve la expresión de genes del metabolismo y señalización de hormonas vinculadas a la SAS. Por medio de aproximaciones genéticas demostramos que BBX21 modula esta respuesta interaccionando genéticamente con COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1), un represor maestro de la fotomorfogénesis que promueve la SAS. También demostramos que BBX24 participa en la misma vía de señalización que PIF4 (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4), un factor de transcripción que promueve la elongación, y que interviene en la síntesis de giberelinas para promover la SAS. En base a los resultados obtenidos, se propone un posible mecanismo de acción de estas proteínas BBX en la modulación de la respuesta de escape al sombreado.

Palabras claves: Escape al sombreado, canopeo, proteínas B-Box, fitocromo, *Arabidopsis*

ABSTRACT

Role of B-Box proteins in the shade avoidance responses in *Arabidopsis thaliana*

Plants grown at high densities perceive the presence of neighboring plants by sensing changes in light quality that surrounds and adapt their growth and development (Ballaré et al., 1990). This perception is mediated primarily by phytochrome, a family of photoreceptors that detect a reduction in the red:far red (R:RL) ratio as reliable indicator of future competition. Low R:FR light is perceived by the phytochromes, triggering dramatic changes in gene expression which lead to changes at morpho-physiological levels of shaded plants, such as hypocotyl and stem elongation, apical dominance and acceleration of flowering, which are collectively known as the shade-avoidance syndrome (SAS). Using *Arabidopsis thaliana* as model system, we study the role of B-Box proteins (BBX) in the SAS signaling pathway. Our study focused on the characterization of a subset of these BBX proteins, which have a high homology between their sequences and two B-box domains at the N-terminal region. The physiological characterization of some single mutants allowed us to demonstrate that while BBX18 and BBX24 promote elongation, BBX19, BBX21 and BBX22 inhibit elongation response under shade. We use physiological, genetic and molecular approach to understand the mechanism of action of BBX21 and BBX24 in the SAS signalling pathway. The low similarity between the transcriptomes of BBX24 and BBX21 suggested that both proteins participate by different signaling pathways to modulate SAS. In long term shade, BBX21 inhibits the expression levels of genes that promote cell growth and proliferation, while BBX24 is promoting genes involve in hormones biosynthesis and signaling pathway related to the shade. Applying genetic approaches, we demonstrated that BBX21 interacting genetically with COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1), a master repressor of photomorphogenesis, in the regulation of SAS. We also demonstrated that BBX24 and PIF4 (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4) are part of the same signaling pathway and that BBX24 promoted gibberellin biosynthesis during the SAS. Based on these results, we propose a possible mechanism of action of these BBX proteins in shade avoidance response.

Keywords: Shade avoidance, canopy, B-Box protein, phytochrome, *Arabidopsis*

ÍNDICE

Página

INTRODUCCIÓN

Importancia de la luz para las plantas 1

Los diferentes tipos de fotorreceptores en las plantas 1

- Los fitocromos 2
- Los criptocromos 4
- Las fototropinas 4
- Familia ZEITLUP 5
- Fotorreceptor de UV-B 5

Proceso de des-etiolación 6

- Fisiología de la des-etiolación 6
- Percepción de las señales lumínicas durante la des-etiolación 6
- Componentes moleculares que intervienen en las vías de señalización durante el proceso de des-etiolación 7

Respuestas de escape al sombreado 9

- Fisiología de las respuestas de escape al sombreado 9
- Percepción de la presencia de plantas vecinas 9
- Vías de señalización que promueven la respuesta de escape al sombreado 11
- Regulación hormonal de las respuestas de escape al sombreado 13

Las proteínas B-box intervienen en diversos procesos fisiológicos 15

OBJETIVOS 18

MATERIALES Y MÉTODOS 19

CAPÍTULO I: Rol de BBX21 en la respuesta de escape al sombreado

RESULTADOS CAPÍTULO I

1.1 - Identificación y caracterización fisiológica de líneas mutantes *bbx21* en canopeo simulado _____36

1.2 - Caracterización fisiológica en canopeo natural _____40

1.3 – Otras proteínas de la familia B-Box participan en la respuesta del escape al sombreado _____43

1.4 - BBX21 participa en la modulación temprana de la respuesta al sombreado _____46

1.5 - Interacción genética entre *BBX21* y *COP1* en la respuesta de escape al sombreado _____48

1.6 - Análisis del transcriptoma en plántulas mutantes *bbx21* en ambientes sombreados _____51

DISCUSIÓN CAPÍTULO I

- BBX21 regula negativamente el alargamiento del hipocotilo durante la respuesta de escape al sombreado _____54
- BBX21 modula positivamente la expresión temprana de un grupo de genes promovidos por la sombra _____55
- BBX21 regula negativamente genes que intervienen en la proliferación y crecimiento celular en sombra prolongada _____56
- BBX21 interacciona genéticamente con COP1 en la respuesta de escape al sombreado _____57
- Posible mecanismo de acción de BBX21 en sombra prolongada _____58
- Las proteínas BBX presentan roles antagónicos en la respuesta de escape al sombreado _____62

MATERIAL SUPLEMENTARIO I _____63

CAPÍTULO II: Rol de BBX24 en la respuesta de escape al sombreado

RESULTADOS CAPÍTULO II

2.1 - Caracterización fisiológica de líneas mutantes *bbx24* en la respuesta de escape al sombreado _____70

2.2 -Interacción genética entre BBX24*, BBX25* y *COP1* en la respuesta de escape al sombreado _____72

2.3 - Caracterización molecular de BBX24 en las respuestas tempranas inducidas por la sombra _____73

2.4 - - Análisis del transcriptoma de plántulas mutantes *bbx24* en ambientes sombreados _____ 76

2.5 - Regulación hormonal sobre el crecimiento del hipocotilo en plántulas mutantes *bbx24* _____80

2.6 – Síntesis y percepción a las giberelinas en plántulas mutantes *bbx24* ___81

2.7 – BBX24 regula la expresión de genes que intervienen en la biosíntesis de las giberelinas _____84

2.8 – BBX24 interacciona genéticamente con PIF4 en las respuesta de escape al sombreado _____86

2.9 – Interacción genética entre BBX24 y BBX21 en la regulación del crecimiento del hipocotilo en respuesta a la sombra _____87

DISCUSIÓN CAPÍTULO II

- BBX24 es un regulador positivo de la respuesta de escape al sombreado _____88
- Interacción genética entre BBX24 y COP1 en la respuesta de escape al sombreado _____89
- BBX24 promueve la elongación del hipocotilo en bajas relaciones R:RL a través de las giberelinas _____90
- BBX24 interacciona genéticamente con PIF4 en la regulación de la respuesta de escape al sombreado _____92

- Posible mecanismo de acción de BBX24 en sombra prolongada_____93
- BBX21 y BBX24 modulan el alargamiento del hipocotilo por vías independientes _96

MATERIAL SUPLEMENTARIO II _____97

DISCUSIÓN GENERAL _____111

BIBLIOGRAFÍA _____115

INTRODUCCIÓN

IMPORTANCIA DE LA LUZ PARA LAS PLANTAS

Para un óptimo crecimiento y desarrollo, todos los organismos necesitan percibir y procesar la información que les provee el ambiente que los rodea. En las plantas, numerosos factores ambientales como temperatura, agua, gravedad, luz, entre otros, ejercen una fuerte influencia sobre la morfología afectando el tamaño total de la misma y el número y tamaño de los órganos individuales. La luz es uno de los factores abióticos más importante que modula varios aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, interviniendo en los procesos energéticos (fotosíntesis) y morfogénicos (fotomorfogénesis). Las plantas monitorean la calidad (longitudes de onda), cantidad (irradiancia), duración (fotoperíodo) y la dirección de la luz del ambiente que las rodea. Estas diferencias en el espectro lumínico son percibidas por fotorreceptores específicos, permitiéndole a la planta modular su crecimiento y desarrollo en respuesta a estas señales externas. La germinación, la des-etiolación, la percepción de plantas vecinas, fototropismo, ritmos circadianos y la inducción de la floración son algunas de las respuestas fotomorfogénicas mediadas por los fotorreceptores (Deng y Quail, 1999; Wang y Deng, 2004). Todos estos fenómenos no son producidos en igual medida por todos los tipos de luz (radiaciones de cualquier longitud de onda), sino que algunas longitudes de onda tienen un efecto notable mientras que otras tiene poco o ningún efecto.

LOS DIFERENTES TIPOS DE FOTORRECEPTORES EN LAS PLANTAS

Las plantas pueden monitorear un amplio rango del espectro lumínico, desde la luz UV-B (282-320 nm) hasta el rojo lejano (700-800 nm), a través de familias de fotorreceptores específicos (Figura 1). En la actualidad han sido aislado y caracterizado 5 clases de fotorreceptores en las plantas: los fitocromos, que absorben con máxima eficiencia la luz correspondiente a las longitudes de onda del rojo (R), en los 600-700 nm, y del rojo lejano (RL), en los 700-800nm (Quail, 2002). Los criptocromos, las fototropinas y los miembros de la familia ZEITLUP (ZTL), que absorben la luz correspondiente a las longitudes de onda del

azul y UV- A (320-500 nm) (Cashmor, et al., 1999; Briggs et al., 2001; Demarsy y Fankhauser, 2009) (Figura 1). El UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8), que ha sido recientemente identificado como el fotorreceptor de luz UV-B (282-320 nm)(Kliebenstein et al., 2002; Rizzini et al., 2011).

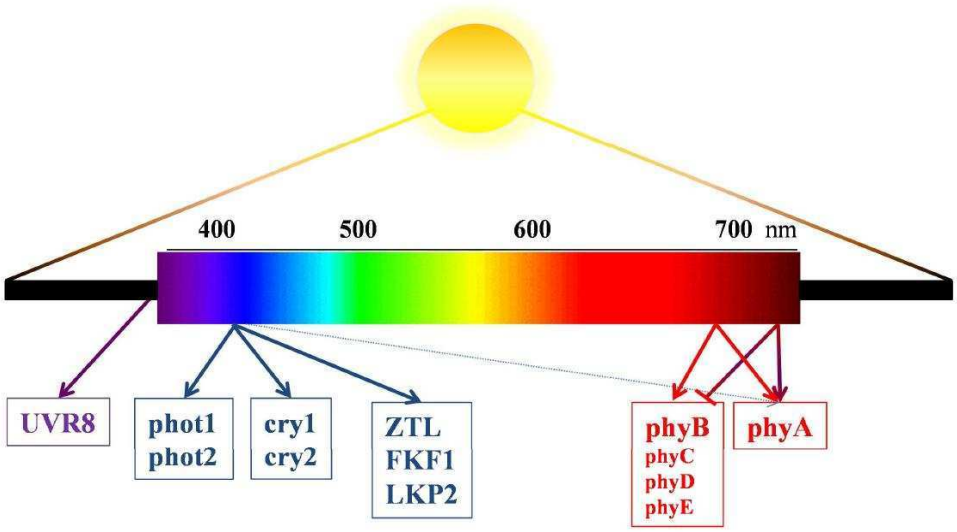


Figura 1. Representación esquemática del espectro lumínico y los fotorreceptores específicos para cada longitud de onda.

-Los fitocromos

Los fitocromos son cromoproteínas homodiméricas conformadas por dos polipéptidos de aproximadamente 125 Kda. Cada monómero posee dos dominios estructurales: el carboxi-terminal que media la dimerización y el amino terminal que está unido covalentemente a un cromóforo tetrapirrólico que es el responsable de la absorción de la luz R o RL que produce su excitación (Quail, 1991). La excitación del cromóforo altera la conformación de la apoproteína y, por ende, su capacidad de acción biológica. En las plántulas en oscuridad, el fitocromo se encuentra totalmente en su forma inactiva Pr; al absorber luz R, el Pr se foto convierte a su forma activa Pfr. Esta foto transformación involucra cambios en los enlaces del cromóforo y múltiples rearreglos conformacionales en la proteína que conducen luego de pasar por varios intermediarios a la conformación

Pfr (Andel et al., 1996). La foto conversión es foto reversible y por lo tanto, al absorber RL, el equilibrio se desplaza convirtiendo la mayor parte del Pfr nuevamente a Pr (Figura 2). Los niveles de Pfr también son afectados por dos reacciones que no dependen de la luz: la destrucción y la reversión a Pr. La destrucción del Pfr ocurre a través de la vía proteolítica, mientras que la reversión ocurre a través de una conversión lenta en oscuridad (Quail, 1997). La reversión del Pfr a Pr es una reacción más rápida que la destrucción pero muy lenta comparada con la foto conversión del Pr a Pfr . A diferencia de la destrucción que implica desaparición del fitocromo, la reversión no provoca cambios en la cantidad total de fitocromo (Pr más Pfr). Dado que los espectros de absorción de las dos formas están parcialmente solapados, al irradiar una planta se establece un fotoequilibrio dinámico entre el Pr y Pfr. La proporción de Pfr respecto al fitocromo total (Pfr/Pr) establecida por cada tratamiento lumínico dependerá de la composición espectral del mismo. La luz monocromática R (660nm) convierte una alta proporción del fitocromo a la forma Pfr, mientras que luz monocromática RL (730nm) establece menos del 5⁄ de Pfr/Pr. Cuando se expone a las plántulas a la radiación solar policromática, el Pfr/Pr estará determinado principalmente por la proporción de R y RL de la luz incidente (Mancinelli, 1994; Quail, 1997). Cuanto mayor sea la relación R/RL de luz incidente, mayor será el Pfr/P.

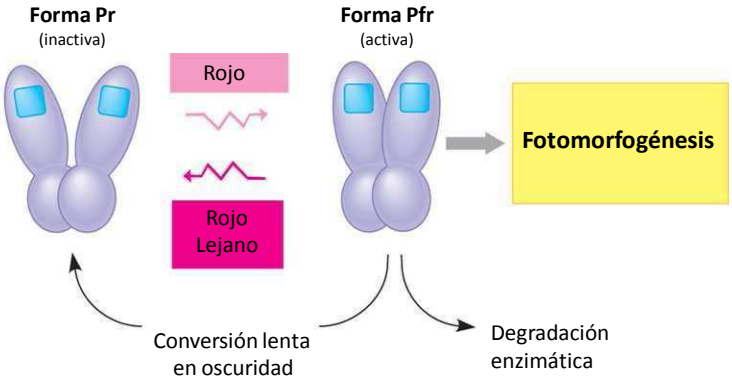


Figura 2. Foto conversión del fitocromo entre la forma inactiva (Pr) y la forma activa (Pfr)

En *Arabidopsis thaliana* se han secuenciado y caracterizado 5 genes que codifican para 5 fitocromos diferentes, phyA, B, C, D y E (Sharrock y Quail, 1989; Clack et al., 1994). Las proteínas codificadas por los genes *PHYB* y *PHYD* comparten un 80% de homología y se encuentran más relacionadas con la de *PHYE* que con las de *PHYA* o *PHYC*. Por este motivo se considera que los genes *PHYB*, *PHYD* y *PHYE* forman un subgrupo distinto dentro de los genes de la familia de fitocromos de *Arabidopsis thaliana* (Goosey et al., 1997). En contraste al resto de los fitocromos cuyos niveles se mantienen relativamente estables, phyA es lábil y su forma Pfr es rápidamente ubiquitinizada y degradada vía el proteosoma 26s en presencia de luz (Clough y Vierstra, 1997; Hennig et al., 1999). phyA y phyB son los fitocromos mejor caracterizados con respecto a su función biológica. Estos controlan procesos como la germinación, el crecimiento del hipocotilo, la orientación gravitrópica del hipocotilo, la expansión y apertura de cotiledones, la apertura del gancho apical, la elongación de la raíz principal, y la floración, entre otros procesos (Quail, 2008; Li, Li, Wang y Deng, 2011).

-Los criptocromos

Estos fotorreceptores de luz azul son flavo proteínas y se encuentran implicados en respuestas como: inhibición de la elongación del hipocotilo, acumulación de antocianinas, elongación del entrenudo y peciolos, germinación, iniciación de la floración, fototropismo y ritmos circadianos (Ahmad y Cashmore, 1996; Ahmad, 1999). En *Arabidopsis thaliana* hay tres genes que codifican para tres criptocromos diferentes: cry1, cry2 y cry3. Estructuralmente, las proteínas cry1 y cry2 difieren principalmente en el extremo C-terminal. Funcionalmente, cry1 cumple su rol principal en alta irradiancia de luz azul, mientras que cry2 es importante a baja irradiancia (Lin et al., 1998). La sensibilidad diferencial de estos dos criptocromos se explica, en parte, por su naturaleza labil; cry1 es estable cuando la planta se desarrolla en altos flujos de luz azul, mientras que cry2 es rápidamente degradado bajo esas condiciones y resulta ser más estables en bajos flujos de luz azul (Ahmad et al., 1998. Lin et al., 1998). También ha sido caracterizada molecular

y bioquímicamente la proteína cry3, pero aun la función fisiológica precisa no está esclarecida como sucede con cry1 y cry2 (Song et al., 2006).

-Las fototropinas

Las fototropinas son fotorreceptores específicos de luz azul y UV-A, involucrados en el fototropismo, el movimiento de los cloroplastos, redireccionamiento de la posición de las hojas hacia la luz, la expansión foliar y la apertura estomática. En *Arabidopsis* existen dos fototropinas, phot1 y phot2, cuyas funciones son parcialmente redundantes (Briggs et al., 2001).

-Familia ZEITLUP

Estos fotorreceptores fueron descriptos recientemente y su función fue asociada a la sincronización del reloj circadiano, y también se los ha vinculado a la inducción de la vía fotoperiódica de la floración. Dentro de esta familia se encuentran ZEITLUPE (ZTL), FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX (FKF), y LOV KELCH REPEAT PROTEIN 2 (LKP2) (Demarsy y Fankhauser, 2009; Baudry et al., 2010).

-Fotoreceptor de UV-B

Durante muchos años se ha propuesto la existencia de un fotoreceptor de luz UV-B denominado RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8), pero su naturaleza molecular como fotoreceptor ha sido descubierta recientemente (Kliebenstein et al., 2002; Rizzini et al., 2011). En *Arabidopsis thaliana*, se ha demostrado que el dímero de la proteína UVR8 funciona como receptor de luz UV-B. Cuando la planta percibe la radiación ultravioleta, este fotorreceptor se monomeriza y las moléculas individuales de UVR8 se translocan al núcleo disparando las respuestas a la luz UV-B (Rizzini et al., 2011).

-PROCESO DE DES-ETIOLACIÓN

-Fisiología de la des-etiolación

Luego de la germinación, las plántulas que se desarrollan en oscuridad crecen a expensas de sus reservas y presentan un fenotipo etiolado: hipocotilos largos, cotiledones cerrados y poco expandidos, maquinaria fotosintética rudimentaria, etc. Una vez que la plántula se encuentra cercana a la superficie, percibe los primeros fotones y se produce un profundo cambio en el desarrollo, teniendo lugar la des-etiolación, que involucra cambios morfológicos como la inhibición del crecimiento del hipocotilo, el desarrollo y expansión de los cotiledones, el desarrollo de la maquinaria fotosintética funcional y la apertura del gancho plumular. El éxito en el establecimiento de una plántula como organismo autotrófico puede depender, entre otras cosas, de las futuras relaciones de competencia entre individuos de la misma especie y entre otras especies (Ballaré y Casal 2000).

-Percepción de las señales lumínicas durante la des-etiolación

La percepción de distintos estímulos ambientales, por parte de los fotorreceptores, desencadena una serie de eventos bioquímicos y moleculares que transmiten la señal. Esta señal conduce, a través de distintos mecanismos, a la activación y/o represión de genes blanco y más tardíamente a cambios morfológicos y/o fisiológicos que le permiten a la planta adaptarse al nuevo ambiente (Quail, 2008; Li et al., 2011). El mecanismo de acción comprende tres niveles básicos: 1) Fotopercepción y fototransducción, 2) Transducción interna de señales, 3) Regulación génica del desarrollo. Tras la regulación génica se producen cambios metabólicos que conducen a la respuesta fisiológica y/o morfológica específica.

En *Arabidopsis thaliana*, muchos de los eventos producidos en la des-etiolación son controlados por la luz Azul, R y RL. Gracias a la caracterización fisiológica y molecular de mutantes, deficientes de uno o más miembros de fotorreceptores, ha sido posible identificar cual es el rol de cada uno de estos en la percepción de la señal lumínica durante la des-etiolación, así como también el grado de interacción entre ellos. El mutante de *phyA* ha sido seleccionado por presentar deficiencias en la inhibición del hipocotilo y la

apertura de los cotiledones bajo luz RL continua. Estos mutantes son insensibles a la diferencia entre RL y la oscuridad pero responden normalmente a la luz blanca (Nagatani et al., 1993; Whitelam et al., 1993; Parks y Quail, 1993). El mutante de *PhyB* presenta un fenotipo con hipocotilo alargado cuando crece en luz R o luz blanca (Nagatani et al., 1991; Reed et al., 1993). Experimentos realizados con mutantes de *phyD, phyE* y *phyC* muestran que estos fotorreceptores tienen funciones sensoriales similares al *phyB* (Devlin et al., 1999; Monte et al., 2003). Los mutantes de *cry1* y *cry2* presentan un hipocotilo alargado bajo luz A continua. Sin embargo, el hipocotilo de plántulas mutante de *cry1* resulta algo más largo que el de *cry2* cuando crecen en altos flujos de luz A, mientras que el rol principal del cry2 media la respuesta en bajos flujos (Lin et al., 1998). Si bien se conocen los roles de los distintos fotorreceptores bajo condiciones lumínicas controladas, es difícil determinar que fotorreceptor o vía de señalización lumínica posee mayor jerarquía bajo los distintos contextos ambientales. La radiación natural activa simultáneamente distintos fotorreceptores y estos activan un gran número de genes que se solapan, indicando la presencia de componentes de señalización compartidos. Es así como la acción de un fotorreceptor puede estar fuertemente afectada por la presencia de otros. Los estudios con ciertas combinaciones de mutantes deficientes de dos o más fotorreceptores, pusieron en evidencia la existencia de una interacción directa entre múltiples vías de señalización de los fotorreceptores. Por ejemplo, el análisis del doble mutante *phyA phyB,* mostró una co-acción entre los dos fotorreceptores en el crecimiento del hipocotilo y cotiledones durante la des-etiolación, así como también en la acumulación de clorofila (Reed et al., 1994; Casal y Boccalandro, 1995).

-Componentes moleculares que intervienen en las vías de señalización durante el proceso de des-etiolación

Numerosos estudios genéticos han permitido establecer una jerarquía entre los factores implicados en la traducción de las señales lumínicas. Estos factores pueden actuar como intermediaros específicos para una vía de señalización particular mediada por un solo fotorreceptor o para más de una vía mediada por más de un fotorreceptor. Por otra parte,

hay mutantes que han resultado ser epistáticos a todos los fotorreceptores, y se postula que estos actúan en las etapas más tardías de la señalización lumínica. Muchos de estos genes han sido descubiertos mediante el estudio de mutantes de *Arabidopsis thaliana* que afectaban positiva o negativamente el alargamiento del hipocotilo, y han sido clasificados en dos grandes grupos:

El primer grupo está conformado por mutantes fotomorfogénicos, los cuales en presencia de luz no manifiestan la inhibición de la elongación del hipocotilo que se observa en el genotipo salvaje (Chory, 1992). Mientras que algunos de estos mutantes muestran un fenotipo etiolado en presencia de un rango amplio de luz, otros actúan regulando positiva o negativamente la respuesta en un rango limitado de luz. Por ejemplo, los mutantes *farred impaired response1* (*far1*) y *far-red elongated hypocotyl3* (*fhy3*) presentan un defecto en el desarrollo del hipocotilo cuando las plántulas creces bajo luz RL (Wang y Deng, 2002). Mutantes como *long hypocotyls in far-red* (*hfr1*) muestran alterado el crecimiento del hipocotilo tanto en RL como en azul, interviniendo en la vía de señalización de phyA y de cry1 (Fairchild et al., 2000; Duek y Frankhauser, 2003). Por otra parte, el mutante *long hypocotyl 5* (*hy5*) presenta características etioladas, produciendo un hipocotilo alargado bajo todas las longitudes de onda. HY5 es un factor de transcripción del tipo cierre de leucina (bZIP) que afecta simultáneamente las respuestas a varias longitudes de onda y estaría ubicado río abajo en la cadena de transducción de varios fotorreceptores (Koornneef et al., 1980; Ulm et al., 2004).

El segundo grupo de mutantes fue identificado mediante una selección de plántulas que presentan alteraciones de su desarrollo en la oscuridad. Los genes identificados codifican para un grupo de proteínas que actúan río abajo de los fotorreceptores como reguladores negativos de la fotomorfogénesis, denominado COP/DET/FUS (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC/DE-ETIOLATED/FUSCA). COP/DET/FUS se encuentra definido por tres entidades bioquímicas: El complejo COP-SPA (SPATULA), el signalosoma COP9 (CSN) y el complejo CDD (COP10 – DNA DAMAGE BINDING 1 - DET1), todos involucrados en la degradación de factores promotores de la fotomorfogénesis vía proteosoma (Saijo et al., 2003; Serino y Deng, 2003; Yanagawa et al., 2004; Yi y Deng, 2005; Zhu et al., 2008). COP1

actúa como una ligasa E3 etiquetando a muchas proteínas promotoras de la fotomorfogénesis, incluyendo a HY5 (Osterlund et al., 2000), HFR1 (Jang et al., 2005; Yang et al., 2005) y los fitocromos (Seo et al., 2004; Jang et al., 2010), las cuales serán posteriormente reconocidas y degradadas por el proteosoma 26s. Adicionalmente, ha sido demostrado que COP1 interactúa con otros factores para regular diferentes aspectos del desarrollo de la planta, como el tiempo de floración y las respuestas de escape al sombreado (Roig-Villanova et al., 2006, Jang et al., 2008).

RESPUESTAS DE ESCAPE AL SOMBREADO

-Fisiología de la respuesta de escape al sombreado

Las plantas perciben la proximidad de las plantas vecinas respondiendo morfológicamente antes de ser sombreadas (Ballaré et al., 1990). Estas señales son transducidas por las plantas evocando un conjunto de respuestas plásticas que constituyen "las respuestas de escape al sombreado" (del inglés, shade avoidance responses), tales como elongación, dominancia apical, aceleración de la floración y consecuentemente la disminución en la producción de semillas y contenido de reservas en las mismas (Smith, 2000). En el estadio de plántula, la sombra promueve el alargamiento del hipocotilo con el objeto de posicionar los cotiledones y primeras hojas verdaderas en una posición alta que reduzca el grado, presente o futuro, de sombreado. Estos cambios morfológicos son disparados por alteraciones en la calidad y/o cantidad de luz del ambiente en el que se desarrolla la plántula.

-Percepción de la presencia de plantas vecinas

La selectiva absorción de la luz solar por los pigmentos fotosintéticos permite que virtualmente toda la luz RL sea reflejada o transmitida por los tejidos de las hojas proveyendo una señal unívoca cuantitativamente asociada a la densidad de plantas vecinas. Un parámetro útil para describir la luz del ambiente natural es la relación entre la irradiancia los fotones en el R sobre la irradiancia de los fotones en el RL (R:RL). Estos cambios en la calidad de luz en la región de R y RL del espectro son detectados por fotorreceptores específicos, los fitocromos (Ballaré et al., 1990; Smith y Whitelam, 1997).

En luz solar la relación R:RL es aproximadamente 1.2, pero cuando las plantas crecen en presencia de plantas vecinas o debajo de un canopeo, esta relación disminuye. Las plantas interpretan, a través de los fotoreceptores, y responden, a través de vías de señalización, a esta reducción de la relación R:RL disparando las respuestas de escape al sombreado.

Los mutantes de *phyB* presentan tallo y peciolo elongados, reducción del área foliar, disminución del contenido de clorofila y floración temprana. Estas respuestas fueron descriptas como "escape al sombreado constitutivo" (Somers et al., 1991; Devlin et al., 1992; Lopez-Juez et al., 1992; Reed et al., 1993). Estos estudios confirmaron el rol del phyB en la percepción y transducción de una señal R:RL baja. Aun así, los mutantes de *phyB* presentaban una respuesta atenuada al escape, lo que hacía presuponer que otros fitocromos podían estar involucrados en esta respuesta. Mutantes deficientes de *phyD* presentan un fenotipo salvaje cuando son sometidos a bajas relaciones R:RL (Aukerman et al., 1997; Devlin et al., 1999). Pero, al comparar el doble mutante *phyB phyD* con el simple mutante *phyB*, se observo que el doble presentaba los peciolos mas alargados y que florecía más temprano (Devlin et al, 1999). Un fenotipo similar se observo al comparar el doble mutante *phyB phyE* con el simple mutante *phyB*. La utilización de múltiples mutantes de fitocromos permitió confirmar que el síndrome de escape al sombreado es regulado exclusivamente por phyB, D y E, actuando conjuntamente de forma redundante (Franklin et al., 2003). Sin embargo, el fenotipo alargado y la floración temprana que presenta el simple mutante *phyB*, no es observado en los simples mutantes de *phyD* ni *phyE*. Esto nos indica que phyB es el regulador principal en la respuesta de escape al sombreado en *Arabidopsis thaliana*. Bajo condiciones de invernáculo que simulan efectos de canopeo, se observó que los mutantes de *phyA* mueren prematuramente durante la des-etiolación (Yanovsky et al., 1995). Esta observación conduce a pensar que en las plantas salvajes, la acción de phyA antagoniza con la de phyB mediando la expansión del hipocotilo en la respuesta de escape al sombreado. Sin embargo, el fenotipo que presenta el doble mutante *phyA phyB* es más largo que el simple mutante *phyB* en bajas relaciones de R:RL (Johnson et al., 1994). Por otra parte, análisis globales de expresión transcripcional en plántulas, durante el proceso de des-etiolación, han puesto en

evidencia que se produce un aumento rápido en los transcriptos que codifican para phyA y phyB, como respuesta de escape al sombreado (Devlin et al., 2003). En las situaciones de canopeo, además de la reducción en relación R:RL, existe una disminución de la cantidad total de luz fotosintéticamente activa (PAR) y consecuentemente una disminución de la luz azul, generando un ambiente que es interpretado por la planta como señal de canopeo denso. Se ha demostrado que la reducción de la luz azul provoca respuestas fenotípicas como la elongación de hipocotilos (Pierik et al., 2004; Sellaro et al., 2010; Keuskamp et al., 2012), elongación de los tallos, elongación de pecíolos y el posicionamiento erecto de las hojas (Pierik et al., 2004; Sasidharan et al., 2008; Keller et al., 2011). Estos resultados indican que una reducción de la luz azul incidente juega un rol importante en las respuestas de escape al sombreado desencadenadas en las plantas que crecen en comunidades densas. Tanto una reducción en la relación R:RL como la disminución de la luz azul del ambiente, disparan diferentes vías de transducción de señales que darán lugar a los cambios fisiológicos que conducirán a los cambios morfológicos característicos de las respuestas de escape al sombreado.

-Vías de señalización que promueve la respuesta de escape al sombreado

Numerosos esfuerzos durante estos últimos años han permitido caracterizar algunos de los genes que codifican para diferentes componentes que participan en vías de señalización que promueven la respuesta de escape al sombreado. Estos participan rio abajo de los fitocromos, como parte de la vía de traducción de señales desencadenada por la baja relación R:RL. En este caso, el fitocromo percibe la baja relación R:RL y modula rápidamente una cascada transcripcional que desencadena la respuesta. Los primeros componentes conocidos que actúan tempranamente en la vía de señalización de phyB son unos miembros de la familia PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR (PIFs), PIF4, PIF5 y PIF7 (Leivar y Quail, 2011; Li et al., 2012). Estos PIFs son factores de transcripción del tipo bHLH (por “basic helix- loop helix”) y promueven la transcripción de genes que codifican para proteínas implicadas en el crecimiento celular. Cuando las plántulas crecen en ambientes con alta relación R:RL, phyB se encuentra en el núcleo predominantemente en

su forma activa pfr e interacciona con PIF4 y PIF5 (Khanna et al., 2004). Como resultado de esta interacción, PIF4 y PIF5 son rápidamente fosforilados para finalmente ser ubiquitinizados y degradados por el proteosoma 26s (Leivar y Quail, 2011), lo que provoca la represión transcripcional de aquellos genes inducidos por sombra. El fenotipo constitutivo que presenta el mutante de *phyB* se revierte parcialmente en ausencia de PIF4 y PIF5 (Lorrain et al., 2008; Shen et al., 2007). Si la plántula se expone a un ambiente con baja relación de R:RL, el fotoequilibrio de phyb se desplaza a la forma inactiva Pr disminuyendo la probabilidad de interacción con PIF4 y PIF5. Esto conduce a la estabilización de estas proteínas en el núcleo, las cuales promueven la expresión de un grupo de genes blancos encargados de modular el patrón de expresión del resto de los genes implicados en las respuestas fotomorfogénicas características del escape al sombreado (Lorrain et al., 2008). Entre estos genes, cuyos niveles de expresión aumentan rápidamente, se han identificado y caracterizado a *PIF3-LIKE 1(PIL1), ATHB2 (HAT4), LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED 1 (HFR1), PHY RAPIDLY REGULATED 1 (PAR 1)* y *PHY RAPIDLY REGULATED 2 (PAR 2)* (Carabelli et al., 1996; Steindler et al., 1999; Salter et al., 2003; Sessa et al., 2005). *ATHB2* codifica para un factor de transcripción que presenta en su estructura un homeodominio asociado a un cierre de leucinas (HD-Zip) y actúa como un regulador positivo de las respuestas de escape al sombreado (Carabelli et al., 1996). HFR1, PIL1, PAR1 y PAR2 son factores de transcripción del tipo bHLH y actúan como reguladores negativos de la respuesta de escape al sombreado (Sessa et al., 2005; Roig-Villanova et al., 2007). Estudios globales de expresión han demostrado que plántulas mutantes *hfr1* tienen alterada la expresión de muchos genes relacionados con hormonas, lo que establece una conexión entre las respuestas a la sombra y las vías de señalización o metabolismo hormonal (Sessa et al., 2005). Esa observación se ve corroborada por la similitud entre los fenotipos de hipocotilo largo de las plántulas que crecen bajo sombra y los fenotipos que son causados por un incremento de los niveles de auxinas, giberelinas, brasinosteroides o etileno.

-Regulación hormonal de las respuestas de escape al sombreado

Las respuestas de escape al sombreado están fuertemente coordinadas por la interacción entre las señales lumínicas y hormonales. Se ha demostrado que las auxinas (AUX), giberelinas (GA), brasinosteroides (BRS) y etileno (ET) promueven la elongación del hipocotilo en aquellas plántulas que se crecen en ambientes con baja relación R:RL (Smalle et al., 1997; Sawa et al., 2002; Devlin et al., 2003; Vandenbussche et al., 2003; Roig-Villanova et al., 2007).

El estudio de plántulas mutantes de *Arabidopsis* alteradas en alguna vía de acción de las AUX, sirvió para demostrar que la elongación del hipocotilo no es correctamente promovida por la sombra si la síntesis, transporte o percepción de la AUX se encuentran afectados. Por ejemplo, El gen *SHADE AVOIDANCE 3/TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1* (*SAV3/TAA1*) cataliza la formación del ácido indol-3-pirúvico a partir de L-triptófano (L -Trp) en la vía de síntesis de la AUX. Se ha demostrado que esta vía induce rápidamente la síntesis de AUX para iniciar los cambios asociados a las respuestas de escape al sombreado (Tao et al., 2008). Por otra parte, PIN FORMED 3 (PIN3) y PIN FORMED 7 (PIN7) son trasportadores transmembranas de auxinas, AUXIN RESISTANT 1 (AXR1) es una enzima activadora de ubiquitina que controla la estabilidad de los transportadores de auxinas, y TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) es un receptor de auxina (Friml et al., 2003; Sieberer et al., 2000; Dharmasiri et al., 2005; Kepinski y Leyser, 2005). Tanto las plántulas mutantes *sav3* como las *pin3, pin7, axr1* y *tir1* presentan disminuida la promoción del crecimiento del hipocotilo en respuesta a bajas relaciones R:RL (Tao et al., 2008; Cole et al., 2010; Keuskamp et al., 2010). Por otro lado, se ha demostrado que un enriquecimiento de luz RL del ambiente puede afectar la expresión de varios genes que intervienen en la vía de señalización de auxinas, como a *IAA19*, *IAA29*, *SAUR15*, *SAUR68* y *GH3.1* (Devlin et al., 2003; Roig-Villanova et al., 2007). Estos genes pertenecen a familias del tipo AUX/IAA (AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID), SAUR (SMALL AUXIN-UP RNA) y GH3, cuyos niveles de expresión también se ven aumentados al adicionar auxina exógena al medio de crecimiento (Devlin et al., 2003; Tao et al., 2008). Todas estas observaciones indican que la promoción del crecimiento del hipocotilo

promovido por la sombra requiere de la correcta síntesis, transporte y percepción de la AUX.

Las GA son hormonas esenciales para las respuestas de escape al sombreado que estimulan tanto la división como la elongación celular (Pierik et al., 2004). Se ha propuesto un mecanismo por el cual las GA regulan el crecimiento del hipocotilo en ambientes sombreados. Este mecanismo es a través de las proteínas DELLA, una familia de proteínas represoras de la elongación del hipocotilo que se encuentran rio abajo de las vías de señalización de las GA (De Lucas et al., 2008). La familia DELLA está compuesta por 5 miembros: GAI (GA-insensitive), RGA (represor of ga1) y RGA-like (RGL1, RGL2 y RGL3) (Fleet y Sun, 2005). En condiciones lumínicas de alta relación R:RL, las proteínas DELLA se acumulan en el núcleo impidiendo la elongación del hipocotilo. En parte, esta inhibición se produce por la interacción entre las DELLA y PIF4, la cual impide que PIF4 pueda unirse a los promotores de sus genes blancos, muchos de los cuales promueven el crecimiento del hipocotilo (De Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). Cuando las plantas se exponen a baja relación R:RL, los niveles de GA activa se incrementan en la plántula y son reconocidas por el transportador GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1), con el cual interacciona e ingresa al núcleo (Nakajima et al., 2006; Griffiths et al., 2006; Sun, 2012). Una vez en el núcleo, GA-GID1 interacciona con las DELLA. La interacción GA-GID1-DELLA es reconocida por el complejo SCF, el cual presenta actividad del tipo E3 ligasa. Este complejo produce la marcación (ubiquitina) de las DELLA que las conducirá a la degradación vía el proteosoma (Fu et al., 2004; De Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Wang y Deng, 2011). La reducción de los niveles de las DELLA en el núcleo permite que PIF4 se libere y active la transcripción de genes de crecimiento (De Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). Parte de la síntesis y/o acción de GA se encuentra afectada por otras hormonas vinculadas al escape al sombreado (AUX, ET y BRS), lo cual altera indirectamente la estabilidad de las proteínas DELLA y la función de los PIFs (Achard et al., 2003; Fu y Harberd, 2003; Gallego-Bartolomé et al., 2012; Bai et al., 2012). Por ese motivo, el mecanismo de regulación DELLA-PIFs podría actuar como un integrador molecular de varias vías de acción hormonal que regulan el crecimiento del hipocotilo promovido por las bajas relaciones R:RL del

ambiente. En esta tesis doctoral, se caracterizará a un grupo de proteínas con dominios del tipo B-box, implicadas en modulación las respuestas de escape al sombreado, presentándose como firmes candidatos que intervienen en el mecanismo de regulación DELLA-PIFs.

LAS PROTEÍNAS B-BOX INTERVIENEN EN DIVERSOS PROCESOS FISIOLÓGICOS

Las proteínas con dominios del tipo B-box han sido encontradas en numerosos organismos multicelulares y algunos unicelulares (Meroni y Diez-Roux, 2005). En animales, estos dominios están asociados a los dominios cierre de leucina (RING finger) y bobina en espiral (Coiled-coil), conformando un tipo de proteínas tripartitas que son denominadas como TRIM/RBCC (Tripartite Motif / Ring, B-box, Coiled-Coil). La familia TRIM/RBCC incluye un gran número de proteínas cuya función ha sido vinculada a diversos procesos celulares como la apoptosis, regulación del ciclo celular y respuestas virales (Meroni y Diez-Roux, 2005). Si bien las plantas carecen de proteínas TRIM/RBCC, presentan proteínas con dominios B-box. Estas proteínas B-box (BBX) se caracterizan por tener uno o dos dominios del tipo B-box en su extremo N-terminal asociado, en algunos casos, a un dominio del tipo CTT (CONSTANS (CO), CO-Like, TOC1) en su extremo C-terminal (Robson et al., 2001; Griffiths et al., 2003). En *Arabidopsis thaliana*, las proteínas BBX son codificadas por 32 genes, los cuales han sido nombrados desde *AtBBX1* hasta AtBBX32 (Khanna et al., 2009). A través de un análisis filogenético se agruparon a estas 32 BBX dentro de 5 grupos estructurales (I-V). Los miembros del grupo estructural I (AtBBX1 hasta AtBBX6) y II (AtBBX7 hasta AtBBX13) se caracterizan por tener dos dominios B-box en tandem asociados a un dominio CTT. Las proteínas BBX que conforman el grupo estructural III (AtBBX14 hasta AtBBX17) presentan un solo dominio B-box y un dominio CTT. El grupo estructural IV está formado por proteínas que solo contienen dos dominios del tipo B-box en tándem (AtBBX18 hasta AtBBX25), mientras que los miembros del grupo estructural V solo tienen un dominio B-box (AtBBX26 hasta AtBBX32) (Khanna et al., 2009). En *Arabidopsis thaliana*, CO/BBX1 (CONSTANS) ha sido la primer proteína con dominio del tipo B-box en ser caracterizada funcionalmente, demostrándose que CO/BBX1 promueve

la floración cuando las plantas crecen en fotoperíodos de día largo (Putterill et al., 1995; Onouchi et al., 2000). Otras proteínas BBX también fueron vinculadas a la regulación de la floración, como COL1/BBX2 (CONSTANS-LIKE1), COL2/BBX3, COL3/AtBBX4 y COL9/AtBBX7 (Putterill et al., 1995; Onouchi et al., 2000; Ledger et al., 2001; Cheng et al., 2005; Datta et al., 2006). Estas proteínas pertenecen al grupo estructural I y II, y se ha demostrado que su función molecular se debe mayormente a la actividad del dominio CTT que se encuentra en su extremo C-terminal (Robson et al., 2001). Las proteínas del grupo estructural IV y V solo presentan dominios del tipo B-box en su estructura, por lo cual resultan particularmente interesantes para poder evaluar la funcionalidad del dominio B-box independientemente al dominio CTT. El primer trabajo que le otorga identidad a las proteínas BBX del grupo estructural IV surgió de un estudio de doble hibrido en levaduras, cuyo fin fue el de identificar reguladores potenciales de las vías de señalización lumínica utilizando a HY5 y COP1 como presas (Holm et al., 2001). Al analizar la secuencia de los candidatos que interaccionaban con HY5 y/o COP1, se observó que algunas de estas proteínas contenían una repetición en tándem de un dominio del tipo B-box su extremo N-terminal. Dentro de este grupo de proteínas se identificó a BBX21, BBX22, BBX24 y BBX25 (Holm et al., 2001). Sin embargo, no fue hasta el año 2003 en el cual Nagaoka et al. (2003) publica por primera vez la función fisiológica para una proteína BBX perteneciente al grupo IV, demostrando que STO/BBX24 (SALT TOLERANT RELATED PROTEIN) confiere tolerancia al estrés salino en *Arabidopsis* (Nagaoka y Takana, 2003). Más tarde se demostró que STO/BBX24 interviene en la regulación de las respuestas fotomorfogénicas y en las respuestas de estrés inducidas por UV-B (Indorf et al., 2007; Jiang et al., 2012). Trabajos posteriores han demostrado que las proteínas de este grupo estructural están reguladas por los ritmos circadianos cumpliendo un rol en la regulación temprana del alargamiento del hipocotilo en respuesta a las señales lumínicas (Kumagai et al., 2008). La caracterización funcional de mutantes de *Arabidopsis thaliana* ha revelado que DBB1b/BBX19 (DOUBLE B-BOX 1b), STH2/BBX21 (SALT TOLERANT HOMOLOG2) y STH3/BBX22 (SALT TOLERANT HOMOLOG2) actúan inhibiendo la elongación del hipocotilo en presencia de luz, mientras que DBB1a/BBX18, STO/BBX24 y STH/BBX25 (SALT

TOLERANT HOMOLOG) promueven esta respuesta fotomorfogénica (Indorf et al., 2007; Datta et al., 2007, 2008; Kumagai et al., 2008; Chang et al., 2008). Estudios más recientes han demostrado que BBX18 interviene en la regulación del hipocotilo en luz azul regulando la homeostasis interna de las giberelinas (Wang et al., 2011), mientras que BZS1/BBX20 (bzr1–1D SUPPRESSOR 1) promueve la fotomorfogénesis actuando río abajo de las vías de señalización de los brasinosteroides y la luz (Fan et al., 2012). En esta tesis, la caracterización funcional de las BBX del grupo IV comenzó en el año 2006, donde aún se desconocía la diversidad funcional existente entre los miembros de este grupo estructural. Los resultados presentados a continuación demuestran que las proteínas BBX pertenecientes al grupo estructural IV participan en la modulación de las respuestas de escape al sombreado.

OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis doctoral es estudiar algunos de los mecanismos de acción involucrados en las respuestas de escape al sombreado. En particular nos enfocaremos en la función de una familia de proteínas que presentan dominios del tipo B-Box (BBX), las cuales hemos identificado como moduladores negativos y positivos de las respuestas de escape al sombreado.

La hipótesis de trabajo es la siguiente: “Las proteínas del tipo BBX, pertenecientes al grupo estructural IV (BBX18-BBX25), intervienen en una de las vías de señalización por bajas relaciones R:RL modulando la expresión de un grupo común de genes”.

MATERIALES y MÉTODOS

MATERIALES UTILIZADOS

. Material Vegetal

Arabidopsis thaliana, es la especie que utilizamos en este proyecto. Su tamaño reducido y su corto ciclo de vida permiten crecer miles de plantas en un espacio físico reducido y los tiempos de crecimiento son compatibles con los recursos de infraestructura disponibles en el instituto. Este punto es crítico dado que la aproximación que proponemos realizar requiere del análisis de muchas plantas. Por otra parte, *Arabidopsis* es la primera especie vegetal para la cual se ha completado la secuenciación del genoma permitiendo utilizar distintas estrategias experimentales para caracterizar los genotipos seleccionados. Los recursos genéticos y moleculares están almacenados en el *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC) (www.Arabidopsis.org) localizado en la Universidad de Ohio (USA), que distribuye los materiales a bajo costo. El ABRC cuenta con colecciones crecientes de miles de mutantes transformados por inserción de T-DNA. Para este estudio se utilizaron:

· Ecotipos silvestres: En este trabajo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia-2 (Col-2), Landsberg erecta (Ler) y Wassilewskija (Ws).

· Población de líneas mutantes utilizadas para la selección (screening): La selección se llevó a cabo sobre una población de semillas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia-2 (Col-2), mutagenizadas al azar por la inserción de un transgen (T-DNA) del vector pSKI15. El T-DNA posee 4 copias en *tandem* del *enhacer* de la transcripción del 35S del virus del mosaico y un casete que confiere resistencia al herbicida Basta. Estas líneas fueron generadas por el Dr. Detlef Weigel, del Max Plant Institute for Developmental Biology.

. Línea mutante por pérdida de función (*bbx21-2*): Línea GT_5_101627 (JIM SM LINE, CS180210), provista por el NASC, generada por la inserción del T-DNA en el tercer exon. Este inserto lleva al gen que confiere resistencia a Kanamicina y ha sido introducido en el genoma de *A.thaliana* con fondo genético Landsberg erecta. Esta línea ha sido generada en el laboratorio del Dr. Jonathan Clarke en el John Innes Center.

· Líneas de sobre-expresión y de ARN de interfenercia (ARNi): En este trabajo se utilizaron líneas transgénicas que sobre-expresan al gen At1g75540 bajo las órdenes del promotor

constitutivo 35s del virus del mosaico, en plantas *A.thaliana* con fondo genético Col y Ler. También se utilizaron líneas de ARN de interferencia dirigidas contra el gen *At1g75540* (la descripción de la construcción se detalla en la metodología).

Semillas donadas por otros laboratorios*: bbx18-2* (Kumagai et al., 2008), *bbx19-1* (Kumagai et al., 2008), *bbx22-1* (Magnus Holm Lab), *bbx24-1* (Indorf et al., 2007), *BBX24ox* (Indorf et al., 2007), *bbx25-2* (Magnus Holm Lab) , *cop1-6* (McNellis et al., 1994), *cop1-4* (McNellis et al., 1994), *bbx24-2* (Magnus Holm Lab), *bbx25-1* (Magnus Holm Lab), *pif4-101* (ABRC) y *hfr1-101* (ABRC).

. Materiales utilizados en los diferentes cultivos bacterianos

- Bacterias utilizadas:

En esta tesis se utilizaron *E.coli* cepa Dh5α quimiocompetentes y *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 electrocompetentes.

- Medios de cultivo de bacterias:

Medio LB – pH 7,5 (autoclavado): triptona 100gr/L, extracto de levadura 5gr/L, NaCl 10gr/L. El pH se ajusto con NaOH. Para lograr una solución sólida se utilizó 10gr/L de agar.

- Suplementos utilizados en los medios de cultivo LB y MS**:**

Los únicos suplementos utilizados para el medio bacteriano LB, han sido antibióticos. Para plántulas se utilizó antibióticos y herbicidas. En la tabla siguiente se muestran los diferentes antibióticos utilizados, las concentraciones de stock y las concentraciones utilizadas para cada trabajo:

Antibiótico -	**Stock de trabajo**	***E.coli***	***A.tumefaciens***	***A. thaliana***
Kanamicina (Km)	50gr/ml	25ug/ml	25ug/ml	15ug/ml
Rifampilina (RF)	50gr/ml	-	100ug/ml	-
Espectinomicina (Sp)	100gr/ml	12.5ug/ml	-	-
Genta (Gn)	50gr/ml	-	50ug/ml	-
BASTA (herbicida)	5.78⁄	-	-	3ul/L

Tabla: Antibióticos utilizados en este trabajo, para seleccionar bacterias *E.coli*, *A.tumefaciens* y también plántulas de *A.thaliana*.

MÉTODOS

Para un mejor entendimiento, la metodología utilizada fue dividida en tres secciones: 1) Metodología utilizada para los ensayos fisiológicos; 2) Metodología y análisis utilizados para los microarreglos; 3) Técnicas de biología molecular y celular utilizadas en este trabajo.

1 - METODOLOGÍA UTILIZADA PARA LOS ENSAYOS FISIOLÓGICOS

· **Experimentos de des-etiolación:**

Para los experimentos de des-etiolación se sembraron aproximadamente 20 semillas de cada mutante junto con el genotipo salvaje como control en cajas transparentes de plástico que contenían un medio 1⁄ agar-agua. Para reducir la dormición las cajas sembradas fueron incubadas en oscuridad a 5°C durante 4 días (estratificación). Para homogeneizar la germinación las cajas fueron expuestas a un pulso de 1 hora de rojo seguido de 24 horas de oscuridad a 22°C (inducción de la germinación). Luego, durante 5 días seguidos las cajas se expusieron a los distintos tratamientos lumínicos o fueron mantenidas en oscuridad como control del crecimiento. El largo del hipocotilo se midió a regla con una precisión de 0.5 mm y se promediaron los valores de las 10 plántulas más altas. Cada tratamiento de luz se hizo por triplicado, el promedio de cada caja fue tomado como una repetición (Fankhauser y Casal, 2004). Este procedimiento se aplicó para medir el largo del hipocotilo bajos los diferentes tratamientos lumínicos detallados a continuación:

· **Selección de nuevos mutantes (Simulación de canopeo natural):**

La selección de nuevos mutantes se realizó en un invernáculo con temperatura controlada (22 ± 2°C) bajo condiciones naturales de fotoperíodo (15hs luz – 9hs oscuridad). Para los experimento se sembraron cada línea (300-350 semillas) junto al genotipo salvaje (Col) en las cajas transparentes. Luego de la estratificación e inducción de la germinación, las cajas fueron colocadas durante 5 días bajo un tratamiento que simulaba un canopeo natural.

Este tratamiento que consistía en poner las cajas bajo 3 filtros de acrílico azul de 2 mm de espesor (Paolini 2031, La Casa del Acetato, Buenos Aires, Argentina), los cuales incrementan la composición relativa de la luz RL y absorben las otras longitudes de ondas. La radiación fotosintéticamente activa (Photosynthetically Active Radiation, PAR) y la relación R:RL fueron medidas utilizando un sensor de luz SKR-1850SS2 conectado al registrador de datos SpectroSense2 (Skye Instruments Ltd, http://www.skyeinstruments.com/) que dio como resultado una PAR=85µmolm^{-2}s^{-1} y una relación R:RL=0.02. Pasados los 5 días bajo estas condiciones, se seleccionaron aquellas plántulas que presentaban un hipocotilo más largo que el control salvaje y que el resto de la población. Aquellos mutantes seleccionados fueron confirmados en la siguiente generación evaluando su fenotipo bajo la misma condición de canopeo natural simulado y bajo luz solar (luz blanca natural) como tratamiento control. En el tratamiento de luz solar se utilizó un filtro neutro por encima de las cajas que reduce la intensidad lumínica sin alterar la calidad de la luz (PAR=400µmolm^{-2}s^{-1} , R:RL=1,2). Adicionalmente, se utilizó un control de oscuridad donde las plántulas crecían durante 5 días en oscuridad constante en el invernáculo. Pasados los 5 días se midieron los hipocotilos de las plántulas que crecían en canopeo natural simulado, en luz solar y en oscuridad.

· Condiciones de canopeo natural:

Las cajas fueron colocadas bajo un sombreado natural logrado por la gramínea (*Lolium repens*, con PAR=40µmolm^{-2}s^{-1} , R:RL=0,1) o bien fueron colocadas a luz solar con un filtro neutro por encima que reduce la intensidad lumínica sin alterar la calidad de la luz (PAR=400µmolm^{-2}s^{-1} , R:RL=1,2). Pasados los 5 días se midió el largo del hipocotilo. Cada tratamiento se hizo por triplicado, el promedio de cada caja fue tomado como una repetición. Este experimento se realizó entre noviembre y febrero en un módulo con temperatura controlada 21±2ºC y fotoperíodo natural de día largo (aproximadamente, 15hs luz – 9hs oscuridad). Los espectros de irradiancia para estas condiciones fueron obtenidos utilizando un equipo Li-Cor integrado a un radiómetro/fotómetro (Li-188B; LiCor Corp., http://www.licor.com)

. Condiciones de canopeo simulado

El canopeo simulado fue llevado a cabo bajo condiciones controladas de laboratorio. Se utilizaron cámaras de crecimiento a una temperatura de 22ºC y con fotoperíodo controlado de día largo (16 hs luz – 8 hs oscuridad). Las cámaras están provistas de lámparas de mercurio suplementadas con lámparas incandescentes, las cuales emiten en las longitudes de onda correspondientes a luz blanca (PAR) y además emiten en el RL (General Electric, http://www.ge.com, HR175/R/DX/FL39 mercurio 33026). Para lograr el canopeo simulado se utilizó 1 filtro acrílico azul + 1 filtro acrílico rojo (Paolini 2031, La Casa del Acetato, Buenos Aires, Argentina), los cuales incrementan por debajo de estos la composición relativa de la luz RL (PAR=35µmolm^{-2}s^{-1} , R:RL=0,05). Plántulas que crecieron en luz blanca dentro de la misma cámara fueron utilizadas como control (PAR=100µmolm^{-2}s^{-1} , R:RL=2,5). Pasados 5 días bajo estas condiciones experimentales se midió la longitud de los hipocotilos.

. **Condiciones de sombra simulada**

El experimento de sombra simulada fue llevado a cabo bajo condiciones controladas de laboratorio, dentro de las cámaras de crecimiento descriptas anteriormente. La sombra simulada se logro colocando lámparas incandescentes laterales. Entre las cajas con las semillas y las lámparas laterales se colocaron 3 filtros azules y 1 filtro rojo que dejaban pasar mayoritariamente luz RL (PAR=100µmolm^{-2}s^{-1} , R:RL=0,35). Estas condiciones simulan la presencia de plantas vecinas sin que se vea afectada la cantidad de PAR que llega verticalmente desde arriba. Entre los filtros y las lámparas se colocaron frascos de vidrio con agua para disipar la temperatura generada por las luces incandescentes. De esta forma las plántulas censan la presencia de una planta vecina sin que existan cambios en la temperatura al compararlas con el control que crece en luz blanca. Como control, las plántulas crecieron en la misma cámara sin suplemento de luz RL de costado (PAR=100µmolm^{-2}s^{-1} , R:RL=2,5).

. **Tratamientos con Hormonas:**

Se sembraron 20 semillas de cada genotipo, para cada réplica, en cajas transparentes que contenían un medio de crecimiento sin suplemento (1 ⁄ agar-agua) o con suplemento de una hormona o un inhibidor (1⁄ agar-agua –hormona/inhibidor). La concentración a utilizar para cada hormona e inhibidor fueron obtenidas mediante una curva de calibración realizada previamente con el genotipo salvaje Col. Luego de la estratificación y la inducción de la germinación, las cajas fueron transferidas a los tratamientos correspondientes de luz blanca o de canopeo simulado, realizados bajo condiciones controladas de laboratorio. Las plantas crecieron en cada tratamiento durante 5 días, luego del cual se les medió el hipocotilo. Las hormonas sintéticas utilizadas fueron picloram (Sigma-Aldrich), Epibrassinolide (Sigma-Aldrich), GA3 (Sigma-Aldrich), ACC (Sigma-Aldrich). Los inhibidores utilizados fueron: el inhibidor de la síntesis de giberelinas, Paclobutrazol (Sigma-Aldrich) y el inhibidor del transporte polar de auxina, el ácido N-1-naphthylphthalamic (NPA) (Sigma-Aldrich).

2- METODOLOGÍA Y ANÁLISIS UTILIZADOS EN LOS MICROARREGLOS

. Metodología y diseño de lo microarreglos de expresión:

La semillas de los distintos genotipos fueron esterilizadas superficialmente y sembradas en placas de Petri que contenían medio agua- agar 1.5⁄ . Luego de la estratificación y la inducción de la germinación, las placas fueron expuestas al tratamiento lumínico correspondiente durante 5 días. Cada caja de Petri (réplica biológica) contenía entre 100-150 plántulas. Se utilizaron dos replicas biológicas para cada genotipo y tratamiento. Luego las plántulas de cada caja fueron cosechadas y fue extraído su ARN utilizando el RNeasy Miniprep kit (Quiagen). 5 µg de ARN correspondiente a cada muestra de genotipo salvaje o mutante, fue procesado e hibridado contra los microarreglos de expresión (Affymetrix: *GeneChip Arabidopsis ATH1 Genome Arrays*), según las instrucciones provistas por el fabricante.

. Análisis de los microarreglos:

Fue posible comparar la señal de los microarreglos, después de normalizarla al promedio de la intensidad de la señal general de todas las sondas. Fueron eliminados todos aquellos genes que presentaban ausencia de señal para todos los tratamientos y genotipos. Una vez normalizados los datos de expresión y filtrados por ausencia, se utilizo el programa SAM (Significance Analysis of Microarrays) para realizar el análisis estadístico (http://www-stat.stanford.edu/~tibs/*SAM*/) (Tusher et al., 2001). Este análisis estadístico nos permitió seleccionar aquellos genes cuya expresión cambia significativamente entre tratamiento y genotipo, asociada a un valor de $q<0,05$.

Para la clasificación funcional de un grupo de genes se utilizó la herramienta Classification Superviewer (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_classification_superviewer.cgi) (Provart y Zhu, 2003). Esta herramienta provee el valor absoluto de genes pertenecientes a cada categoría funcional, así como también la relación existente entre ese valor y el total de genes de todo el genoma pertenecientes a esa categoría. De esta forma se obtiene un enriquecimiento, asociado a un valor estadístico, para las diferentes categorías funcionales (Provart y Zhu, 2003).

Para la agrupación de los genes por patrones similares de expresión se utilizó el programa DNA-Chip Analyzer (dChip) (Li y Wong, 2001).

3- TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR UTILIZADAS

· Obtención de ADN genómico de plantas.

Se utilizó tejido foliar joven de *Arabidopsis thaliana*, al cual se le realizó el siguiente procedimiento de extracción de ADN:

1. Pulverizar con nitrógeno líquido tejido foliar joven recién cortado.
2. En un tubo eppendorf de 1,5 ml colocar material vegetal pulverizado hasta la marca de 500 µl y resuspender con 750 µl de buffer CTAB (2X), (2⁄ de CTAB, 100 mM de tris base pH 8,0, 10 mM de EDTA y 0,7 M de NAC1 agregar agua hasta 500 ml y autoclavar).

Adicionar 30 µl de 2-β mercaptoetanol. Agitar suavemente e incubar por 30 minutos a 65 ºC.

3. Agregar 300 µl de acetato de potasio (3 M, pH 4,8), mezclar suavemente e incubar en hielo por 15 min. Centrifugar 10 min a 14 000 rpm y transferir el sobrenadante a otro tubo.

4. Adicionar 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclar suavemente por inversión del tubo y centrifugar 10 min a 14 000 rpm.

5. Cuidadosamente pipetear la fase superior en tubo con 500 µl de Isopropanol frío para precipitar el ADN. Incubar en hielo durante 60 min.

6. Centrifugar en 5 min a 14 000 rpm y descartar el sobrenadante.

7. Lavar el pellet de ADN dos veces con 500 µl de Etanol al 70⁄ frío. Descartar el Etanol y permitir que el ADN se seque al aire libre por 30 min.

8. Resuspender el ADN en 30 a 50 µl de H2Omq. Amplificación de DNA (PCR): Para poder amplificar los fragmentos de ADN, se utilizó el método de la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR (Polimerase Chain Reaction), descripta en el manual de biología molecular (Sambrook, 2001). Para amplificar los fragmentos por PCR se utilizó la enzima ADN polimerasa termoestable (*TAQ DNA Polymerase* de Invitrogen) y primers que hibridan específicamente con los fragmentos a amplificar.

· **Técnica de clonado (TAIL):**

La secuencia flanqueante de la inserción de T-DNA del mutante fue identificada siguiendo el protocolo de TAIL – PCR (del inglés *thermal asimetric interlaced*- PCR) descrito por Liu y colaboradores (1995). Se utilizó el primer AD1 (5'-NGTCGASWGANAWGAA-3') en combinación con el primer LB1 (5'- GTCCGAGGGCAAAGAAATAGAGTA-3'), LB2 (5'- CATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCT-3'), o LB3 (5'- GCTGGTGAAGTCTACTGACA -3'). Los productos amplificados fueron separados electroforéticamente en gel de agarosa al 1⁄ con TBE 0.5X, teñidos con EtBr. El fragmento de ADN que se encontraba en el gel de agarosa, fue purificado utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* de Quiagen, siguiendo las indicaciones del fabricante.

. Genotipeado del mutante *bbx21-101*:

La inserción en *el mutante lhus/bbx21-101* fue confirmada por PCR utilizando el par de *primers* específicos Rev172 (5'-TAATAACGCTGCGGACATCTAC-3') y For172 (5'-CAACATCTGGAGAGCTAGTG-3'), la ausencia de la inserción en las plantas del genotipo salvaje fue confirmada también por PCR utilizando el *primer* For172 junto con el LB3 (5'-GCTGGTGAAGTCTACTGACA-3'). Analizando una población segregante F2, producto de la cruza entre el mutante y el genotipo salvaje, se observó la co-segregación entre la presencia del T-DNA y el fenotipo mutante. El programa para las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial de 95°C por 4 min, seguido de 95°C por 30 seg (desnaturalización), 56°C por 1 min (alineamiento), 72°C por 1:30 min (extensión). Se realizaron 30 ciclos. Los productos amplificados fueron separados electroforéticamente en gel de agarosa al 1⁄ con TBE 0.5X, teñidos con EtBr y fotodocumentados.

· **Genotipeado del mutante *bbx21-2* provisto por el ABRC:**

Para genotipiar el mutante *bbx21-2* se realizaron dos reacciones de PCR por separado, una para el alelo con la inserción de T-DNA y otra para el alelo salvaje. *bbx21-2* tiene una inserción en el tercer exón del gen At1g75540, para detectar el T-DNA se utilizaron los primers: Ds5-1 (5´-ACCCGACCGGATCGTATCGGT-3´) y KO-LerRP (5´-TCAAACAATCGAATGGAATGC -3´) y para amplificar el alelo salvaje se utilizó el primer KO-ForRP junto con el KO-LerLP (5´-GGAATCGAGGAAATCCTCAAC – 3´). El programa para las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial de 95°C por 4 min, seguido de 95°C por 30 seg (desnaturalización), 54°C por 1 min (alineamiento), 72°C por 1:30 min (extensión). Se realizaron 30 ciclos. Los productos amplificados fueron separados electroforéticamente en gel de agarosa al 1⁄ con TBE 0.5X, teñidos con EtBr y fotodocumentados.

. Extracción de ARN total de plantas

El aislamiento de ARN a partir de plantas de Arabidopsis se llevó a cabo por medio del kit de extracción de RNA QiaGen, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. El

material vegetal utilizado para la extracción fue el tercer par de hojas de plantas crecidas en luz blanca continua durante 20 días.

· Cuantificación de ADN y ARN

La concentración de ADN se evaluó en geles de agarosa al 1⁄ por comparación con marcadores estándar de ADN de λ no digerido, visualizados con Bromuro de Etídio bajo luz UV. La cuantificación de la cantidad de ARN obtenido, se hizo por espectrofotometría, dado que los ácidos nucleicos presentan absorción a 260 nm y las proteínas a 280 nm. Para la medición se utilizó 1ul del ARN en 99ul de H2Omq. Para el ARN de *Arabidopsis thaliana* la relación de absorbancias a 260 y 280 nm que determina la pureza es de 2. Esta relación se utilizó como parámetro que permitió evaluar parcialmente la calidad del ARN total extraído mediante la siguiente fórmula: Abs260 X 50ug/mL X factor de dilución= ug/mL de ARN.

. Obtención de cDNA a partir del ARN extraido (técnica de qRT-PCR):

Esta técnica se utilizó para amplificar la primera cadena de cDNAs específica a partir de ARN total siguiendo el protocolo: Para evitar la posible interferencia del ADN contaminante en el ARN obtenido de las muestras, se trataron éstas con DNasa I siguiendo el protocolo descrito a continuación. Mezclamos 50 µg de RNA total con 1µL de inhibidor de nucleasas de RNA (1U/ µL),1 µL de DNasa I y completamos hasta un volumen final de reacción con tampón de DNasa 10X. Incubamos la reacción durante 30 min. a 37°C. Esta muestra fue utilizada para la síntesis de cDNA. Primero se sintetizó cDNA de cadena simple a partir de RNA total de las distintas muestras. Para ello se utilizó la enzima transcriptasa inversa que sintetiza el nuevo cDNA en los sitios determinados según el tipo de cebador utilizado. Mezclamos 200ng de ARN total con 2 µL del apropiado cebador oligo-dT e incubamos a 65°C durante 5 min. Inmediatamente enfriamos a 4°C. Añadimos a cada tubo de transcripción inversa 16µL conteniendo 4 µL de buffer 5X, 1µL de la mezcla de dNTPs 250 µM de cada uno (1:1:1:1), 2 µL de DTT 100 mM, 1 µL de inhibidor de nucleasas de ARN (20 U/ µL), 0.2 µL de transcriptasa inversa (SuperScript IIRT) (200 U/ µL)

y H2Omq hasta un volumen final de 20 µL. Las muestras se colocaron en un termociclador con el siguiente protocolo de temperaturas: 10 min a 25°C, 1 h a 42°C, 15 min a 70°C. Las muestras pueden ser utilizadas inmediatamente o ser almacenadas a -20C hasta su uso. Se realizó la síntesis de cDNA por duplicado para cada muestra.

. Análisis de la expresión por PCR en tiempo real (qPCR)

Para el estudio de la expresión génica en *A. thaliana* mediante qPCR, el material biológico utilizado proviene de plántulas de 5 días crecidas en el tratamiento lumínico que se indica en cada caso. Con el fin de estudiar la expresión génica, el primer paso es purificar el ARN utilizando RNeasy Miniprep kit (Quiagen) y posteriormente realizar la retrotranscripción para obtener el cDNA (Ver protocolo de RT-PCR). La expresión de distintos genes fue medida, por PCR en tiempo real, la cual es una técnica semi-cuantitativa (del inglés: *quantitative* PCR; qPCR) y muy sensible. Para llevarla a cabo el cADN sintetizado previamente, fue amplificado utilizando SYBR Green Master (Roche) y el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Los genes *ACT8* (*ACTIN8*) y *IPP2* (*ATISOPENTENYL DIPHOSPHE ISOMERASE 2*) fueron empleados como control en la especie *A. thaliana*, para relativizar la expresión e independizarse de diferencias en la eficiencia de la reacción de retro-transcripción. El cálculo de la expresión se realizó utilizando una curva patrón. La lista de primers utilizada fue la siguiente:

Primer qRT-PCR	Sense	Antisense
IPP2	ATGGTTCAGATTGGTGGTGGAC	AAAGATGTTCAGAGTTTGTGGATGG
BBX18	AGTCTCTCCATCTTCCGCTTCAAC	GCATCTTTCGCCAAACCCAAATTC
BBX19	AAGATGCGGATTTTGTGCGATGC	AAGATGATTGCGGCTGCGTTC
BBX21	CGACATCTGTCAGGATAAA	GTTCGCAGCGTGGATCGAT
BBX22	TTGTGAGGCGGCGGAAGC	GTATGGAAGAGGCAGAGGCAGAG
BBX24	AAGCCAGCAGCAACAACAACC	GAGAAGTGAAAGAAATCGTCAACAGC
BBX25	GGCTCATGCTCATTCCTACAACAG	AGTGCTCTTCTTCATCATCATACCG
HFR1	TGCCATCGCCGCTAATTCCG	ACCAAACCGTGAAGAGACTGAGG
PAR1	TCATGCTCAGCCACCGTGAAATC	CCTTGACCTCATCTTCTTCTTCTTC
PIL1	GTGTTTCTCAGACTCAGGCTACTTC	CGGACGCAGACTTTGGGAATTG
ATHB2	TGAGCCCACCCACTACTTTGAC	AGGAGCCCACGCATTGACC

. Construcción de plantas transgénicas:

La construcción de las líneas sobreexpresantes *BBX21ox* fueron generadas a través de la amplificación por PCR del locus *At1g75540* con primers que contienen los sitios de recombinación Attb, estos primers son: GatFor_172 (5'-GGGG ACA AGT TTG TACAAAAAA GCA GGCTCCATGAAGATCA GGTGCGA -3') que aparea desde el codón de inicio de la transcripción ATG y GatRev_172 (5'-GGGG AC CAC TTT GTACAA GAA AGC TGG GTCTTACCAGAAAGATCTAAA-3). El fragmento de PCR generado fue introducido al vector pDonor (pDon221) mediante la reacción de recombinación I Gateway (Invitrogen), denominada reacción BP (Ver protocolo de reacción BP). De esta incubación resultó una recombinación específica generando un nuevo vector, llamado Entry Clone, que contiene al gen *At1g75540*. Se transformaron bacterias de *E.coli*, Dh5α quimiocompetentes, con el vector Entry Clone para amplificarlo (Ver protocolo de transformación *E.coli*). Las colonias fueron seleccionadas en un medio con el antibiótico Espectinomicina, donde solo sobrevivieron aquellas colonias que contenían el plásmido con el gen at1g75540 correctamente insertado. Se seleccionaron unas colonias y se analizó la presencia del gen mediante una Colony PCR utilizando primers que hibridan con los extremos del vector (Ver protocolo de colony PCR). Una de las colonias que resulto ser positiva, fue cultivada en medio LB fresco con antibiótico Espectinomicina, con el fin de generar masa del plásmido. Se purificó el DNA plasmídico mediante una minipreparación (Kit MiniPrep-QiaGen). El plásmido purificado fue utilizado para la reacción de recombinación II, denominada reacción LP (ver abajo protocolo de reacción BP), donde ahora el locus *At1g5540* es transferido al vector de expresión pK2GW7 que contiene el promotor constitutivo del 35s. Se transformaron bacterias de *E.coli*, Dh5α quimiocompetentes, con el vector de sobreexpresión para amplificarlo. Las colonias fueron seleccionadas en un medio con el antibiótico Kanamicina, donde solo sobrevivieron aquellas colonias que contenían el plásmido con el gen *At1g75540* correctamente insertado. Se seleccionaron unas colonias y se analizó la presencia del gen mediante una colony PCR utilizando los primers GatFor_172 (5'--3') y GatRev_172. Se envió a secuenciar tres colonias y se comparó la secuencia de estas con la publicada en la base de datos del *Arabidopsis*

Biological Resource Center. Nos quedamos con aquella colonia que no presentaba mutación en la secuencia nucleotídica. Esta colonia fue cultivada en medio LB fresco con antibiótico Kanamicina, con el fin de generar masa del plásmido. Se purificó el ADN plasmídico mediante una minipreparación (Kit Miniprep QiaGen). El ADN plasmídico resultante fue introducido en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 mediante electroporación (Ver protocolo de transformación *Agrobacterium* más debajo). Las bacterias que incorporaron el plásmido con el locus *At1g75540*, fueron seleccionadas en medio LB sólido con los antibióticos Kanamicina, Espectinomicina y Rifampilina (en las concentraciones descriptas en materiales). Se tomó una de las colonias que resultaron positivas durante selección para cultivarla en medio LB líquido con los antibóticos Kanamicina, Espectinomicina y Rifampilina. Este cultivo se utilizó para transformar plantas de *A.thaliana* con fondo genético Ler y Col, mediante la técnica de Floral Dip (Ver protocolo Floral Dip más abajo). Una vez las plantas transformadas se fue seleccionando y evaluando hasta obtener las líneas estables transformadas.

Las líneas de ARN de interferencia (RNAi:BBX21) fueron construidas utilizando la técnica Gateway como se detalló anteriormente. En este caso, fue insertado dentro del primer vector (pDon221) una región correspondiente al sitio 5´UTR del locus *At1g75540*, la cual fue clonada utilizando primers específicos (RNAi172for: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACAAGATAGAGCTATTTT; RNAi172rev: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGCTTGTGGATCCCCACT). Para la segunda recombinación fue utilizado el vector pK7GWIW62(I). Las plántulas fueron seleccionadas con el antibiótico kanamicina y para los estudios fisiológicos se utilizaron dos líneas independientes de la F4.

<u>Reacción BP (recombinación I):</u>

- Se agregaron los siguientes componentes en un tubo de 1.5 ml a temperatura ambiente y se mezclaron: Producto de PCR con los sitios attB del gen *At1g75540* (=10 ng/µl; 50 ng) 3 µl + Vector donor, pDon221 (100 ng/µl) 2 µl + TE buffer, pH 8.0, 3ul.

- La enzima BP Clonase™ II fue mezclada en vortex durante 2 segundos dos veces y luego se agregó 2ul de la BP Clonase™ II al mix armado en el tubo de 1,5ml. Vortexear 5 segundos.
- La reacción fue incubada a 25° durante 8 horas.
- Adicionar 1ul de proteinasa K para terminar la reacción. Vortexear rápidamente. Incubar la muestra a 37° durante 10 minutos.

Reacción LP (recombinación II):

- Se agregaron los siguientes componentes en un tubo de 1.5 ml a temperatura ambiente y se mezclaron: Entry clone (50-150 ng) 1-7 µl + vector destino (100 ng/µl) 1 µl + TE buffer, pH 8.0, 3 µl
- La enzima LP Clonase™ II fue mezclada en vortex durante 2 segundos dos veces y luego se agregó 2ul de la LP Clonase™ II al mix armado en el tubo de 1,5ml. Vortexear 5 segundos.
- La reacción fue incubada a 25° durante 8 horas.
- Adicionar 1ul de proteinasa K para terminar la reacción. Vortexear rápidamente. Incubar la muestra a 37° durante 10 minutos.

. Transformación de células competentes de *E.coli* por Shock térmico:

La transformación de *E.coli* fue utilizada para amplificar ADN plasmídico. Se utilizaron bacterias quimiocompetentes para ser transformadas por medio del siguiente protocolo:

1- Descongelar el tubo, en hielo, que contiene una alícuota de bacterias quimiocompetentes.
2- Transferir 1-5ul (10-20ngr) del ADN plasmídico que se quiere transferir.
3- Mantener 30 min en hielo.
4- Aplicar un shock térmico de 45seg a 42°C.
5- Transferir el tubo al hielo por 5 minutos.

6- Agregar 250ul de medio LB fresco sin antibióticos. Dejar el tubo en agitación a 250 rpm a 37°C por 1 hora.

7- Plaquear diferentes volúmenes del tubo de transformación en placas de LB sólido que contiene el antibiótico de selección adecuado.

8- Incubar las bacterias a 37°C toda la noche.

9- Las colonias son seleccionadas utilizando PCR, con primers específicos y con minipreparaciones.

. Colony PCR:

Esta técnica se utilizó para obtener ADN plasmídico de una manera rápida y sencilla, para realizar luego un PCR que confirma la presencia del locus transferido al vector. Los pasos son los siguientes:

1- Con la punta de un tip tomar parte de una colonia. Ponerla dentro de un tubo de 1,5ml con 50ul de H_2O a 100°C por 10 minutos

2- Centrifugar 1 minuto a 13000rpm.

3- Tomar 2ul del sobrenadante para realizar la PCR. Este contiene DNA plasmídico.

4- Se utilizan primers que hibridan específicamente con el inserto que queremos constatar que se encuentra en el plásmido. En este caso se utilizaron primers que hibridan con los dos extremos del gen At1g75540. La presencia de banda indica que esa colonia presenta el inserto, resultando de esa manera colonias positivas.

.Transformación de bacterias competentes de Agrobacterium tumefaciens por electroporación:

Esta transformación se utiliza para transferir el ADN plasmídico a células de *Agrobacterium tumefaciens*, con el fin de aumentar la cantidad de plásmido para luego ser transferido a la planta medante la técnica de transformación floral dip. Las bacterias competentes de *Agrobacterium* fueron transformadas según el siguiente procedimiento:

1- Descongelar en hielo una alícuota (50ul) de células competentes y transferir 1-2ul del ADN (el ADN debe estar disuelto en una solución de baja fuerza iónica, como por ejemplo TE o H2O). Mezclar cuidadosamente con pipeta e incubar en hielo por 5 minutos.

2- Poner las cubetas de electroporación en hielo, previamente esterilizadas, y transferir las células competentes junto al ADN.

3- Electroporar a 1,5KV. Inmediatamente, transferir las bacterias a un tubo que contiene LB líquido fresco.

4- Incubar las bacterias a 28°C durante 2hs para que se recuperen de la electroporación.

5- Plaquear diferentes volúmenes en placas LB sólido que contiene los antibióticos de selección adecuados.

6- Incubar a 28°C durante 2-3 días hasta ver la aparición de las colonias.

7- Comprobar que las colonias portan el plásmido con el fragmento de interés mediante PCR, utilizando primers específicos.

. Cultivo de Agrobacterium tumefaciens portador de la construcción que será introducido en la planta:

- Se tomó una muestra de las colonias de *Agrobacterium* que resultó ser resistente al medio MS con Genta, Rifa y Kanamicina.

- Con esta muestra se formó un pre-cultivo de 2ml de medio LB con los antibióticos correspondientes (Genta, Rifa, Kanamicina). Se incubó toda la noche a 28°C en agitación constante de 250rpm.

- Todo el pre-cultivo fue utilizado para inocular un nuevo cultivo de 250 ml de LB con los mismos antibióticos. Se incubó toda la noche a 28°C en agitación constante de 250rpm.

- Se centrifugó el cultivo durante 10min a 6000rpm. Se descartó el sobrenadante y las bacterias fueron resuspendidas en una solución de 250ml de H2O con sacarosa (5⁄ p/v) y silwet (0.02⁄ v/v). Este cultivo es utilizado para la transformación de las plantas de *Arabidopsis*.

. Transformación de *Arabidopsis thaliana* con *Agrobacterium* (Técnica Floral Dip):

- Para la transformación se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* con los fondos genéticos Col y Ler, las cuales fueron transformadas según la técnica de floral dip (Clough

y Bent, 1998). Se transformaron aquellas plantas que presentaban una inflorescencia de 6 cm aproximadamente.

- Se volcó el cultivo de *Agrobacterium* en un recipiente plástico adecuado y se sumergieron las inflorescencias durante 45segundos.
- Las plantas transformadas fueron colocadas en posición horizontal dentro de bandejas plásticas. Estas bandejas fueron recubiertas con un film transparente. Se colocaron en cámara a 24° con fotoperiodo de día largo durante 2 días.
- Se retiró el cobertor plástico y se colocó a las plantas en posición vertical. Estas siguieron creciendo en las mismas condiciones de cámara.
- Se cosecharon las semillas de las plantas transformadas (generación T1).
- Pasadas dos semanas las semillas fueron esterilizadas y sembradas en cajas que contenían medio MS con el antibiótico Kanamicina. Estas cajas estuvieron durante 5 días a 5°C y luego fueron trasferidas a una cámara de luz blanca continua durante 10 días.
- Fueron seleccionadas las plantas resistentes y se transfirieron a un recipiente individual para seguir cultivándolas en la cámara. Al semillar se cosecharon las semillas de estas plantas (generación T2).
- Las semillas de la generación T2 fueron sembradas en cajas con medio MS y kanamcina. Estas cajas estuvieron durante 5 días a 5°C y luego fueron trasferidas a una cámara de luz blanca continua durante 10 días.
- Se evaluó la segregación de las plantas resistentes/susceptibles y se seleccionaron aquellas que resultaron resistentes. Estas se cultivaron en cámara hasta semillar. Se recolectaron las semillas de esta nueva generación, llamada generación T3, y se evaluó la segregación nuevamente en medio MS Kanamicina hasta encontrar aquella que resultó ser 100 ⁄ resistente. Esta líneas 100⁄ resistentes son homocigotas para la inserción y fueron las utilizadas en este trabajo.

CAPÍTULO I

ROL DE BBX21 EN LAS RESPUESTAS DE ESCAPE AL SOMBREADO

1. RESULTADOS I

1.1 - Identificación y caracterización fisiológica de *BBX21* en canopeo simulado

El objetivo inicial de esta tesis doctoral fue la identificación y caracterización de nuevos componentes moleculares que intervienen en la vía de señalización que promueven las respuestas de escape al sombreado. Para cumplir con este objetivo, fueron seleccionadas plántulas mutantes que presentan alterado el crecimiento del hipocotilo bajo condiciones de simulan un canopeo natural. La búsqueda se llevo a cabo analizando una población mutante de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (65.000 líneas independientes) generadas en el fondo genético Columbia (Col), en cuyo genoma se encuentra inserto un fragmento de ADN exógeno al azar (T-DNA). De esta población mutante, se seleccionaron aquellas plántulas que presentaban un hipocotilo más alto que el genotipo salvaje (Col) cuando crecen bajo condiciones de canopeo simulado. De esta búsqueda resultó seleccionado un mutante llamado inicialmente *lhus* (*long hypocotyl under shade*), que presentó alterado el crecimiento del hipocotilo bajo canopeo simulado (baja relación R:RL) pero no así en luz solar (alta relación R:RL) (Figura 1a). Para identificar al gen afectado en el mutante *lhus,* se utilizo la técnica de clonado TAIL-PCR (Liu et al., 1995) comprobando que el T-DNA se insertó en la región 5'UTR del gen *At1g75540*, a 120pb del sitio de iniciación de la traducción ATG (Figura 1a). Una vez identificado el lugar de inserción del T-DNA, se determinó que el mismo era el responsable del fenotipo observado debido a la existencia de co-segregación inserto-fenotipo. El gen *At1g75540* codifica para una proteína que contiene dos dominios del tipo B-box en tandem en su extremo N-terminal. En *Arabidopsis thaliana* se identificaron 32 proteínas que contienen dominios del tipo B-box, las cuales fueron clasificadas desde BBX1 hasta BBX32 (Khanna et al., 2009). La proteína codificada por el gen *At1G75540* forma parte de esta familia y se clasificó como BBX21 (Khanna et al., 2009). De aquí en más, por una cuestión de nomenclatura y denominación alélica, el mutante *lhus* será llamado *bbx21-101*. Mediante RT-PCR semicuantitativa se

comprobó que la expresión de *BBX21* se encuentra disminuida en las plántulas mutantes *bbx21-101* con respecto a las plántulas salvajes (Figura 1a). Para confirmar si el fenotipo observado en las plántulas *bbx21-101* es debido a la disminución del transcripto *BBX21*, se adquirió un nuevo alelo mutante denominado *bbx21-2*. Las plantas *bbx21-2* tienen inserto un T-DNA en el tercer exón del gen *BBX21* causando la pérdida de expresión del mismo (Figura 1b). A diferencia del mutante *bbx21-101*, el alelo mutante *bbx21-2* se encuentra sobre el fondo genético *Landsberg erecta* (Ler). Al caracterizar el alargamiento del hipocotilo se observó que las plántulas *bbx21-2* tienen hipocotilos significativamente más largos que las plántulas del genotipo salvaje (Ler) en canopeo simulado, pero no presentan diferencias significativas cuando crecen en luz solar (Figura 1b). Las plántulas *bbx21-101* y *bbx21-2* que crecieron durante 5 días en oscuridad continua no presentaron diferencias significativas en la elongación del hipocotilo comparados con sus respectivos controles, Col y Ler (Figura S1-I). Esto indica que la alteración del crecimiento del hipocotilo en los mutantes *bbx21* se debe a una respuesta fotomorfogénica producida por los cambios en la calidad y/o cantidad de luz asociados al canopeo simulado.

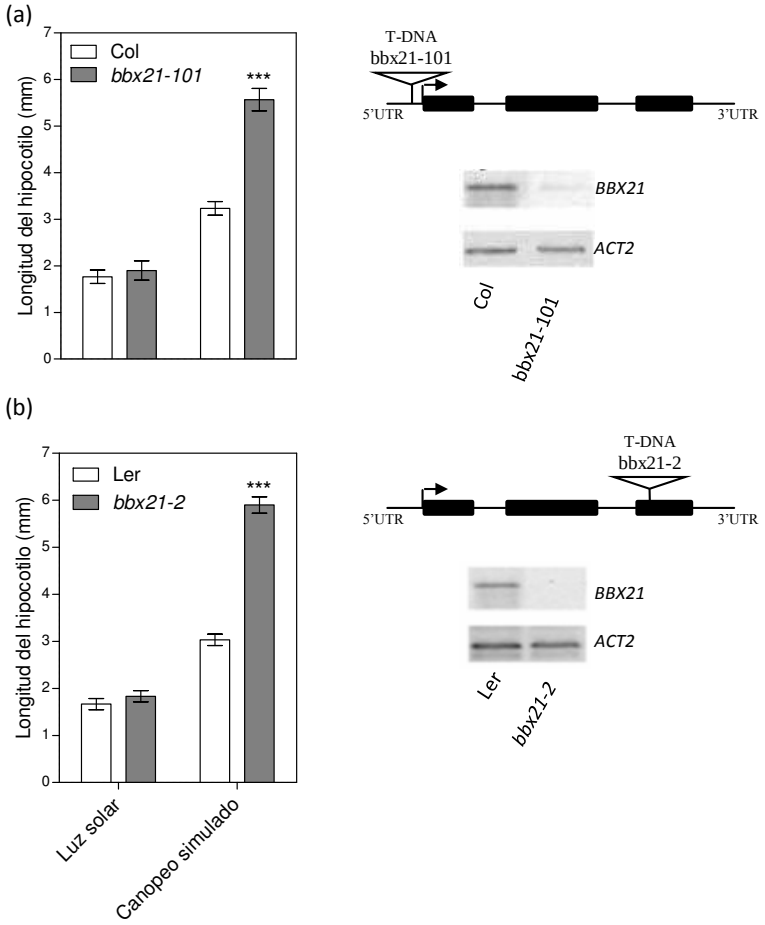


Figura 1. BBX21 es un regulador negativo del alargamiento del hipocotilo en canopeo simulado. (a) Largo del hipocotilo en plántulas del genotipo salvaje Col y el mutante *bbx21-101*. (b) Largo del hipocotilo en plántulas del genotipo salvaje Ler y el simple mutantes *bbx21-2.* Las plántulas crecieron durante 5 días en luz solar o canopeo simulado en invernáculo con fotoperíodo natural de día largo y con temperatura regulada (*** P≤0,005). Esquema del gen *BBX21* (derecha) señalizando la inserción del T-DNA para la línea *bbx21-101* (a) y *bbx21-2* (b) junto con los niveles de expresión del gen *BBX21* para cada línea mutante. El gen *ACT2* fue utilizado como control de carga.

Adicionalmente, se construyeron líneas de ARN de interferencia (RNAi) contra el *mRNA* de *BBX21*. Las líneas de RNAi fueron generadas en fondo genético Col, obteniéndose 2 líneas independientes llamadas *BBX21*:RNAi_1 y *BBX21*:RNAi_2. Ambas líneas presentan una disminución en la expresión del gen *BBX21* (Figura 2a). El fenotipo de las plántulas *BBX21*:RNAi fue evaluado bajo las mismas condiciones experimentales en las que se llevo

a cabo la caracterización del *mutante bbx21-101 y bbx21-2*. Los resultados demuestran que las plántulas *BBX21*:RNAi presentan un hipocotilo significativamente más alto que las plántulas Col cuando crecen en condiciones de canopeo simulado, pero no así en luz solar (Figura 2a) u oscuridad (Figura S1-I). La evidencia experimental de los dos alelos mutantes, *bbx21-101* y *bbx21-2*, y las líneas *BBX21*:RNAi demuestran que la pérdida o disminución de la expresión del gen *BBX21* induce a una respuesta exagerada del crecimiento del hipocotilo cuando las plántulas se desarrollan en condiciones de canopeo simulado.

Con el fin de evaluar el fenotipo de plántulas que sobre-expresan el gen *BBX21*, se construyeron líneas transgénicas donde el gen *BBX21* se encuentra bajo las órdenes del promotor 35s, logrando una expresión constitutiva en las plantas correctamente transformadas. Se transformaron exitosamente plantas de los ecotipos Ler y Col, denominadas *BBX21ox*_ler y *BBX21ox*_col. Para realizar la caracterización fisiológica fueron seleccionadas dos líneas independientes de cada fondo genético que presentaron niveles del transcripto *BBX21* más altos que el observado en plántulas salvajes (Figura 2b, c). Tanto las plántulas de *BBX21ox*_ler como las *BBX21ox*_col, presentan un hipocotilo significativamente más alto que su correspondiente genotipo salvaje bajo canopeo simulado pero no así en luz solar (Figura 2b, c) u oscuridad (Figura S1-I).

Por lo tanto, comprobamos que una modificación sobre la expresión del gen *BBX21,* provoca una alteración en la respuesta de escape al sombreado. Fenotípicamente, esta alteración se manifiesta con un alargamiento exagerado del hipocotilo en la condición de canopeo simulado.

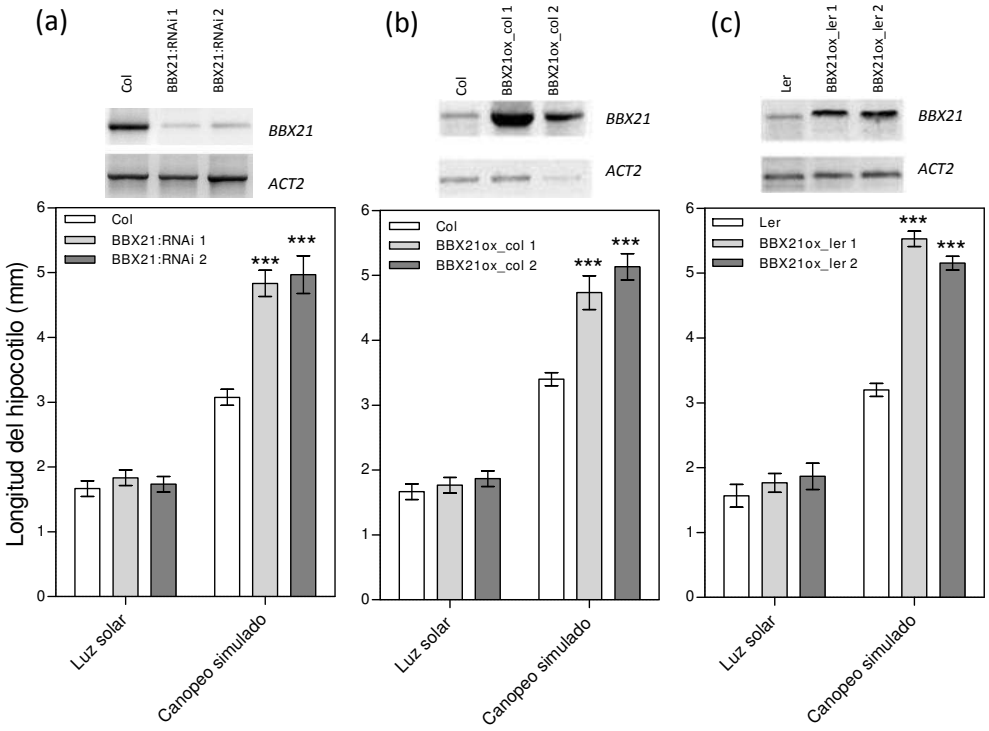


Figura 2. Caracterización fisiológica de las líneas sobre-expresantes *BBX21ox* y de RNAi en canopeo simulado. Longitud del hipocotilo de plántulas creciendo en luz solar o canopeo simulado en invernáculo. Se evaluó plántulas de los genotipos salvajes (col, ler), (a) 2 líneas independientes de RNAi (BBX21_RNAi1 y 2), (b) 2 líneas independientes sobreexpresantes en el fondo genético col (BBX21ox_Col1 y 2) y (c) 2 líneas independientes sobreexpresantes en el fondo genético ler (BBX21ox_Ler1 y 2). (*** P≤0,005). Arriba de cada grafico se encuentran los niveles de expresión del gen *BBX21* para cada línea mutante analizada. El gen *ACT2* fue utilizado como control de carga.

1.2 - Caracterización fisiológica en canopeo natural

Las caracterizaciones fisiológicas del punto anterior fueron llevadas a cabo en condiciones naturales que simulan un canopeo. En este punto se evaluó el comportamiento del alargamiento del hipocotilo que presentan las plántulas del genotipo salvaje y las diferentes líneas mutantes cuando crecen en una situación de canopeo natural. El canopeo natural fue logrado con una cobertura de *Lolium repens* y los cambios cualitativos y cuantitativos de la luz asociados a ese canopeo fueron cuantificados con un espectro-radiómetro (Figura 3a). Al comparar ambos espectros se observa que el canopeo natural produce una disminución de todas las longitudes de onda que corresponden al

espectro visible, incluyendo la luz R y azul. Por otra parte, no se observa una disminución tan importante en las longitudes de onda correspondientes al RL, lo cual establece una disminución de la relación R:RL al compararlo con el espectro de luz solar. Una vez caracterizado el ambiente lumínico del sistema, se medió el largo del hipocotilo de plántulas mutantes *bbx21-101*, *bbx21-2*, la línea *BBX21*_RNAi, las líneas sobreexpresantes *BBX21*ox_col y *BBX21*ox_ler y los genotipos salvajes, Ler y Col que crecieron en luz solar o bajo el canopeo natural. Los hipocotilos de las plántulas *bbx21-101*, *BBX21*_RNAi y *BBX21ox*_col resultaron ser significativamente más altos que los hipocotilos de las plántulas Col en el tratamiento de canopeo natural. Las plántulas *bbx21-2* y *BBX21ox*_Ler también respondieron al canopeo con una elongación significativamente mayor a la observada en plántulas Ler (Figura 3b). Bajo la condición de luz solar las diferentes líneas mutantes no presentaron diferencias significativas en el largo del hipocotilo con respecto a sus correspondientes genotipos salvajes (Figura 3b).

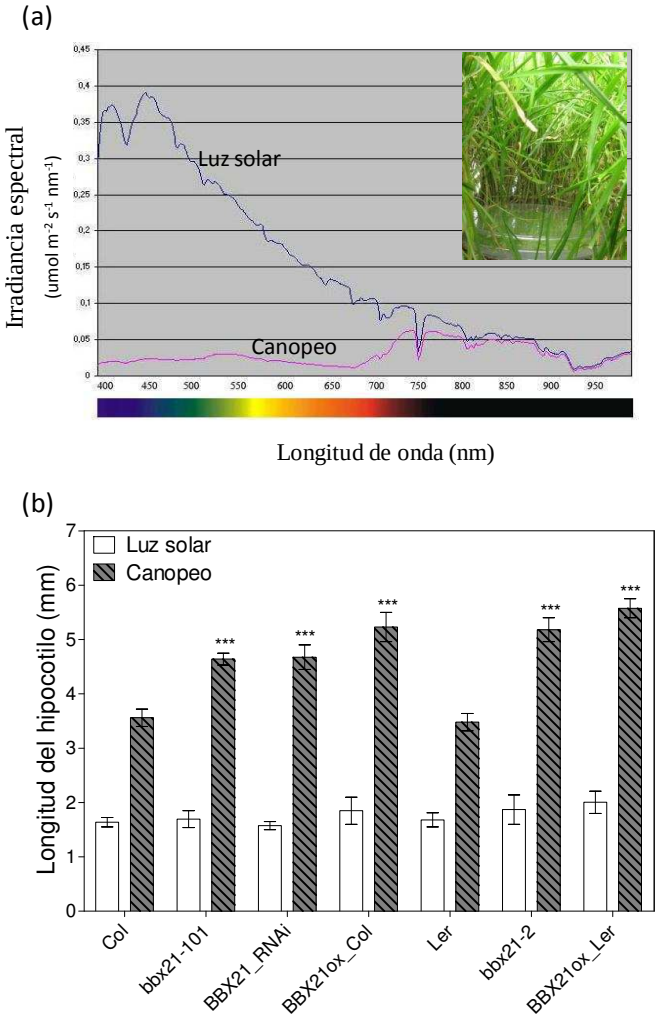


Figura 3. Caracterización de BBX21 en condiciones de canopeo natural. (a) Espectros de irradiancia para las dos condiciones experimentales utilizadas, luz solar y canopeo natural. La fotografía muestra el experimento de canopeo llevado a cabo con *Lolium repens*. (b) Largo del hipocotilo de plántulas creciendo en luz solar o canopeo natural del genotipo salvaje col y ler, 2 líneas independientes de RNAi (BBX21_RNAi1 y 2), 2 líneas sobre-expresantes en el fondo genético col y ler (BBX21ox_Col - BBX21ox_Ler1). (*** P≤0,005).

1.3 - Otras proteínas de la familia B-Box participan en las respuestas de escape al sombreado

En *Arabidopsis thaliana* se identificaron 32 proteínas del tipo B-Box (BBX) que han sido organizadas en 5 grupos estructurales (Khanna et al., 2009). BBX21 pertenece al grupo estructural IV de la familia BBX, el cual está conformado por 8 miembros (BBX18 hasta BBX25) que se caracterizan por presentar una alta similitud entre sus secuencias proteicas y por conservar dos dominios del tipo B-box en tándem en su extremo N-terminal (Khanna et al., 2009). Dada su alta similitud, nos preguntamos si algún otro miembro del grupo estructural IV estaría implicado en las respuestas de escape al sombreado. Para ello, se adquirieron los alelos mutantes de 5 miembros de este grupo: *bbx18-1*, *bbx19-1*, *bbx22-1*, *bbx24-1* y *bbx25-2*, todos en fondo genético Col. Estas nuevas líneas mutantes fueron caracterizadas en las condiciones naturales de canopeo y luz solar, y en condiciones controladas de laboratorio que simulan la presencia de plantas vecinas (sombra simulada). En la condición de sombra simulada solo se altera la relación R:RL, lo cual permite observar si estas BBXs participan en la respuesta de escape al sombreado interviniendo en la vía de señalización disparadas por las bajas relaciones R:RL. Bajo estas dos condiciones experimentales se obtuvieron los siguientes fenotipos: Al igual que en las plántulas *bbx21-101*, los hipocotilos de las plántulas mutantes *bbx19-1* y *bbx22-1* son significativamente más altos que los hipocotilos del genotipo salvaje cuando crecen en condiciones de canopeo natural (Figura 4a), mientras que solo *bbx19-1* es más alto bajo sombra simulada (Figura 4b). Los hipocotilos de las plántulas *bbx18-1* y *bbx24-1* son más bajos que las plántulas Col en las dos condiciones experimentales (Figura 4a, b), mientras que el hipocotilo de las plántulas *bbx25-1* solo es significativamente diferente cuando crece en canopeo natural (Figura 4a). Estos resultados demuestran que el cambio en la relación R:RL del ambiente es el responsable de los fenotipos observados en los mutantes *bbx18-1*, *bbx19-1*, *bbx21-101* y *bbx24-1*. Dada la alta similitud entre las secuencias proteicas de BBX22 y BBX21, y que las plántulas mutantes *bbx22* presentan el mismo fenotipo que las plántulas *bbx21* en canopeo, nos preguntamos si BBX21 y BBX22 presentan una función complementaria o aditiva en el alargamiento del hipocotilo. Para contestar esta pregunta, se evaluó la respuesta del alargamiento del hipocotilo en las plántulas doble mutante

bbx21bbx22. Los resultados muestran que los hipocotilos de las plántulas *bbx21bbx22* son más altos que los hipocotilos de los simples *bbx21* y *bbx22* tanto en la condición de canopeo natural como en la de sombra simulada (Figura 4a, b). Esta información sugiere la existencia de una aditividad funcional entre BBX21 y BBX22 para modular el alargamiento del hipocotilo durante la respuesta de escape al sombreado.

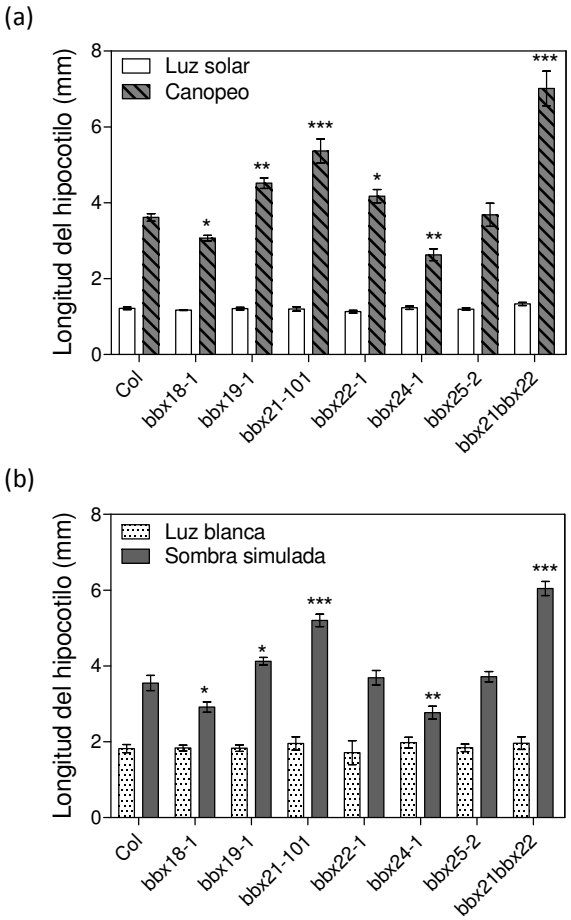


Figura 4. Caracterización de otros BBX en la respuesta de escape al sombreado. Longitud del hipocotilo de plántulas que crecieron en luz solar y canopeo simulado (a) o en luz blanca y sombra simulada (b) bajo condiciones controladas de laboratorio. Se evaluaron las plántulas mutantes *bbx18-1*, *bbx19-1*, *bbx21-101*, *bbx22-1*, *bbx24-1, bbx25-2, bbx21bbx22* y el genotipo salvaje col. (*** P≤0,005, ** P≤0,01, * P≤0,05).

Dados los resultados fisiológicos obtenidos, nos preguntamos si los niveles de expresión de los genes *BBX18*, *BBX19*, *BBX21*, *BBX22*, *BBX24* y *BBX25* responden a los cambios en la calidad y cantidad de la luz asociados a la respuesta de escape al sombreado. Utilizando plántulas salvajes Col crecidas bajo condiciones de canopeo natural o sombra simulada, se observó que los niveles de expresión de los genes *BBX19*, *BBX21* y *BBX22* aumentan significativamente en ambos tratamientos al compararlos con sus respectivos controles de luz solar o luz blanca (Figura 5). Por otro lado, los niveles de expresión de *BBX18* y *BBX24* disminuyen significativamente por el efecto del canopeo o sombra simulada con respecto al tratamiento control (Figura 5). Estos resultados demuestran que los niveles de expresión de estos genes se encuentran principalmente regulados por una disminución en la relación R:RL durante las respuestas de escape al sombreado (Figura 5).

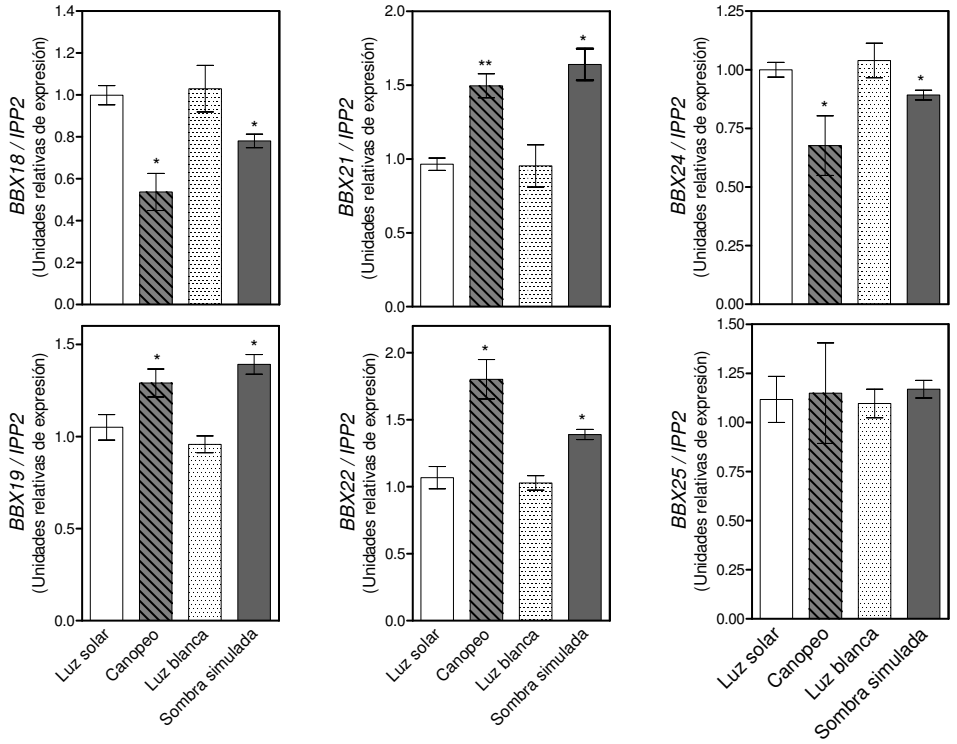


Figura 5. La expresión de algunas BBXs se encuentran reguladas por las bajas relaciones R:RL. Medición de los niveles de expresión de los genes *BBX18, BBX19, BBX21, BBX22, BBX24* y *BBX25* en plántulas del genotipo col que crecieron en luz solar y canopeo natural en invernáculo o bajo luz blanca y sombra simulada en cámaras. Los niveles de expresión están relativizados al valor de expresión del gen *IPP2* utilizado como control de carga. (** P≤0,01, * P≤0,05).

1.4 – BBX21 participa en la modulación temprana de las respuestas al sombreado

Ya avanzada la caracterización funcional de BBX21 en respuesta a la sombra, el grupo de Holm publicó un trabajo en el cual demostró, *in vitro* e *in vivo,* que la proteína BBX21 co-localiza en el núcleo junto a la proteína COP1 (Datta et al., 2007). Sin embargo, experimentos de doble hibrido en levaduras no mostraron interacción directa entre BBX21 y COP1 (Datta et al., 2007). Trabajos anteriores han demostrado que las plántulas mutantes *cop1-4* presentan suprimida la respuesta de escape al sombreado (McNellis et al., 1994) y que COP1 regula positivamente la expresión de los genes *ATHB4*, *PAR1* y *PIL1* durante las primeras horas de sombreado; plántulas mutantes de *cop1* expuestas a una hora de sombra presentaron valores de expresión de estos genes más bajos que en las plántulas salvajes (Roig-Villanova et. al., 2006). Sin embargo, hasta el momento se desconoce cuál es el mecanismo por el cual COP1 interviene en la respuesta del alargamiento del hipocotilo disparada por la sombra. En base a estas evidencias y suponiendo que COP1 presenta algún tipo de interacción con BBX21, surgieron las siguientes preguntas: ¿BBX21 estará implicado en la regulación temprana de aquellos genes que son promovidos por COP1 durante las primeras horas de sombreado? De ser así, ¿La expresión del gen *BBX21* estará siendo rápidamente regulada por las condiciones de canopeo? ¿Cuál es la relación genética entre BBX21 y COP1 en las respuestas de escape al sombreado? Para responder si la expresión del gen *BBX21* es rápidamente modulada por un cambio en la relaciones R:RL, se cuantificó los niveles de expresión de *BBX21* en plántulas salvajes (col) que crecieron durante 5 días en los siguientes tratamientos: luz solar, luz solar suplementada con 1 hora de canopeo natural el último día antes de ser cosechadas o canopeo natural prolongado. Los niveles de expresión de *BBX21* aumentaron significativamente tras exponer a las plántulas a 1 hora de canopeo, siendo incluso mayores a los niveles observados bajo la condición de canopeo prolongado (Figura 6a). Este dato sugiere que BBX21 participaría tempranamente modulando las respuestas de escape al sombreado. Al evaluar los niveles de expresión de los genes *HFR1*, *ATHB4*, *PAR1* y *PIL1* en plántulas del genotipo salvaje se observó que la expresión de estos genes se induce rápidamente tras 1 hora de exposición en nuestra condición de canopeo (Figura

6b). Sin embargo, en las plántulas mutantes *bbx21-101* la expresión de estos genes se encuentran significativamente disminuida cuando las plántulas se exponen a 1 hora de canopeo (Figura 6b). En las plántulas sobreexpresantes *BBX21ox* los transcriptos de estos genes no presentaron diferencias de expresión con respecto al genotipo salvaje con 1 hora de canopeo (Figura 6b). Estos resultados demuestran que BBX21 actúa tempranamente en las respuestas de escape al sombreado modulando positivamente la expresión de los genes *HFR1*, *ATHB4*, *PAR1* y *PIL1* en el canopeo natural.

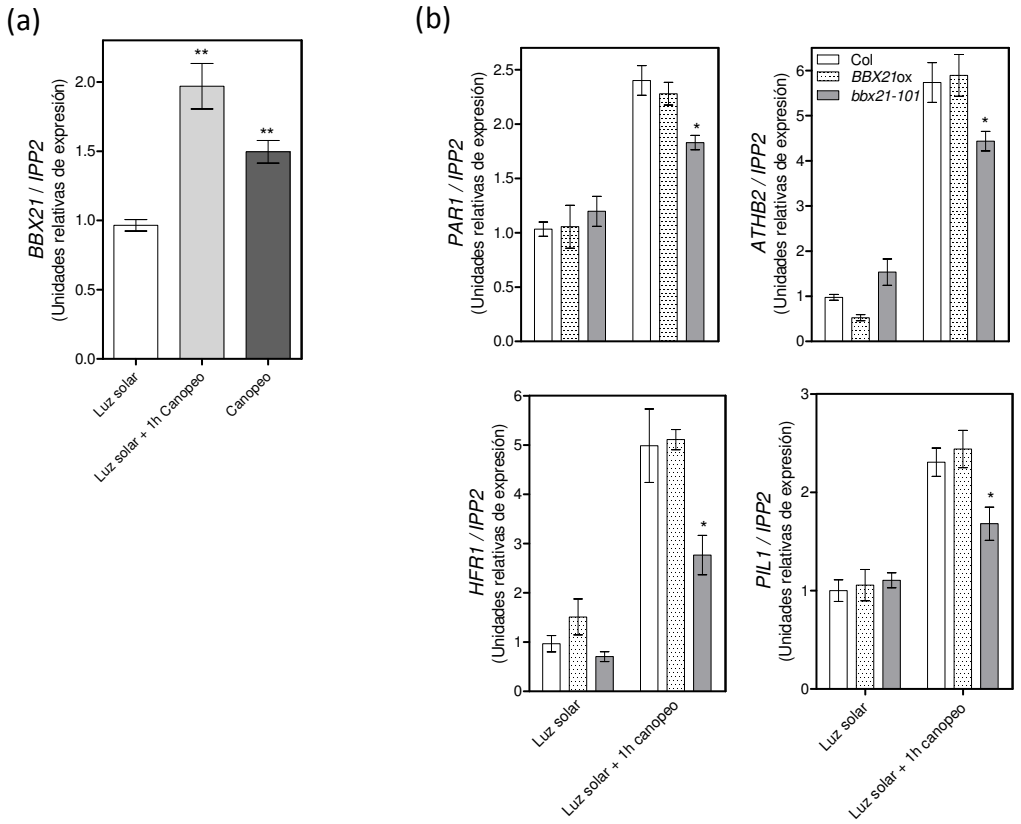


Figura 6. BBX21 promueve la expresión de genes marcadores tempranos de sombra. (a) Niveles de expresión de *BBX21* en plántulas del genotipo salvaje (Col) en luz solar, canopeo o luz solar terminada con 1h de canopeo antes de ser cosechadas. (b) Niveles de expresión de los genes *PAR1, HFR1, ATHB2* y *PIL1* medidos en plántulas Col, *bbx21-101* y sobre-expresante *BBX21ox* en luz solar o luz solar suplementada con 1 hora de canopeo antes de ser cosechadas. La expresión de todos los genes se encuentran relativizados a los niveles de expresión del gen *IPP2*. (** P≤0,01, * P≤0,05).

1.5 - Interacción genética entre BBX21 y COP1 en la respuesta de escape al sombreado

Para evaluar la relación genética entre BBX21 y COP1, se midió la longitud del hipocotilo en plántulas del doble mutante *bbx21cop1* bajo condiciones de canopeo natural o sombra simulada prolongada (5 días). Dada la acción aditiva entre BBX21 y BBX22, también fue evaluado el fenotipo de las plántulas *bbx21bbx22,* el doble mutante *bbx22cop1* y el triple mutante *bbx21bbx22cop1*. Para la caracterización fisiológica se utilizaron dos alelos de pérdida de función independientes para COP1, los alelos *cop1-4* y *cop1-6*. Al analizar estas líneas mutantes se observa que las plántulas del triple mutante *bbx21bbx22cop1-4* y *bx21bbx22cop1-6* restauran parcialmente el fenotipo de hipocotilo corto observado en las plántulas *cop1-4 y cop1*-6 cuando crecen en condiciones de sombra simulada (Figura 7a) o canopeo (Figura 7b).

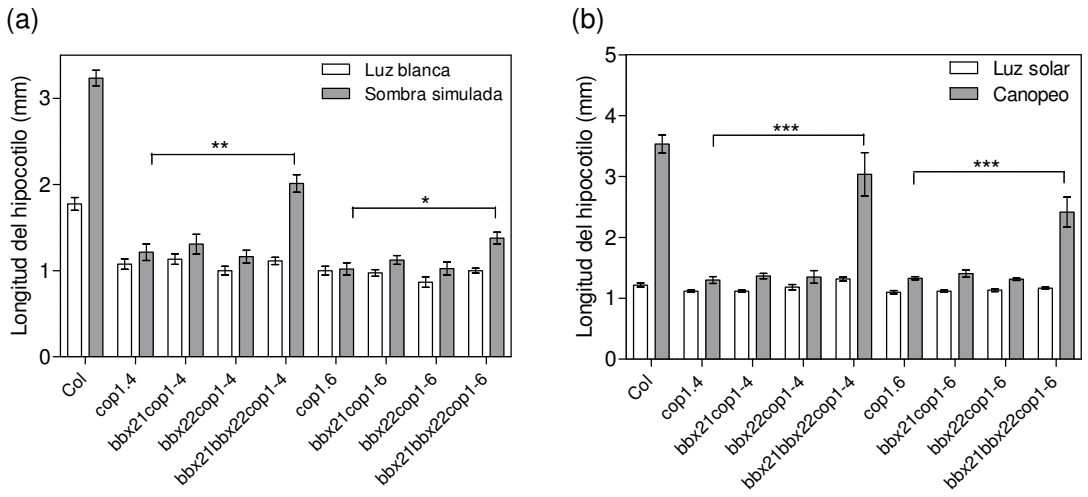


Figura 7. Interacción genética entre BBX21, BBX22 y COP1. (a) Medición del largo del hipocotilo en plántulas que crecen en luz blanca o sombra simulada. (b) (a) Medición del largo del hipocotilo en plántulas que crecen en luz solar o canopeo. Se utilizaron el genotipo salvaje col, los dobles mutantes *bbx21cop1*, *bbx22cop1* y los triples mutantes *bbx21bbx22cop1* en el fondo genético *cop1-4* y *cop1-6*. (** P≤0,01, * P≤0,05).

Teniendo en cuenta que COP1 y BBX21 regulan positivamente la expresión temprana de un grupo común de genes, nos preguntamos si esta regulación es concertada o si es

llevada a cabo por dos vías independientes. Para contestar esta pregunta se midieron los niveles expresión de los genes *HFR1*, *ATHB4*, *PAR1* y *PIL1* en plántulas mutantes *cop1-4, bbx21bbx22, bbx21bbx22cop1.4* y plántulas salvajes bajo condiciones de luz blanca o luz blanca suplementada con una hora de sombra simulada antes de ser cosechadas. Los resultados muestran que existe una interacción genética entre COP1 y BBX21 en la regulación temprana de los genes *HFR1*, *ATHB4* y *PAR1* en ambientes con baja relación R:RL (Figura 8).

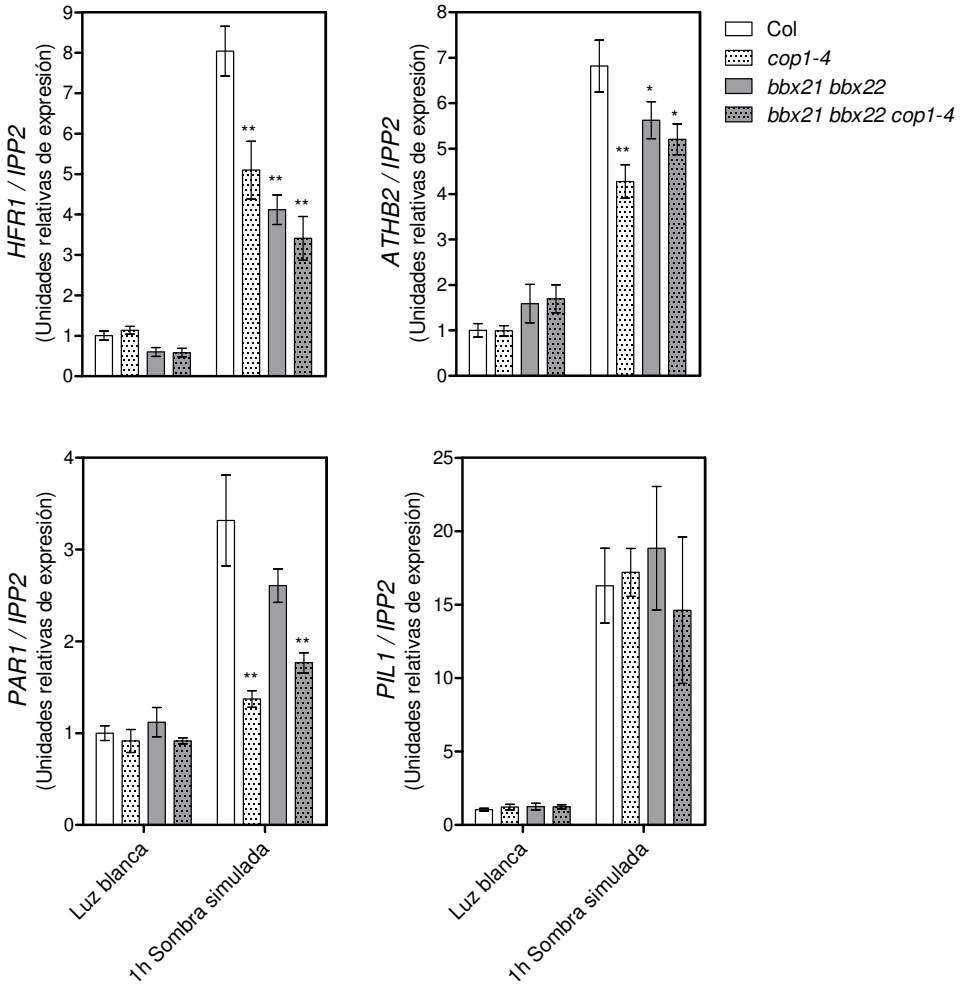


Figura 8. BBX21 y COP1 concertadamente promueven la expresión de los genes tempranos marcadores de sombra. Niveles de expresión de los genes *PAR1, HFR1, ATHB2* y *PIL1* en plántulas del genotipo salvaje col, simple mutante cop1-4, doble mutante *bbx21bbx22* y triple mutante *bbx21bbx22cop1-4*. Las plántulas crecieron en condiciones controladas de laboratorio con luz blanca o luz blanca suplementada con 1 hora de sombra simulada antes de ser cosechadas. La expresión de todos los genes se encuentran relativizados a los niveles de expresión del gen *IPP2*. (** P≤0,01, * P≤0,05).

Al igual que BBX21, HFR1 regula negativamente el alargamiento del hipocotilo en ambientes con bajas relaciones R:RL (Sessa et al., 2005). Como los mutantes *bbx21* y *hfr1* presentan un fenotipo de hipocotilo similar, nos preguntamos si BBX21 y HFR1 participan en la misma vía de señalización que promueve las respuestas de escape al sombreado. Para evaluar esta hipótesis, se caracterizó en el fenotipo del mutante *hfr1* en nuestras condiciones experimentales de canopeo natural y sombra simulada. La longitud del hipocotilo de las plántulas *hfr1* resultaron ser significativamente mayores al de las plántulas salvajes en la condición de sombra simulada (Figura 9b), pero llamativamente presentaron una leve diferencia en la condición de canopeo natural (Figura 9a). En sombra simulada prolongada, HFR1 regula negativamente la expresión de genes asociados a la respuesta de escape al sombreado (Hornitschek et al., 2009), por lo cual BBX21 podría estar siendo afectado por HFR1 en el canopeo prolongado. Para evaluar esta hipótesis, se cuantificó la expresión de *BBX21* en plántulas mutantes *hfr1* y plántulas salvajes que crecieron bajo luz solar o bajo canopeo prolongado. No se encontró diferencia significativa en la expresión de *BBX21* entre las plántulas *hfr1* y Col (Figura 9 c). Estos resultados demuestran que la expresión de *BBX21* no es dependiente de HFR1 en canopeo natural.

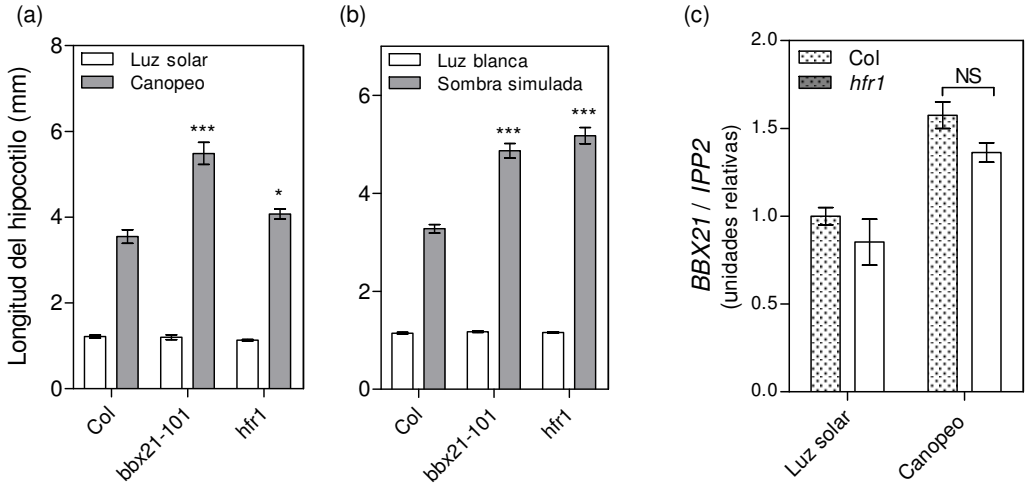


Figura 9. BBX21 modula la respuesta de escape al sombreado independientemente a HFR1. Medición del largo del hipocotilo en plántulas mutantes *bbx21-101*, *hfr1* y plántulas salvajes que crecen en (a) luz solar y canopeo o en (b) luz blanca y sombra simulada (*** P≤0,001; * P≤0,01). (b) Niveles de expresión de *BBX21* en plántulas del genotipo Col y *hfr1* que crecieron en luz solar o canopeo. Los niveles de expresión de *BBX21* se encuentran relativizados a los niveles de expresión del gen *IPP2*. NS: diferencias no significativas.

1.6 - Análisis del transcriptoma en plántulas mutantes *bbx21* en ambientes sombreados

Para conocer cuáles son los genes que están siendo regulados por *BBX21*, se realizaron microarreglos utilizando muestras de mRNA de plántulas *bbx21-2* y plántulas salvajes (ler) que crecieron en luz solar o bajo canopeo natural prolongado. Del análisis estadístico resultó que 1267 genes cambiaron significativamente sus valores de expresión al seleccionarlos por interacción genotipo-tratamiento. De los 1267 genes significativos, 250 presentan sus niveles de expresión alterados en las plántulas *bbx21-2* con respecto al genotipo salvaje, en ambos tratamientos lumínicos (efecto genotipo). Por otro lado, hay 546 genes cuyo nivel de expresión es regulado por *BBX21* exclusivamente en la condición de canopeo (efecto tratamiento). Como nos interesa explicar el rol de BBX21 en la sombra, los análisis posteriores se enfocaron sobre los 546 genes cuyos niveles de expresión cambian por la condición de canopeo en el mutante *bbx21-1* con respecto al genotipo salvaje. Utilizando los datos de expresión de estos 546 genes se realizó un análisis de agrupamiento por patrones similares de expresión (Figura 10a). De este análisis, se identificó a 2 grupos compuestos por 146 (grupo 1) y 59 genes (grupo 2) (Tabla S1-I). El grupo 1 esta compuestos por genes cuyos niveles de expresión se ven promovidos por la situación de canopeo en las plántulas salvajes, pero en las plántulas *bbx21-2* estos niveles aumentan más de lo esperado (Figura 9b). El grupo 2 contiene genes cuyos niveles de expresión solo se ven incrementados por el efecto del canopeo en el mutante *bbx21-2* (Figura 10b). Utilizando la herramienta Classification SuperViewer (Provart y Zhu, 2003), se realizó un análisis de clasificación funcional donde se observó que el grupo 1 y 2 se encuentran significativamente sobre-representados de genes que forman parte de la pared celular o que intervienen en su remodelación, genes que presentan actividad de transporte, factor de transcripción y transferasas y genes que intervienen en las respuestas a estímulos bióticos/abióticos (Figura 10c). Pero, se encuentran sub-representados en genes que presentan actividad de unión a nucleótidos (Figura 10c).

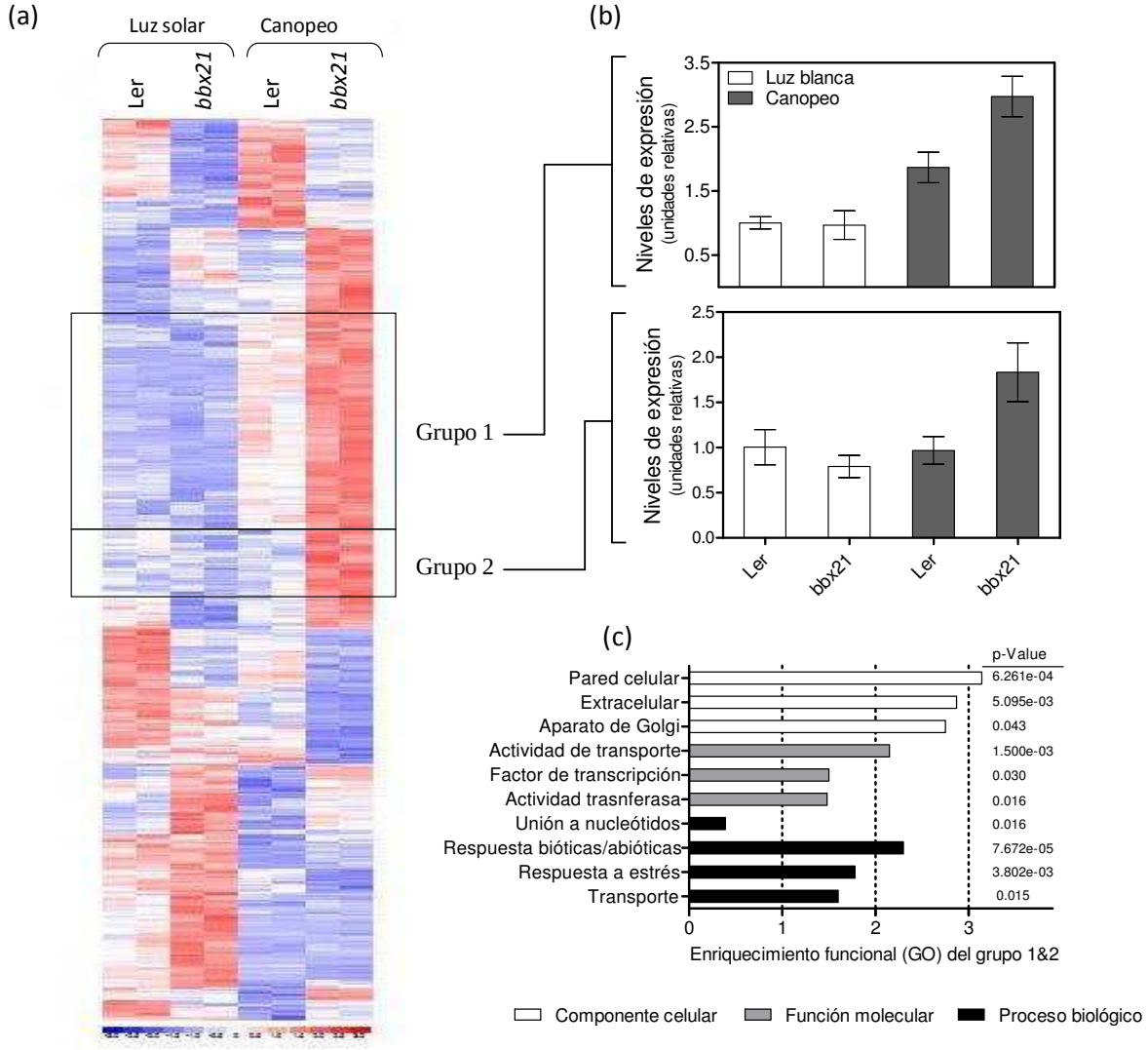


Figura 10. Análisis transcripcional y funcional de los genes modulados por BBX21 en las respuestas de escape al sombreado. (a) Gráfico de agrupamiento de 516 genes según un patrón de expresión común para cada microarreglos. (b) Patrón de expresión común para los genes del grupo 1 y 2. Los valores se encuentran relativizados al valor de expresión obtenido en las plántulas Ler de luz blanca. (c) Clasificación y enriquecimiento funcional del grupo 1 y 2.

Con el fin de validar los datos obtenidos de los microarreglos se utilizó qRT-PCR para medir los niveles de expresión de seis genes pertenecientes al grupo 1 (*AUX1, FIND219, FQR1, ATHB52, GRP3s* y *AuxRe*). Todos los genes medidos presentaron el mismo patrón de expresión que el observado en los microarreglos (Figura 11).

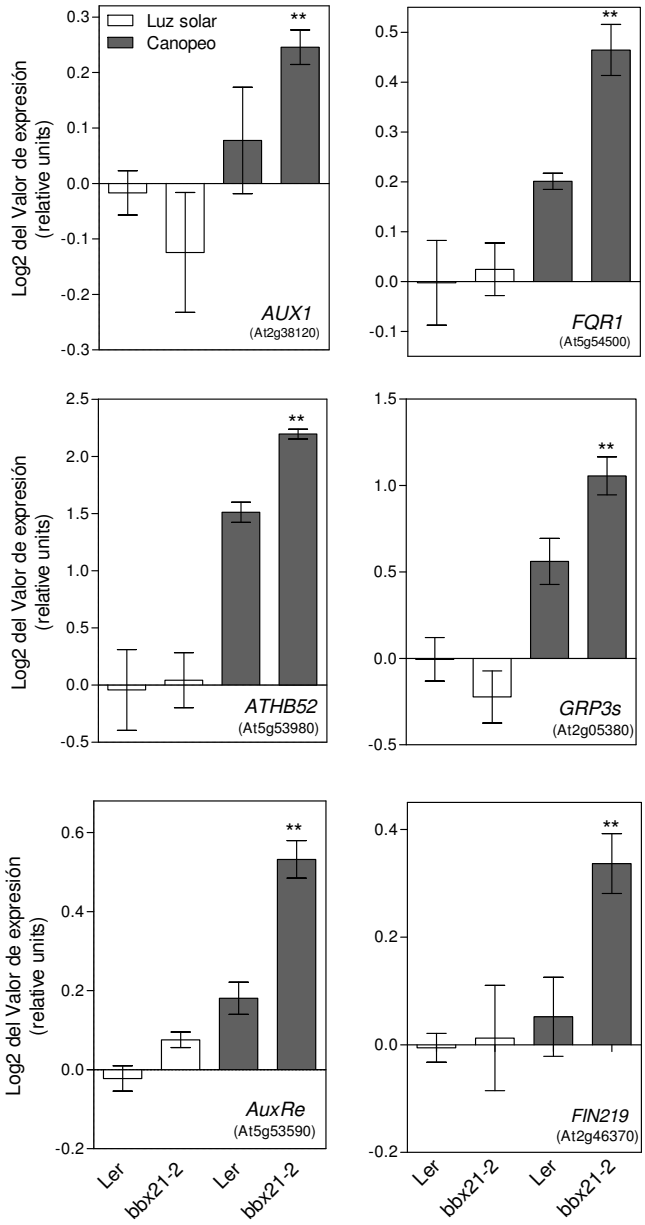


Figura 11. Validación de los microarreglos mediante qRT-PCR. Log2 de los valores de expresión de los genes *AUX1, FQR1, ATHB52, GRP3s, AuxRe* y *FIN219* en plántulas ler y *bbx21-2* que crecieron en luz solar o canopeo natural. La expresión de todos los genes se encuentran relativizados a los niveles de expresión del gen *IPP2*. (** P≤0,01).

DISCUSIÓN CAPÍTULO I

BBX21 regula negativamente el alargamiento del hipocotilo durante la respuesta de escape al sombreado

En esta tesis se aisló y caracterizó al mutante *bbx21-101,* el cual presenta afectada la respuesta de elongación del hipocotilo cuando las plántulas crecen en ambientes con baja relación R:RL. Caracterizando el alelo independiente *bbx21-2* (Figura 1), las líneas de RNAi con la expresión de *BBX21* disminuida y las líneas sobre-expresantes del gen *BBX21* (Figura 3b), demostramos que la alteración de la expresión del gen *BBX21* produce una respuesta exagerada del alargamiento del hipocotilo en las plántulas que crecen bajo canopeo. Cuando las plantas crecen en una condición de canopeo, las respuestas de escape al sombreado están determinadas por múltiples señales lumínicas (Ballaré et al., 2000). En nuestro sistema experimental de canopeo natural se cuantificaron los cambios en la calidad de luz, observándose una reducción de la relación R:RL y una disminución de la irradiancia y luz azul (Figura 3a). Se ha demostrado que la depleción o disminución de la luz azul incidente promueve el crecimiento del hipocotilo en plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Sellaro et al., 2010; Keuskamp et al., 2011). Sin embargo, al trabajar en condiciones naturales hay que tener en cuenta la existencia de otros factores del ambiente que podrían estar interaccionando con los cambios de luz para regular el alargamiento del hipocotilo. La ventaja de este sistema es que representa un ambiente natural y los resultados se ajustan más a lo que sucedería a campo. Esto es particularmente interesante porque permite, mediante una selección de genotipos mutantes, encontrar genes cuya función sea evidente bajo canopeo natural y no bajo una condición controlada de laboratorio. La desventaja del sistema natural es que las diferentes contribuciones realizadas, por los distintos grupos de investigación, sobre el mecanismo molecular de la respuesta de escape al sombreado fueron llevados a cabo bajo condiciones controladas de laboratorio. Bajo esta situación controlada lo único que se altera con respecto al tratamiento control es la relación R:RL. Mediante los experimentos de sombra simulada logramos modificar solo la relación de R:RL del ambiente, la cual nos permitió evaluar la respuestas de los mutantes bajo una condición controlada de

laboratorio e independizarnos de los otros factores ambientales del canopeo. La caracterización fenotípica del mutante *bbx21* y la medición de la expresión del gen *BBX21,* bajo luz blanca y sombra simulada, nos permitió demostrar que BBX21 modula las respuestas de escape al sombreado a través de la vía de señalización disparada por las bajas relaciones R:RL (Figura 4b y 5). Por lo tanto, BBX21 es un regulador negativo de las respuestas de escape al sombreado cuya función es asegurar que en condiciones prolongadas de sombra, en las cuales la planta no logra superar el sombreado impuesto por las vecinas, esta no desarrolle una respuesta de elongación del hipocotilo exagerada.

BBX21 modula positivamente la expresión temprana de un grupo de genes promovidos por la sombra

A nivel molecular, la reducción de la relación R:RL del ambiente provoca cambios en los niveles de expresión de numerosos genes (Devlin et al., 2003; Sessa et al 2005). Algunos de estos genes están involucrados en la señalización y/o regulación transcripcional de las vías de transducción que se activan en respuesta a la percepción de plantas vecinas, mientras que otro grupo de genes está implicado en los cambios morfológicos que ocurren en la planta. Dentro del primer grupo se encuentran los factores de transcripción *HFR1*, *ATHB2*, *PAR1* y *PIL1,* cuya expresión aumenta frente a la reducción en la relación R:RL. El aumento en los niveles de expresión del factor de transcripción *HFR1* es uno de los primeros eventos que tiene lugar frente a la reducción de la relación R:RL y está regulado en forma directa por la acción de los fitocromos (Carabelli et al., 1996). En ambientes de baja relación R:RL, la expresión temprana de *HFR1* es modulada positivamente por COP1, pero a su vez, cuando la sombra es prolongada, la interacción HFR1-COP1 provoca su fosforilación y su posterior degradación (Duek et al., 2004; Roig-Villanova et al., 2006; Sessa et al., 2005). Este sistema de retroalimentación, o feed-back, transcripcional positivo (sombra temprana) y negativo (sombra prolongada) ejercido por HFR1, controlaría que la respuesta de elongación del hipocotilo se promueva tempranamente pero, cuando la sombra se vuelve prolongada, inhibiría la elongación. Recientemente, Hornitschek et al. (2009) descubrió parte del mecanismo molecular por el cual HFR1 previene el

alargamiento exagerado del hipocotilo en sombra prolongada. Los autores demostraron que PIF4 y PIF5 promueven la expresión de genes asociados al sombreado mediante una interacción directa con los sitios de unión G-box de sus promotores. Cuando el sombreado se vuelve prolongado, la proteína HFR1 se acumula en el núcleo y se une al PIF4 y PIF5 formando heterodímeros. Este mecanismo de acción previene la unión de PIF4 y PIF5 a los elementos G-box, lo cual modula la expresión de los genes disparados por sombra con el fin de establecer un mecanismo de control sobre el crecimiento del hipocotilo bajo sombra prolongada. En esta tesis se ha demostrado que *BBX21* y *HFR1* son promovidos rápidamente por las bajas relaciones R:RL y que ambos actúan como reguladores negativos del crecimiento del hipocotilo en sombra simulada prolongada (Figura 6a, b). Sin embargo, bajo la condición de canopeo la acción de HFR1 no es tan fuerte como en la de sombra simulada, mientras que BBX21 juega un rol importante en la regulación del hipocotilo bajo ambas condiciones (Figura 9a). Adicionalmente, el hecho de que *BBX21* regula positivamente la expresión temprana de *HFR1* (Figura 6b, 8), pero HFR1 no interviene en la regulación del transcripto *BBX21* (Figura 9c), sugiere que BBX21 actúa por una vía de acción independiente a la de HFR1. Para confirmar esta hipótesis es necesario plantear nuevos experimentos que nos permitan evaluar la interacción genética entre HFR1 y BBX21. Estos datos indican BBX21 actúa en la vía de transducción de señales disparada por baja relación R:RL mediante un mecanismo de retroalimentación transcripcional positiva, promoviendo la rápida expresión de genes tempranos de sombra, y negativa, regulando que la elongación del hipocotilo no sea exagerada cuando la condición de sombra se vuelve prolongada.

BBX21 regula negativamente la expresión de genes que intervienen en la proliferación y crecimiento celular en sombra prolongada.

Comparando los transcriptomas de plántulas salvajes y plántulas mutantes *bbx21*, se identificó a un grupo de genes cuya expresión es regulada negativamente por BBX21 exclusivamente en las condiciones de canopeo prolongado. Los niveles de expresión de muchos de estos genes aumentan en las plántulas salvajes por la condición de canopeo,

pero en las plántulas *bbx21* son mucho mayores de lo esperado. Realizando un análisis de clasificación funcional, se observó que este grupo está enriquecido en genes que intervienen en procesos de proliferación y crecimiento celular. Particularmente se encuentran sobre-representados genes cuya actividad está asociada a la modificación pared celular, mucho de los cuales son expansinas y xiloglucano-transglucosidasa/hidrolasa (XTH), descriptos previamente como necesarios para promover elongación celular del hipocotilo durante el escape a la sombra (Sasidharan et al., 2010). Estos genes presentan sus niveles de expresión mucho más alto en el mutante *bbx21* de lo esperado, lo que estaría favoreciendo a la elongación celular (Tabla S1-I). Esto condice con el fenotipo de hipocotilo largo que presenta las plántulas *bbx21* frente a las plántulas salvajes cuando crecen en canopeo. Por lo tanto, el rol de BBX21 sería el de controlar que la respuesta no sea exagerada regulando negativamente la abundancia de un grupo común de genes, los cuales normalmente aumentan sus transcriptos para promover el crecimiento celular provocando la elongación del hipocotilo. Cuando BBX21 esta disminuido o ausente, estos genes no son correctamente regulados y su expresión es mucho más alta de lo que debería ser, siendo esta una de las posibles razones de que las plántulas mutantes *bbx21* presenten un hipocotilo más alto de lo normal.

BBX21 interacciona genéticamente con COP1 en las respuestas de escape al sombreado

Adicionalmente a los mecanismos de señalización explicados hasta el momento, los fitocromos regulan la respuesta de escape al sombreado a través del represor de la fotomorfogénesis COP1 (McNellis et al., 1994). Aunque se han identificado muchas proteínas que interaccionan con COP1, no se conocen cuales cooperan junto a COP1 para promover el crecimiento en respuesta a la sombra. Se ha demostrado que BBX21 co-localiza *in vivo* junto a COP1 en los cuerpos nucleares (Datta et al., 2007). Sin embargo, ensayos de doble hibrido en levaduras no pudieron comprobar la interacción física entre COP1 y BBX21 (Datta et al., 2007), lo que sugiere la existencia de una tercera proteína que mediría la interacción entre ambas. En esta tesis se ha demostrado que la regulación y

ajuste de la respuesta de escape al sombreado mediada por COP1, se da en parte por una interacción genética con BBX21 y BBX22 (Crocco et al., 2010, 2011). Bajo condiciones de 1hora de sombreado, BBX21, BBX22 y COP1 actúan concertadamente en la regulación temprana de los genes *HFR1*, *ATHB2* y *PAR1*. Aunque la naturaleza molecular de la interacción entre BBX21 y COP1 aún es desconocida, sugerimos que COP1 y BBX21 pueden ser parte de un complejo que participa tempranamente en la vía de señalización disparada por la sombra, el cual tiene una implicancia a nivel transcripcional. Este complejo solo sería funcional durante las primeras etapas del sombreado, con el fin de activar la transducción de señales necesarias para que se produzca la elongación del hipocotilo. Al igual a lo observado por McNellis et al (1994), las líneas mutantes *cop1* caracterizadas en esta tesis presentaron suprimida la respuesta de elongación del hipocotilo bajo sombra simulada prolongada (Figura 7a). Sin embargo, la supresión del alargamiento del hipocotilo en el mutante *cop1* se ve parcialmente compensada por la ausencia de BBX21 y BBX22 en el triple mutante *bbx21bbx22cop1* (Figura 7). Esto indicaría que, a diferencia de las respuestas tempranas, la acción de COP1 antagoniza con la acción de BBX21 y BBX22 para regular el crecimiento del hipocotilo bajo condiciones prolongadas de sombreado.

Posible mecanismo de acción de BBX21 en sombra prolongada

PIF4 es un factor de transcripción que induce la expresión de numerosos genes, muchos de los cuales codifican para factores promotores del crecimiento celular. Se ha demostrado que PIF4 interacciona físicamente con la forma activa (Pfr) del phyB y como producto de esa interacción la proteína PIF4 es degradada vía proteosoma (Lorrein et al., 2008; Leivar y Quail, 2011). También se demostró que PIF4 interacciona con las DELLA y se ha propuesto que la finalidad de esta interacción es la de retener al PIF4 para evitar que este factor de transcripción inicie la expresión de los genes promotores del crecimiento (De Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). En base a estas evidencias, se ha propuesto un modelo donde la relación R:RL del ambiente establece la abundancia de PIF4 en el núcleo que determinará la inhibición o el crecimiento del hipocotilo:

En ambientes con altas relaciones R:RL, la mayor parte del phyB se encuentra en su forma activa, y las proteínas DELLA son abundantes en el núcleo. Por lo tanto, la proteína PIF4 es conducida a su degradación por la interacción PIF4-Pfr y es retenida por la interacción PIF4-DELLA, inhibiendo así la elongación del hipocotilo (Diagrama 1).

En ambientes con baja relación R:RL, la mayor parte del phyB se fotoconvierte a su forma inactiva Pr, dejando liberado al PIF4 en el núcleo. Por otro lado, la sombra desestabiliza la interacción PIF4-DELLA por medio del complejo GA-GID1, promoviendo la marcación y posterior degradación de las proteínas DELLA vía el proteosoma (De Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). COP1 es una proteína con actividad del tipo E3 ligasa, cuya función es marcar (ubiquitinar) a otras proteínas para conducirlas a su posterior degradación vía el proteosoma 26s. Ha sido sugerido que COP1 participaría regulando la abundancia de PIF4 en el núcleo, pero aún el mecanismo por el cual COP1 opera para llevarlo a cabo es desconocido (Casal et al., 2012). En sombra prolongada (baja relación R:RL), tanto la fotoconversión del phyB como la degradación de las DELLA conducen a un aumento de PIF4 libre en el núcleo, permitiendo que PIF4 promueva la transcripción de genes que codifican para factores promotores del crecimiento. Esto da como resultado la elongación del hipocotilo característico de la respuesta de escape al sombreado. PIF4 no solo interviene en el crecimiento del hipocotilo mediado por la sombra, sino que presenta un rol fundamental en la activación de los genes que promueven el crecimiento del hipocotilo durante las últimas horas de la noche y las primeras horas del día (Nozue et al., 2007; Niwa et al., 2009). Al igual que en las condiciones de sombreado, durante la fase de oscuridad se produce una reversión lenta del phyB, la degradación de las proteínas DELLA y consecuentemente un aumento progresivo de la proteína PIF4 en el núcleo, siendo más abundante hacia al final de la noche, donde se produce la máxima tasa de elongación del hipocotilo. Al comenzar el día (alta relación R:RL) la tasa de elongación del hipocotilo comienza a ser frenada por diferentes procesos. Uno de ellos se da a nivel proteico por la fotoconversión del phyB a su forma activa y por el incremento de las DELLA, como se explico anteriormente. Sin embargo, recientemente se demostró que la abundancia de PIF4 en el núcleo también es regulada a nivel transcripcional por un complejo denominado

“Evening Complex”. Este complejo actúa reprimiendo la transcripción de *PIF4* durante la primeras horas del día, regulando así la abundancia de este factor de transcripción en el núcleo (de Montaigu et al., 2010). Esta forma de regulación sugiere que en condiciones de sombra prolongada la abundancia de la proteína PIF4 podría también estar siendo regulada a nivel transcripcional.

En esta tesis demostramos que BBX21 regula negativamente la expresión de un grupo de genes bajo la condición de canopeo prolongado (Figura 10), entre los que se encuentra el gen *At2g43010* que codifica para la proteína PIF4 (Tabla S1-I, Grupo I). Los niveles de expresión de *PIF4* se encuentran significativamente más altos en el mutante *bbx21-1* que en las plántulas salvajes cuando crecen bajo canopeo natural. En base esto, se propone un posible mecanismo de acción de BBX21 sobre el crecimiento del hipocotilo en sombra prolongada (Diagrama 1), en el cual BBX21 suprimiría el ARNm de *PIF4* que conducirá a una reducción de la síntesis *de novo* de la proteína PIF4. Al disminuir la abundancia de PIF4, también disminuirían los niveles de expresión de los genes de crecimiento promovidos por PIF4 (Diagrama 1). De todas formas, no descartamos que BBX21 module la expresión de genes vinculados al crecimiento celular por un mecanismo independiente al de PIF4. Sea por una vía dependiente o independiente a PIF4, la regulación ejercida por BBX21 sobre las plántulas tiene como finalidad controlar que no se produzca una respuesta de elongación exagerada cuando las condiciones de sombreado se vuelven prolongadas.

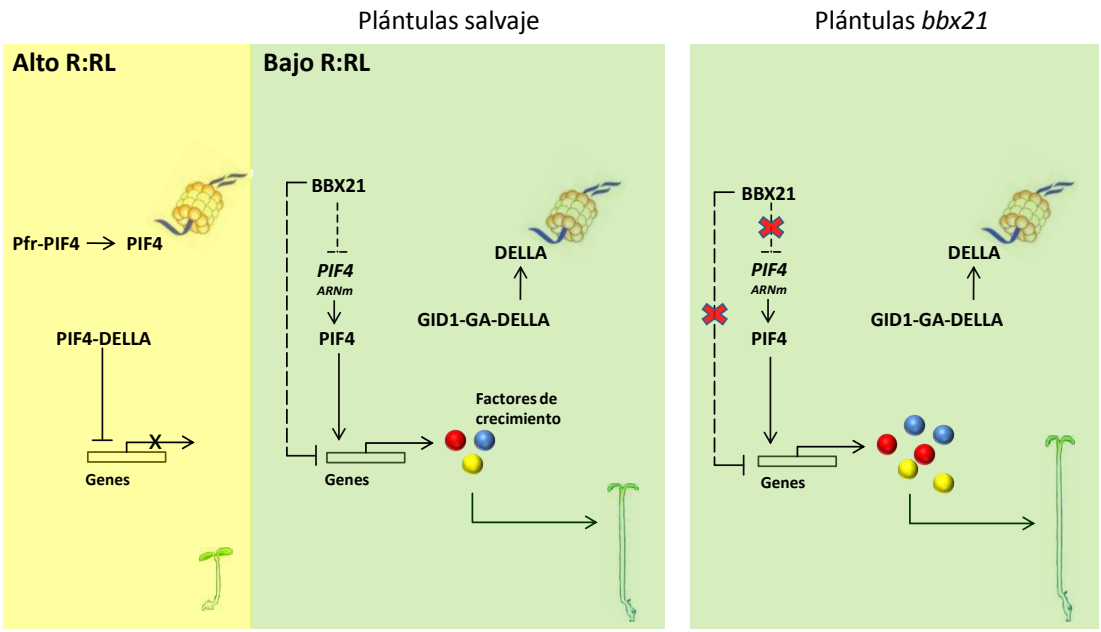


Diagrama 1 – Posible mecanismo de acción de BBX21 en sombra prolongada

El diagrama muestra las formas de regulación del transcripto *PIF4* y de la proteína PIF4 en plántulas salvajes que se desarrollan en condiciones de alta (fondo amarillo) o baja relaciones R:RL (fondo verde). Este mecanismo muestra como, en altas relaciones R:RL, PIF4 es regulado a nivel proteico por la interacción PIF4-DELLA y es conducido a la degradación por la interacción Pfr-PIF4, impidiendo así la activación de los genes que codifican para factores de crecimiento. Luego de que la plántula percibe el sombreado (baja R:RL), el phyB se fotoconvierte a su forma Pr, el complejo GA-GID1 promueve la degradación de las DELLA vía proteosoma, aumentan los niveles proteicos de PIF4 libre en el núcleo y se promueve la expresión de los genes que codifican para factores de crecimiento. Cuando la sombra es prolongada se establecería un mecanismo de regulación negativa provocando una disminución en la tasa de elongación del hipocotilo. En este mecanismo BBX21 reprimiría la transcripción de *PIF4*, generando una abundancia menor de PIF4 en el núcleo y una menor activación de los genes que codifican factores del crecimiento. BBX21 también podría regular la expresión de estos genes por una vía independiente a la de PIF4. Si BBX21 está ausente (*plántulas bbx21*), el transcripto *PIF4* es elevado, se produce una mayor síntesis *de novo* de PIF4, se genera una abundancia mayor de esta proteína en el núcleo, los niveles de expresión de los genes se mantienen más alto de lo normal, la elongación no se regula y se produce un crecimiento exagerado del hipocotilo. Las líneas sólidas (—) muestran las vías de señalización demostradas, mientras que las líneas punteadas (---) muestran las vías de señalización sugeridas.

Las proteínas BBX presentan roles antagónicos en la respuestas de escape al sombreado.

Mediante la caracterización fisiológica de plántulas simples mutantes del grupo estructural IV, se demostró que BBX18, BBX19, BBX21, BBX22 y BBX24 participan en la respuesta de escape al sombreado con roles fisiológicos antagónicos. BBX18 y BBX24 actúan como reguladores positivos, donde su función es la de promover el crecimiento del hipocotilo cuando las plántulas crecen en ambientes de baja relación R:RL (Figura 4b). Por otro lado, BBX19, BBX21 y BBX22 actúan como reguladores negativos, cuya función es la de controlar que no se produzca una respuesta exagerada del alargamiento del hipocotilo en condiciones de sombra prolongada. También se evidenció la existencia de una aditividad funcional entre BBX21 y BBX22 en la regulación de la elongación del hipocotilo en respuesta a la sombra. Datta et al. (2008) demostró que tanto BBX21 como BBX22 tienen la capacidad de activar *in vitro* la transcripción del gen que codifica para la Chalcona Isomerasa (CHS) de forma aditiva e independiente. Esto sugiere que BBX21 y BBX22 podrían modular el crecimiento del hipocotilo regulando de forma diferencial a un mismo grupo de genes. La acción aditiva entre BBX21 y BBX22 en la sombra se ve reflejada fenotípicamente con un hipocotilo más largo en las plántulas *bbx21bbx22* al compararlas con los simples mutantes *bbx21* y *bbx22*.

Los niveles de expresión de los genes *BBX18, BBX19, BBX21, BBX22* y *BBX24* en plántulas que se crecen bajo canopeo o sombra simulada, se correlacionan con los datos fenotípicos obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales. Un aumento de los transcriptos *BBX19, BBX21* y *BBX22* es promovido por el canopeo y por la sombra. Por otra parte, la condición de canopeo o sombra simulada produce una disminución en los niveles de expresión de los genes *BBX18* y *BBX24* con respecto al tratamiento control (Figura 5).

En el capítulo I de esta tesis se ha demostrado el rol fisiológico, genético y molecular del regulador negativo BBX21 sobre el alargamiento del hipocotilo promovido por las bajas relaciones R:RL. Para comprender el mecanismo molecular por el cual las BBX actúan en esta respuesta, es necesario entender el rol genético y molecular de las proteínas BBX que actúan como reguladores positivos. Por tal motivo, el capítulo II de esta tesis se centró en la caracterización funcional de BBX24 en las respuestas de escape al sombreado.

MATERIAL SUPLEMENTARIO I

Figura S1-I. Longitud del hipocotilo de las diferentes líneas mutantes en oscuridad. Longitud del hipocotilo de plántulas creciendo en oscuridad contínua durante 5 días. (a) Se evaluó plántulas de los genotipos salvajes (Col, Ler), los mutantes simples *bbx21-101* y *bbx21-2*, 2 líneas independientes de RNAi (BBX21_RNAi1 y 2), 2 líneas independientes sobreexpresantes en el fondo genético col (*BBX21ox*_Col1 y 2) y 2 líneas independientes sobreexpresantes en el fondo genético ler (*BBX21ox_Ler1* y 2). (b) Se evaluó plántulas del genotipo col, *bbx18-2, bbx19-1, bbx21-1, bbx22-1, bbx24-1, bbx25-2* y el doble mutante *bbx21bbx22*.

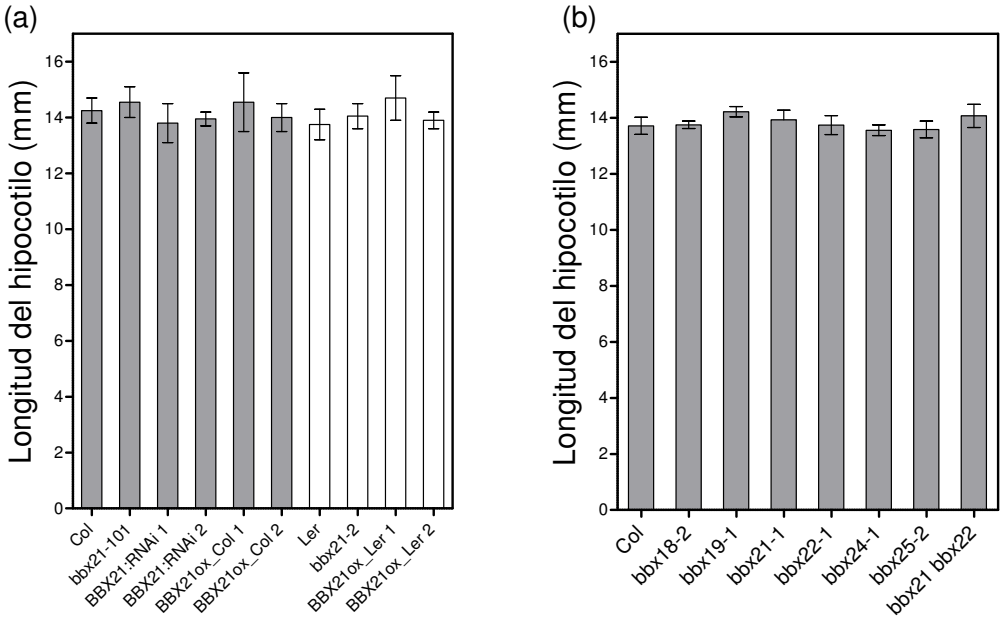


Tabla S1-I. Genes regulados por BBX21 en la condición de canopeo. Esta tabla muestra los genes que corresponden al grupo 1 (146 genes) y al grupo 2 (59 genes) cuya expresión se encuentra regulada por BBX21 exclusivamente en la condición de canopeo. Affy ID, es la identificación para cada sonda asociada a uno o más locis asignada por Affymetrix. AGI ID (*Arabidopsis* gene loci number) es el número de identificación de cada loci de *Arabidopsis thaliana* asignado por el TAIR (The Arabidopsis Information Resource).

Grupo Nº	Affy ID	AGI ID	Ler Luz solar (1)	Ler Luz solar (2)	*bbx21* Luz solar (1)	*bbx21* Luz solar (2)	Ler Canopeo (1)	Ler Canopeo (2)	*bbx21* Canopeo (1)	*bbx21* canopeo (2)	*bbx21*_canop / Ler_canop
GRUPO 1	257172_at	At3g23700	316	266	224	381	539	454	680	611	**1,30**
	266460_at	At2g47930	63	57	72	66	166	177	235	211	**1,30**
	256061_at	At1g07040	165	144	153	141	379	362	467	498	**1,30**
	254221_at	At4g23820	372	418	502	473	557	579	727	754	**1,30**
	247601_at	At5g60850	256	290	213	305	406	407	546	514	**1,30**
	259789_at	At1g29395	87	159	111	140	492	405	588	582	**1,30**
	252591_at	At3g45600	359	396	330	321	546	502	660	708	**1,31**
	251575_at	At3g58120	187	139	136	165	210	190	255	269	**1,31**
	257351_at	At2g33820	55	38	35	30	64	68	93	80	**1,31**
	246595_at	At5g14780	462	504	348	706	1132	1184	1364	1678	**1,31**
	266495_at	At2g07050	410	410	351	321	578	551	662	821	**1,31**
	252950_at	At4g38690	308	273	254	327	506	498	643	676	**1,31**
	250109_at	At5g15230	890	938	1037	1044	1186	1161	1388	1697	**1,31**
	264482_at	At1g77210	41	34	34	19	111	67	124	110	**1,31**
	247729_at	At5g59530	37	39	13	20	89	85	86	143	**1,32**
	251788_at	At3g55420	50	52	50	40	60	60	73	85	**1,32**
	262813_at	At1g11670	150	155	116	113	194	168	234	243	**1,32**
	264513_at	At1g09420	175	200	130	167	224	212	305	270	**1,32**
	250690_at	At5g06530	175	176	131	184	383	369	516	476	**1,32**
	256786_at	At3g13740	57	64	44	51	120	111	135	170	**1,32**
	255478_at	At4g02440	124	125	123	117	167	160	220	212	**1,32**
	248177_at	At5g54630	137	127	113	159	217	172	242	272	**1,32**
	251688_at	At3g56480	71	57	74	57	87	93	124	114	**1,32**

251739_at	At3g56170	213	218	145	142	273	334	396	407	**1,32**
263726_at	At2g13610	62	57	64	62	93	89	127	114	**1,32**
263669_at	At1g04400	526	501	436	578	638	627	814	864	**1,33**
258196_at	At3g13980	146	189	245	242	256	289	348	375	**1,33**
264280_at	At1g61820	317	335	245	257	430	377	498	573	**1,33**
254743_at	At4g13420	704	1070	540	576	1268	1311	1517	1912	**1,33**
265248_at	At2g43010	122	82	142	164	186	152	213	237	**1,33**
250356_at	At5g11710	235	252	210	187	274	325	385	415	**1,34**
245637_at	At1g25230	371	238	112	255	999	839	1089	1368	**1,34**
248962_at	At5g45680	86	118	86	101	228	181	252	295	**1,34**
251314_at	At3g61180	151	162	114	149	274	190	296	326	**1,34**
259523_at	At1g12500	101	135	95	78	143	197	226	230	**1,34**
254998_at	At4g09760	57	49	73	72	72	98	109	119	**1,34**
244960_at	AtCg01020	837	634	557	637	1161	842	1333	1354	**1,34**
258245_at	At3g29075	62	65	32	41	80	98	126	113	**1,34**
267238_at	At2g44130	76	77	67	89	300	212	293	395	**1,34**
264445_at	At1g27290	370	207	105	166	558	474	676	711	**1,34**
263499_at	At2g42580	118	106	107	86	163	130	203	191	**1,34**
256415_at	At3g11210	41	46	49	50	46	58	67	73	**1,35**
258742_at	At3g05800	28	34	31	40	61	69	97	79	**1,35**
266156_at	At2g28110	131	137	64	99	161	189	248	228	**1,36**
256589_at	At3g28740	332	219	428	460	802	726	1004	1076	**1,36**
265481_at	At2g15960	172	165	96	152	600	456	589	850	**1,36**
251899_at	At3g54400	438	457	592	780	680	858	1057	1039	**1,36**
254015_at	At4g26140	69	68	49	55	75	71	102	97	**1,36**
248014_at	At5g56340	81	97	76	92	106	127	150	168	**1,36**
267080_at	At2g41190	41	41	51	61	136	174	221	203	**1,37**
248828_at	At5g47110	332	286	339	501	552	801	939	917	**1,37**
259080_at	At3g04910	267	321	281	336	463	400	562	622	**1,37**
261772_at	At1g76240	373	335	438	399	417	494	669	581	**1,37**
248162_at	At5g54500	410	395	314	351	811	973	1229	1236	**1,38**
262456_at	At1g11260	494	394	409	623	1627	1230	1905	2048	**1,38**
258322_at	At3g22740	16	21	26	31	60	66	72	103	**1,39**
247596_at	At5g60840	62	73	66	49	82	84	106	126	**1,40**
250665_at	At5g06980	344	346	204	295	444	489	707	602	**1,40**
246703_at	At5g28080	29	38	27	31	63	51	72	89	**1,41**
258421_at	At3g16690	59	57	49	44	128	141	213	167	**1,41**
250662_at	At5g07010	116	120	107	112	301	347	391	525	**1,41**
249109_at	At5g43700	239	237	137	179	419	288	475	525	**1,41**
247793_at	At5g58650	132	133	100	120	238	216	303	343	**1,42**

250412_at	At5g11150	46	34	56	38	78	59	91	104	**1,42**
255854_at	At1g67050	79	76	68	66	86	91	129	123	**1,42**
246213_at	At4g36480	123	115	108	115	141	161	214	216	**1,42**
251395_at	At2g45470	442	376	634	392	865	845	1271	1167	**1,43**
266215_at	At2g06850	2140	2397	2324	3013	3222	3494	4499	5086	**1,43**
248140_at	At5g54980	82	42	91	80	126	113	183	159	**1,43**
254573_at	At4g19420	68	72	73	67	150	102	165	196	**1,43**
248283_at	At5g52920	350	292	491	416	524	652	841	844	**1,43**
266688_at	At2g19660	22	15	16	12	38	40	58	54	**1,44**
253165_at	At4g35320	76	82	58	55	93	151	168	183	**1,44**
248793_at	At5g47240	216	277	262	216	424	309	525	531	**1,44**
247878_at	At5g57760	33	31	33	47	115	96	140	164	**1,44**
248224_at	At5g53490	181	153	137	185	431	440	647	611	**1,44**
260097_at	At1g73220	205	158	231	214	536	702	782	1013	**1,45**
262421_at	At1g50290	143	121	106	100	332	274	454	432	**1,46**
250437_at	At5g10430	335	261	388	303	491	522	755	727	**1,46**
264770_at	At1g23030	223	237	160	170	256	257	356	395	**1,46**
253597_at	At4g30690	96	92	44	80	202	147	248	263	**1,46**
258774_at	At3g10740	263	243	256	362	494	582	753	831	**1,47**
248968_at	At5g45280	170	123	200	118	228	222	340	323	**1,47**
249242_at	At5g42250	187	210	143	144	256	239	350	382	**1,48**
261822_at	At1g11380	92	71	65	92	152	115	190	206	**1,48**
259312_at	At3g05200	218	194	174	168	255	250	331	419	**1,49**
252557_at	At3g45960	25	24	22	34	42	34	58	55	**1,49**
260541_at	At2g43530	99	98	76	77	108	91	149	147	**1,49**
248681_at	At5g48900	270	352	384	389	360	419	579	580	**1,49**
258527_at	At3g06850	154	135	137	176	450	270	510	565	**1,49**
249383_at	At5g39860	26	29	20	28	35	33	47	55	**1,50**
253454_at	At4g31875	29	28	4	21	54	58	77	91	**1,50**
253629_at	At4g30450	128	106	127	124	216	145	286	258	**1,51**
252606_at	At3g45010	348	336	408	446	368	386	551	589	**1,51**
245264_at	At4g17245	210	169	129	172	279	269	402	427	**1,51**
264343_at	At1g11850	36	25	36	43	40	56	76	70	**1,52**
267254_at	At2g23030	21	27	20	20	33	36	52	53	**1,52**
258091_at	At3g14560	95	110	121	133	147	136	204	227	**1,52**
247884_at	At5g57800	349	324	400	382	408	442	624	674	**1,53**
265245_at	At2g43060	111	133	71	53	227	235	309	398	**1,53**
259373_at	At1g69160	226	189	175	219	254	276	431	382	**1,53**
248879_at	At5g46180	81	96	86	89	100	100	137	171	**1,54**
267230_at	At2g44080	285	192	194	183	308	332	455	536	**1,55**

259839_at	At1g52190	377	356	457	459	617	679	961	1047	**1,55**
251352_at	At3g61070	338	365	288	339	402	513	695	726	**1,55**
264342_at	At1g12080	377	250	201	288	684	639	927	1131	**1,56**
261032_at	At1g17430	55	52	38	30	80	62	105	117	**1,56**
259830_at	At1g80630	33	30	20	22	43	42	62	72	**1,58**
257690_at	At3g12830	40	32	24	11	55	43	81	74	**1,58**
264424_at	At1g61740	131	147	164	159	227	226	315	404	**1,59**
261957_at	At1g64660	67	78	90	115	167	193	259	313	**1,59**
260129_at	At1g36380	173	146	89	101	195	163	282	290	**1,60**
248749_at	At5g47880	106	89	120	136	108	153	200	219	**1,61**
256548_at	At3g14770	78	88	60	58	145	144	252	213	**1,61**
267035_at	At2g38400	240	275	214	239	749	729	1026	1355	**1,61**
254564_at	At4g19170	266	178	288	255	353	304	578	481	**1,61**
249234_at	At5g42200	42	48	31	49	73	67	124	102	**1,61**
248736_at	At5g48110	30	21	21	22	68	82	112	131	**1,62**
259751_at	At1g71030	945	751	698	1162	1592	1238	2126	2475	**1,63**
254572_at	At4g19380	18	6	15	17	49	51	79	84	**1,63**
260527_at	At2g47270	41	62	25	39	78	88	117	155	**1,64**
263231_at	At1g05680	44	46	43	44	69	53	98	102	**1,64**
248790_at	At5g47450	265	185	219	212	721	657	1150	1130	**1,65**
256725_at	At2g34070	137	157	198	187	241	245	350	459	**1,66**
248684_at	At5g48485	406	415	222	443	517	542	870	900	**1,67**
258323_at	At3g22750	60	62	33	54	67	67	120	104	**1,67**
247266_at	At5g64570	130	113	159	264	456	303	605	669	**1,68**
265560_at	At2g05520	538	634	777	1200	887	1041	1581	1660	**1,68**
257071_at	At3g28180	206	195	217	156	352	223	461	514	**1,70**
252250_at	At3g49790	76	28	24	56	175	114	205	292	**1,72**
265427_at	At2g20740	107	151	87	103	165	154	284	271	**1,74**
251358_at	At3g61160	30	30	23	21	58	54	95	101	**1,75**
254304_at	At4g22270	57	49	44	35	78	131	175	192	**1,76**
261226_at	At1g20190	81	116	112	99	211	203	369	361	**1,76**
249101_at	At5g43580	187	158	131	135	228	227	418	396	**1,79**
262001_at	At1g33790	18	18	22	50	56	46	103	81	**1,80**
246238_at	At4g36670	20	20	18	7	80	45	96	130	**1,81**
249097_at	At5g43520	19	16	14	5	72	51	90	138	**1,85**
255648_at	At4g00910	17	21	16	23	51	51	76	114	**1,86**
263046_at	At2g05380	148	187	71	167	1179	647	1638	1824	**1,90**
267472_at	At2g02850	125	158	96	82	160	171	320	309	**1,90**
260668_at	At1g19530	47	31	12	45	193	133	278	342	**1,90**
265246_at	At2g43050	285	213	511	407	631	507	1006	1216	**1,95**

	267265_at	At2g22980	115	92	68	163	386	209	604	579	**1,99**
	248208_at	At5g53980	14	19	14	12	95	53	160	186	**2,34**
	253437_at	At4g32460	138	118	173	311	221	245	549	576	**2,41**
GRUPO 2	246855_at	At5g26280	199	183	121	115	175	148	204	222	**1,32**
	251283_at	At3g61790	149	127	135	123	139	160	192	203	**1,32**
	267268_at	At2g02570	197	223	187	183	210	191	256	275	**1,32**
	253780_at	At4g28400	239	235	132	123	148	188	217	229	**1,33**
	263908_at	At2g36480	75	68	43	54	72	83	99	107	**1,33**
	256066_at	At1g06980	80	89	33	24	77	122	127	138	**1,33**
	246611_at	At5g35330	97	101	94	100	84	96	119	121	**1,33**
	245987_at	At5g13180	875	791	954	900	907	875	1276	1107	**1,34**
	245045_at	At2g26590	241	215	247	220	239	241	311	332	**1,34**
	254417_at	At4g21470	246	286	170	210	246	258	325	352	**1,34**
	260360_at	At1g69370	81	71	64	63	75	72	97	101	**1,35**
	251426_at	At3g60180	78	92	27	34	72	70	89	104	**1,36**
	246233_at	At4g36550	49	48	52	43	49	56	70	73	**1,36**
	255037_at	At4g09460	132	117	129	118	133	129	169	188	**1,36**
	259012_at	At3g07360	281	261	182	187	189	240	302	285	**1,37**
	252867_at	At4g39870	62	65	58	59	51	59	75	76	**1,37**
	254812_at	At4g12250	60	63	34	31	50	57	76	72	**1,38**
	253035_at	At4g38240	95	86	61	79	88	99	121	139	**1,39**
	252915_at	At4g38810	165	163	127	121	147	175	247	202	**1,39**
	251890_at	At3g54220	139	154	119	106	129	140	196	185	**1,42**
	264264_at	At1g09250	156	137	126	121	134	183	234	219	**1,43**
	247150_at	At5g65650	80	79	77	73	76	70	107	103	**1,44**
	259847_at	At1g72170	133	126	81	74	135	115	170	191	**1,44**
	251860_at	At3g54660	329	373	372	313	373	383	582	516	**1,45**
	248262_at	At5g53340	108	89	92	91	98	109	156	148	**1,47**
	252423_at	At3g47590	72	59	40	30	53	49	73	77	**1,47**
	265023_at	At1g24440	210	236	125	174	250	209	318	367	**1,49**
	251706_at	At3g56620	124	127	116	94	108	110	155	171	**1,50**
	250617_at	At5g07290	101	107	97	105	88	100	145	141	**1,52**
	255951_at	At1g22050	92	116	101	98	97	114	166	155	**1,52**
	263786_at	At2g46370	385	375	343	300	330	405	570	549	**1,52**
	254223_at	At4g23730	100	91	82	83	80	109	144	148	**1,54**
	248564_at	At5g49700	151	121	80	58	122	116	182	187	**1,55**
	260057_at	At1g78200	109	132	68	85	107	99	148	175	**1,57**
	263834_at	At2g40316	76	94	83	61	79	80	127	123	**1,57**
	267442_at	At2g19080	126	115	122	106	107	113	187	159	**1,57**
	252121_at	At3g51160	258	374	205	155	341	410	642	543	**1,58**

	249537_at	At5g38830	152	170	154	168	149	139	242	219	**1,60**
	259638_at	At1g52360	121	156	74	82	93	87	154	135	**1,61**
	250764_at	At5g05960	195	189	239	194	230	336	443	466	**1,61**
	250175_at	At5g14390	55	64	57	41	53	52	88	81	**1,61**
	254402_at	At4g21310	42	45	28	40	38	39	62	63	**1,62**
	265866_at	At2g01710	87	80	86	70	71	79	115	130	**1,63**
	261273_at	At1g26650	63	62	64	57	79	67	135	104	**1,64**
	248502_at	At5g50450	42	45	30	28	34	44	59	69	**1,64**
	263673_at	At2g04800	52	54	33	39	39	48	65	79	**1,66**
	256022_at	At1g58360	253	275	252	244	199	254	384	377	**1,68**
	248811_at	At5g47310	129	106	137	123	121	147	238	219	**1,71**
	251818_at	At3g54860	154	153	106	110	126	136	246	202	**1,71**
	256443_at	At3g10960	76	93	41	57	62	57	105	99	**1,71**
	250728_at	At5g06440	90	102	65	50	84	64	124	135	**1,75**
	245186_at	At1g67710	32	39	47	33	39	38	76	63	**1,81**
	260551_at	At2g43510	118	233	140	215	214	230	423	472	**2,02**
	248923_at	At5g45940	32	30	32	26	34	29	60	70	**2,06**
	254562_at	At4g19230	35	48	60	42	41	63	109	107	**2,08**
	260921_at	At1g21540	16	24	9	1	24	21	56	40	**2,13**
	264307_at	At1g61900	152	183	183	193	196	129	377	342	**2,21**
	253289_at	At4g34320	44	49	32	38	30	46	76	96	**2,26**
	250891_at	At5g04530	176	199	201	123	181	213	459	645	**2,80**

CAPÍTULO II

ROL DE BBX24 EN LAS RESPUESTAS DE ESCAPE AL SOMBREADO

2. RESULTADOS CAPÍTULO II

2.1 Caracterización fisiológica de líneas mutantes *bbx24* en las respuestas de escape al sombreado

El objetivo general de este punto es caracterizar diferentes alelos mutantes *bbx24* en la respuesta del alargamiento del hipocotilo cuando las plántulas crecen en ambientes con baja relación R:RL. Todas las caracterizaciones fisiológicas de los mutantes *bbx24* fueron realizadas bajo condiciones controladas de laboratorio simulando un canopeo con disminución de radiación y calidad de luz (canopeo simulado) o simulando la presencia de plantas vecinas por disminución sólo de la relación R:RL (sombra simulada). Dada la alta similitud de las secuencias proteicas entre BBX24 y BBX25 (Khanna et al., 2009), fueron incluidos dentro de la caracterización fenotípica a los mutantes *bbx25* y dobles mutantes *bbx24bbx25*, con el fin de esclarecer si existe una relación genética entre BBX24 y BBX25 en la regulación de la respuesta de escape al sombreado. Para la caracterización fisiológica contamos con dos líneas de inserción de T-DNA independientes que interrumpen la correcta expresión del gen *BBX24* (*bbx24-1 y bbx24-2*) y dos líneas mutantes independientes para el gen *BBX25* (*bbx25-2 y bbx25-1*). Las líneas mutantes *bbx24-1* y *bbx25-2* se encuentran en fondo genético Col, mientras que las líneas mutantes *bbx24-2* y *bbx25-1* se encuentran en fondo genético Wassilewskija (Ws). También evaluamos la respuesta de elongación en los dobles mutantes *bbx24-1 bbx25-2* y *bbx24-2 bbx25-1*. En la caracterización fisiológica también fue incluida la línea *BBX24ox* que sobre-expresa constitutivamente al gen *BBX24* en el fondo genético Col. La Figura 12a muestra la longitud del hipocotilo de las líneas mutantes cuando crecen en condiciones de canopeo simulado y luz blanca. En la condición de canopeo, las plántulas mutantes *bbx24* y *bbx25* son significativamente más petisas al compararlas con sus respectivos genotipos salvajes, Col o Ws (Figura 12a). También se observó que los dobles mutantes *bbx24bbx25* son algo más petisos que sus correspondientes simples *bbx24* y *bbx25* cuando crecen en canopeo simulado ($P \leq 0.05$) (Figura 12a). Por otra parte, las plántulas sobre-expresantes *BBX24ox*

son significativamente más altas que las plántulas salvajes Col tanto en luz blanca como en canopeo simulado (Figura 12a). Como vimos en el capítulo I, en la condición de canopeo simulado se produce una reducción de la irradiancia total y una disminución en la relación R:RL con respecto al tratamiento control de luz blanca. Para determinar si el fenotipo de las plántulas mutantes se debe a la disminución de la relación R:RL, se llevó a cabo la caracterización de estas líneas en la condición de sombra simulada. Bajo condiciones de sombra simulada, los hipocotilos de las plántulas mutantes *bbx24-1, bbx24-2* resultaron ser significativamente más petisos y las *BBX24ox* más altos que sus correspondientes controles, pero las plántulas mutantes *bbx25-2 y bbx25-1* no presentan un hipocotilo significativamente distinto al de las plántulas salvajes (Figura 12b). Sin embargo, los dobles mutantes *bbx24-1bbx25-2 y bbx24-2bbx25-1* presentaron un hipocotilo más corto que el de los mutantes simples *bbx24-1 y bbx24-2* (P≤0.05, Figura 12b). Los controles de oscuridad muestran que no hay diferencias significativas entre los hipocotilos de las diferentes líneas utilizadas (Figura S1-II). Estos resultados indican que BBX24 promueve la elongación del hipocotilo en plántulas cultivadas en ambientes con baja relación R:RL y que BBX25, en ausencia de BBX24, cumpliría un rol complementario en esta respuesta.

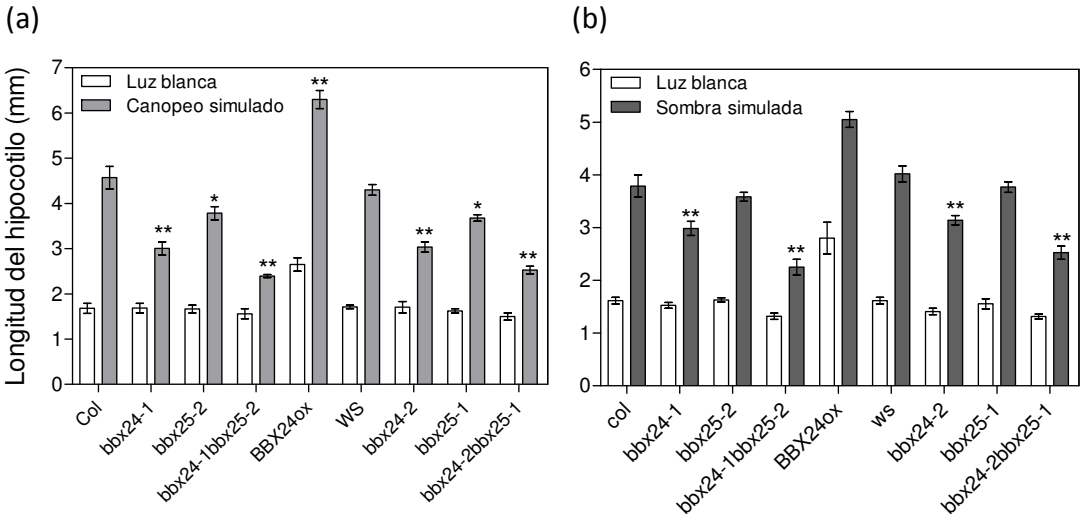


Figura 12. BBX24 es un regulador positivo del alargamiento del hipocotilo en canopeo y sombra simulada. Largo del hipocotilo en plántulas de los genotipos salvajes col y ws, los simples mutantes *bbx24-1*, *bbx24-2, bbx25-1, bbx25-2*, los dobles mutantes *bbx24-1 bbx25-2, bbx24-2 bbx25-1* y sobre-expresante *BBX24ox*. Las plántulas crecieron bajo condiciones de luz blanca y canopeo simulado (a) o sombra simulada (b). (** P≤0,01, *P≤0,05)

2.2 Interacción genética entre BBX24, BBX25 y COP1 en la respuesta de escape al sombreado

En el capítulo I demostramos que BBX21 y BBX22 interaccionan genéticamente junto a COP1 en la regulación del crecimiento del hipocotilo promovido por bajas relaciones R:RL. A partir de evidencias previas que demuestran la interacción física de BBX24 y BBX25 con COP1 (Holm et al., 2001; Yan et al., 2012), nos intereso conocer si existe algún tipo de interacción genética entre estas BBX y COP1 en la respuesta de elongación del hipocotilo promovida por las bajas relaciones de luz R:RL. Para contestarnos esta pregunta se midió el largo del hipocotilo de plántulas doble mutante *bbx24-1cop1-6, bbx25-2cop1-6*, el triple *bbx24-1bbx25-2cop1-6* y el alelo mutante *cop1-6* bajo condiciones de canopeo simulado y sombra simulada. Bajo las mismas condiciones experimentales, se evaluó al simple mutante *cop1-4* y al doble *bbx24-1cop1-4*. En la condición de sombra simulada, las plántulas *cop1-4 y cop1-6* presentan suprimida totalmente la elongación de sus hipocotilos (Figura 13a). El triple mutante *bbx24-1bbx25-2cop1-6* presenta un hipocotilo significativamente más corto que el hipocotilo del alelo *cop1-6*, pero esta respuesta también se observa en la condición de luz blanca (Figura 13a). Al evaluar las mismas líneas en la condición de canopeo simulado, se observó que las plántulas *cop1-4* y *cop1-6* responden a la condición de canopeo promoviendo levemente el alargamiento de sus hipocotilos (Figura 13b). Sin embargo, las plántulas *bbx24cop1-4 y bbx24cop1-6* no responden al canopeo y presentan una longitud del hipocotilo igual para luz blanca y canopeo. Esto demuestra que las plántulas *bbx24cop1* presentan suprimida totalmente la elongación del hipocotilo en respuesta al canopeo simulado (Figura 13b). En las plántulas triples mutantes *bbx24bbx25cop1-6* esta respuesta también se hace evidente (Figura 13a, b). Estos resultados indicarían que BBX24 actúa rio abajo de COP1 en la regulación del hipocotilo promovida por las bajas relaciones R:RL. Sin embargo, BBX24 podría promover la elongación del hipocotilo por una vía diferente a la de COP1, la cual estaría regulada por otras condiciones lumínicas, diferentes a la relación R:RL, que se establecen en el canopeo.

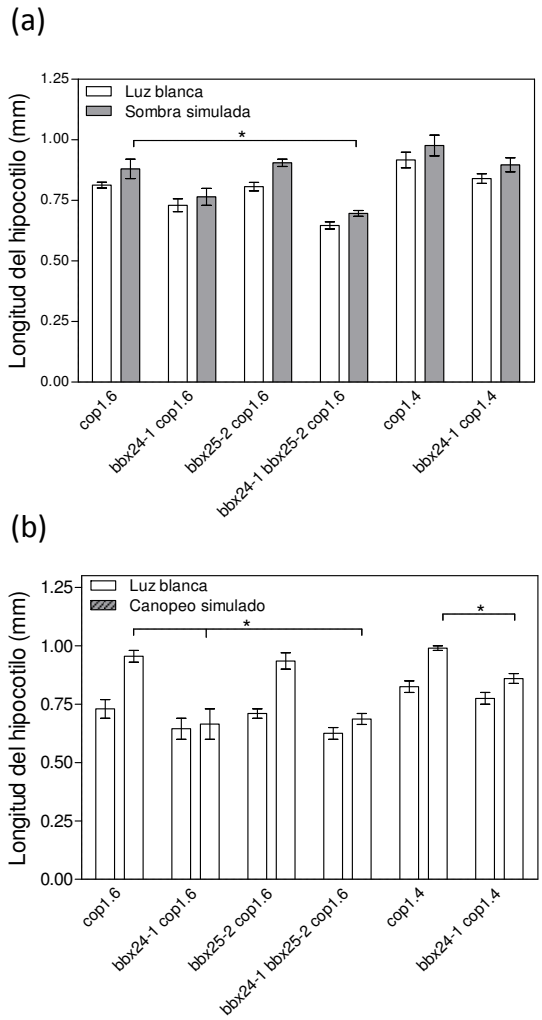


Figura 13. Interacción genética de BBX24 y BBX25 con COP1 en la respuesta de escape al sombreado. Longitud del hipocotilo en plántulas mutantes *cop1.4, cop1.6*, los dobles mutantes *bbx24-1 cop1-6, bbx25-2cop1-6, bbx24-1cop1*-4 y el triple mutante *bbx24-1bbx25-2cop1-6* en (a) sombra simulada o (b) canopeo simulado). (*P≤0,01)

2.3 Caracterización molecular de BBX24 en las respuestas tempranas inducidas por la sombra

Con el fin de analizar si la expresión de *BBX24* es rápidamente modulada por los cambios de la relación R:RL, se cuantificó la expresión de *BBX24* en plántulas salvajes expuestas a 1 hora de sombra simulada. La Figura 14 muestra que una hora de sombra simulada alcanza para disminuir significativamente los valores de expresión del gen *BBX24*, indicando que *BBX24* es reprimido temprana y rápidamente por baja relación R:RL (Figura 14). Ha sido

demostrado que COP1 suprime la expresión de *BBX24* al comienzo del día (Indorf et al., 2007). Para comprobar si COP1 interviene en la disminución del transcripto *BBX24* durante la primera hora de sombreado, se evaluaron los niveles de expresión de *BBX24* en plántulas mutantes *cop1-4*. Se observó que los niveles de expresión de *BBX24* aumentan en las plántulas *cop1-4* en respuesta a 1 hora de sombra (Figura 14). Esto indicaría que COP1 regula negativa y rápidamente la expresión de *BBX24* en ambientes sombreados. .

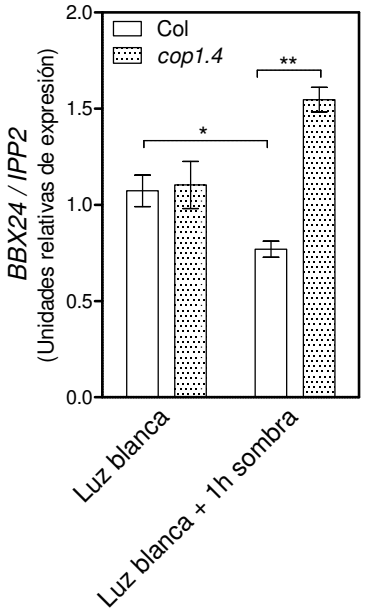


Figura 14. La expresión de *BBX24* es regulada rápidamente por bajas relaciones R:RL.
Niveles de expresión del gen *BBX24* en plantas del genotipo salvaje Col que crecieron durante 5 días en luz blanca o en luz blanca terminada con una 1hora de sombra simulada el último día antes de ser cosechadas. El valor de expresión de *BBX24* se encuentra relativo a la expresión del gen *IPP2* utilizado como control de carga. (*P≤0,01), (**P≤0,005).

Dado que la expresión de *BBX24* es regulada rápidamente por la sombra, en este punto se evaluó si BBX24 interviene en la regulación temprana de genes marcadores de sombra como *HFR1*, *PAR1*, *ATHB4* y *PIL1*. Para ello, las plántulas del genotipo salvaje (Col), del mutante simple *bbx24-1* y del sobre-expresante *BBX24ox* crecieron bajo condiciones de luz blanca sin (control) o con suplemento de una hora de sombra simulada antes de ser cosechadas las muestras. En el genotipo salvaje, una hora de sombra simulada promovió los niveles de expresión de los genes *HFR1*, *PAR1*, *ATHB4 y PIL1* (Figura 15). Al exponer las

plántulas *bbx24-1* a una hora de sombreado, se observó que la expresión de *PIL1* se encuentra significativamente disminuida con respecto al genotipo Col, mientas que en las plántulas *BBX24ox* se encuentra significativamente aumentada (Figura 15). Para los genes *HFR1*, *PAR1* y *ATHB4* no se observaron diferencias en sus niveles de expresión al comparar las líneas mutantes y salvajes en el tratamiento de 1 hora de sombra simulada (Figura 15). Estos datos demuestran que BBX24 sólo promueve positivamente la expresión temprana de *PIL1* en respuesta a la sombra

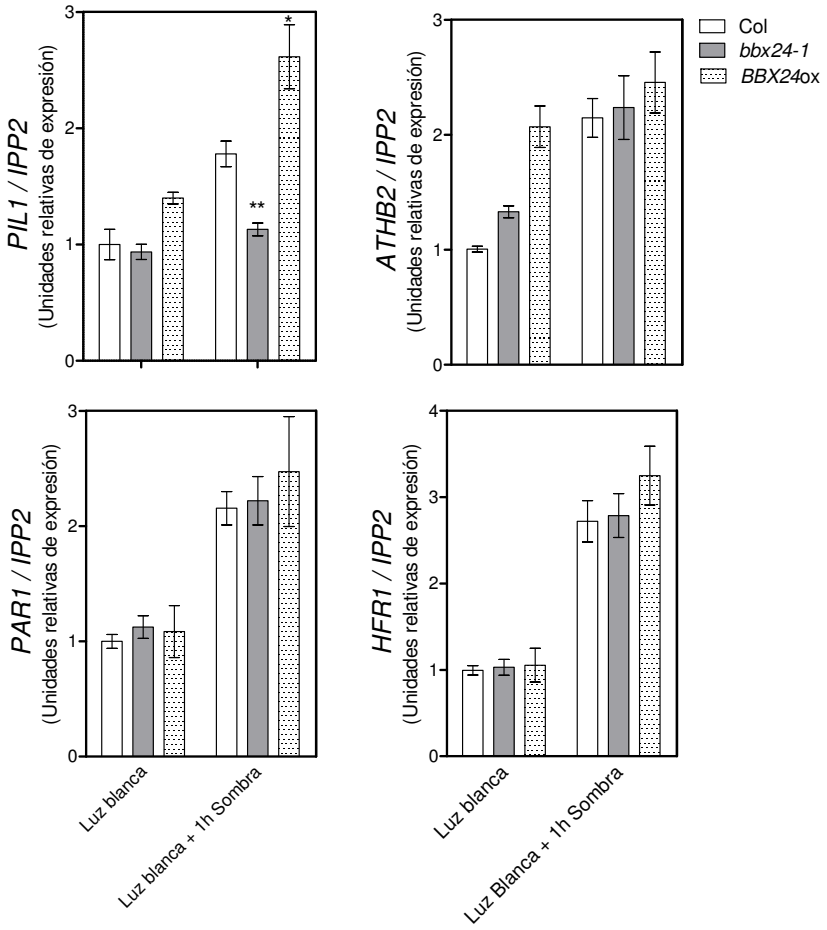


Figura 15. Rol de BBX24 en la expresión temprana de los genes *PAR.*
Niveles de expresión de los genes *PIL1, HFR1, PAR1 y ATHB4* en plántulas mutante *bbx24-1*, sobre-expresantes *BBX24ox* y plántulas salvajes col que crecieron durante 5 días en luz blanca o en luz blanca terminada con una 1 hora de sombra simulada el último día antes de ser cosechadas. Los niveles de expresión de cada gen se encuentran relativizados a los niveles de expresión del gen *IPP2* utilizado como control de carga. (*P≤0,01), (**P≤0,005)

2.4 Análisis del transcriptoma de plántulas mutantes *bbx24* en ambientes sombreados

Para comprender mejor el mecanismo por el cual BBX24 participa en las respuestas de escape al sombreado, se analizó el perfil de expresión en plántulas mutantes *bbx24-1* y plántulas salvajes (Col). Los microarreglos se realizaron por duplicado y las muestras fueron extraídas de plántulas que crecieron durante 5 días bajo condiciones de luz blanca (alta relación R:RL) o sombra simulada (baja relación R:RL). Del análisis estadístico, se obtuvieron 1255 genes que presentaron cambios significativos en sus niveles de expresión ($P \leq 0.05$, ver materiales y métodos). Posteriormente, fueron seleccionados aquellos genes cuyos valores de expresión cambian al menos 1.3 veces entre el genotipo *bbx24* y el genotipo Col, obteniendo así un grupo de 432 genes donde 84 son regulados por BBX24 en la condición de luz blanca, 299 son regulados por BBX24 en condiciones de sombreado (efecto tratamiento) y 49 son regulados indistintamente a los cambios de la calidad de luz (efecto genotipo) (Figura 16a; Material suplementario TablaS1-II). Utilizando solo los 299 genes regulados por BBX24 exclusivamente en sombra, realizamos una clasificación funcional, un agrupamiento por patrones de expresión y un análisis sobre la representación de elementos en cis de los promotores de estos genes. En el análisis de clasificación funcional se utilizó la herramienta Classification SuperViewer (Provart y Zhu, 2003), donde se observó que este grupo de genes se encuentra significativamente sobre-representado en componentes que intervienen en actividades de transporte, metabolismo de hormonas, metabolitos secundarios y respuestas a estrés, mientras que esta sub-representado en genes vinculados a la actividad de unión al ADN (Figura 16b).

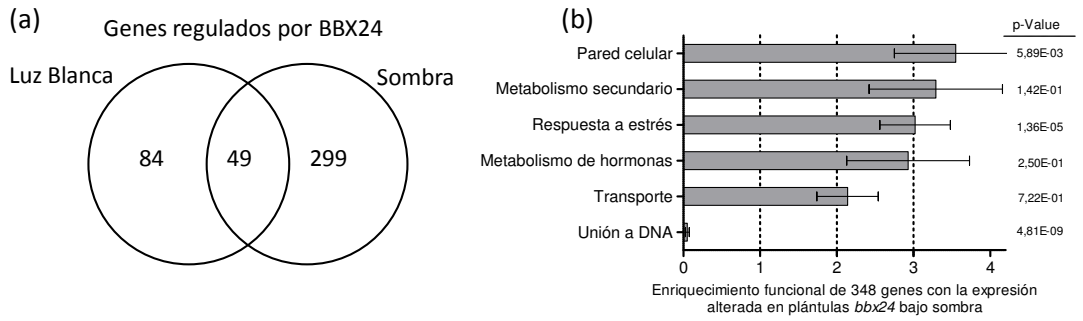


Figura 16. Genes regulados por BBX24. (a) Diagrama de Venn con el número de genes que son regulados por BBX24 en el tratamiento de luz blanca (84), sombra (299) o aquellos que son regulados independientemente de la condición lumínica (49). (b) Enriquecimiento funcional de los 299 genes que presentaron la expresión significativamente alterada en plántulas *bbx24* en sombrea simulada. Cada asociación se encuentra determinada por un valor de significancia (pValue).

Los genes clasificados por su actividad de factor de transcripción o componente vinculado a la señalización o metabolismo de hormonas fueron seleccionados para realizar un análisis de agrupamiento por niveles de expresión utilizando el programa dCHIP (ver materiales y métodos). Este análisis reveló que un grupo importante de los 299 genes de sombra asociados a la acción de BBX24, además de compartir una misma clasificación funcional, comparten un patrón similar de expresión (Figura 17a). Dentro de estas tres categorías, nos resultó particularmente interesante la alteración en los niveles de expresión de genes que codifican para enzimas implicadas en la vía de síntesis de las giberelinas (*GA2OX1* y *GA2OX2*). También se observa alterada la expresión de un grupo importante de genes que intervienen en la vía de señalización de las auxinas durante la respuesta de escape al sombreado (*IAA19*, *IAA29*, *GH3.3*, *SAUR68*) y genes que participan en la biosíntesis del etileno (*ACC2* y *ACC* oxidasa). Los datos obtenidos de los microarreglos fueron validados utilizando qRT-PCR, donde se cuantificó los cambios en la expresión de tres genes (*ELF4, SAUR68* y *ACC2*). Los niveles de expresión del gen *ELF4, SAUR68* y *ACC2* mostraron el mismo patrón de expresión obtenido en los microarreglos (Figura 17b) indicando que la información obtenida a partir del análisis del transcriptoma es de buena calidad.

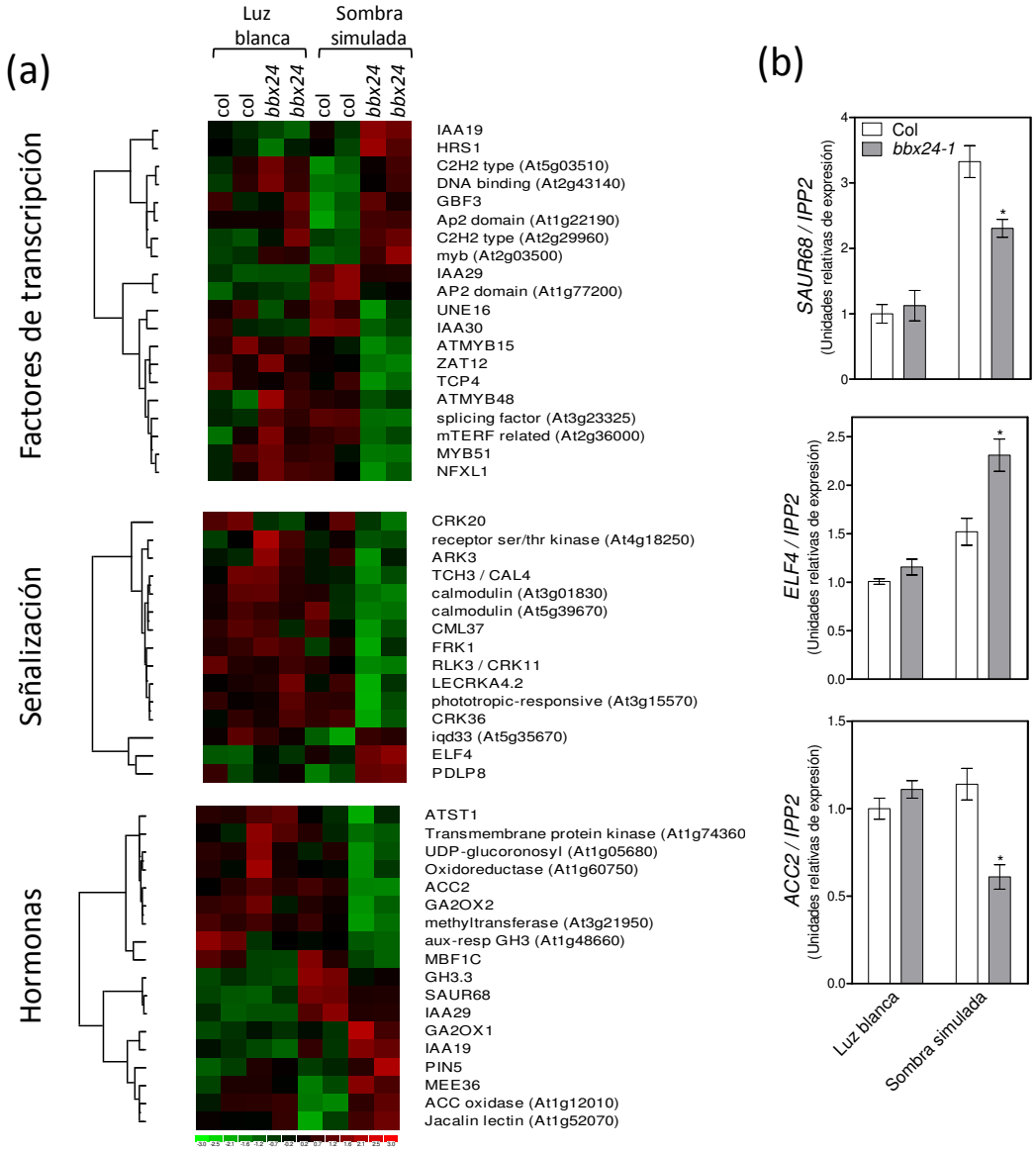


Figura 17. Grupos de expresión de los genes regulados por *BBX24* en sombra simulada

(a) Los genes fueron seleccionados por su actividad de factor de transcripción, señalización o en el metabolismo de hormonas. Los valores de expresión fueron agrupados por patrones de expresión en común mediante el programa dCHIP. (b) Corroboración de los microarreglos. Medición del gen *SAUR8, ELF4* y *ACC2* mediante qRT-PCR. Los valores fueron relativizados a los niveles de expresión del gen *IPP2* utilizado como control de carga. (*P≤0,01)

Por último, se evaluó si existe algún tipo de elemento en cis que se encuentre sobre-representado entre los promotores de los 299 genes regulados por BBX24. Se utilizaron 2 bases de datos que contienen secuencias en cis que han sido caracterizadas y publicadas como responsables de la regulación transcripcional en genes de plantas (AGRIS y PLACEmotif). Utilizando la herramienta Promomer (Bio-Array Resource) se identificó la presencia de cada elemento en cis dentro de las secuencias promotoras de los 299 genes. Resultaron sobre-representados los elementos en cis de dos secuencias que han sido caracterizadas como elementos centrales de respuestas a giberelinas (GARE, 95 y 71 genes) (Tabla 1). Adicionalmente, 71 genes (24%) contienen elementos de respuesta a auxinas (ARF), 65 genes (21%) contienen regiones promotoras de genes regulados por luz (I-BOX), 56 genes (19%) contienen elementos G-box, 49 genes (16%) sitios de unión de CCA1 y 36 genes (13%) una secuencia sobre-representada en genes que son inducidos por luz (SORLIP) (Tabla 1).

Elemento	Secuencia	Función	Representados (%)	Referencias
GARE	TAACAAA	Central element of gibberellin (GA) response complex (GARC)	32	Gubler et al., 1992
ARF	TGTCTC	Auxin-response elements(AuxREs)	24	Ulmasov et al., 1999
GARE	CAACTC	Central element of gibberellin (GA) response complex (GARC)	23	Gubler et al., 1992
I-BOX	GATAAG	Light-regulated gene	22	Giuliano et al., 1988
G-box	CACGTG	Binding site of Arabidopsis GBF4	19	Menkens et al., 1994
CCA1	AA(A/C)AATCT	Binding site of *CCA1*	16	Wang et al., 1997
SORLIP1	AGCCAC	Sequences Over-Represented in Light-Induced Promoters	13	Hudson et al., 2003

Tabla 1. Elementos en cis sobre-representados en los genes regulados por BBX24 en ambientes con baja relación R:RL. La tabla indica la nomenclatura del elemento, la secuencia caracterizada, la función descripta, el porcentaje (%) de los 299 representados para cada elemento y la referencia correspondiente para cada región regulatoria.

2.5 Regulación hormonal del crecimiento del hipocotilo en plántulas mutantes *bbx24*

Se ha demostrado que las auxinas (AUX), giberelinas (GA), brasinosteroides (BRS) y etileno (ET) promueven la elongación celular durante las respuestas de escape al sombreado, siendo las AUX y GA las que presentan un mayor efecto. El agregado exógeno de estas hormonas promueve la elongación del hipocotilo, mientras que el agregado exógeno de inhibidores de la síntesis o transporte de estas hormonas causan una disminución de la elongación (Smalle et al., 1997; Sawa et al., 2002; Devlin et al., 2003; Vandenbussche et al., 2003; Roig- Villanova et al., 2007).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos del análisis del transcriptoma, hipotetizamos que las plántulas mutantes *bbx24* podrían tener alterada la síntesis, transporte o señalización de las GA y/o AUX cuando son cultivadas en ambientes con baja relación R:RL. Se investigó el rol de las GA y AUX utilizando un inhibidor de la síntesis de GA, el paclobutrazol (PAC), y un inhibidor del transporte polar de AUX, el naptalam (NPA). Se medió el largo del hipocotilo de plántulas mutantes *bbx24-1, bbx24-2* y sus respectivos controles de plántulas salvajes (Col y Ws) que crecieron bajo condiciones de luz blanca o canopeo simulado sobre un medio suplementado con alguno de los dos inhibidores. Al inhibir la síntesis de GA endógenas, se observó que la respuesta de elongación del hipocotilo en las plántulas salvajes disminuye considerablemente en respuesta al canopeo simulado (Figura 18a). Aún así, elongan más en el canopeo que en el tratamiento control de luz blanca, debido a que otras hormonas que se activan en respuesta al canopeo no están siendo inhibidas y promueven el alargamiento celular. Al evaluar el efecto del PAC sobre el alargamiento del hipocotilo en plántulas *bbx24-1 y bbx24-2*, se observó que en condiciones de canopeo estas presentaron la misma longitud de hipocotilo que las plántulas Col y Ws respectivamente (Figura 18a). Esto demuestra que frente a la inhibición de la síntesis de GA endógena, las plántulas *bbx24* presentan la misma capacidad de respuesta de elongación que las plántulas salvajes bajo el canopeo. Al evaluar el efecto del NPA sobre la elongación del hipocotilo, se observó que las plántulas mutantes *bbx24-1* y *bbx24-2* pierden toda la respuesta de elongación en el tratamiento de canopeo simulado al ser comparadas con las plántulas Col y Ws (Figura 18b). Estos resultados sugieren que la

disminución en la elongación del hipocotilo en los mutantes *bbx24* está dada por una alteración en la síntesis y/o percepción a la GA cuando se desarrollan en ambientes con baja relación R:RL.

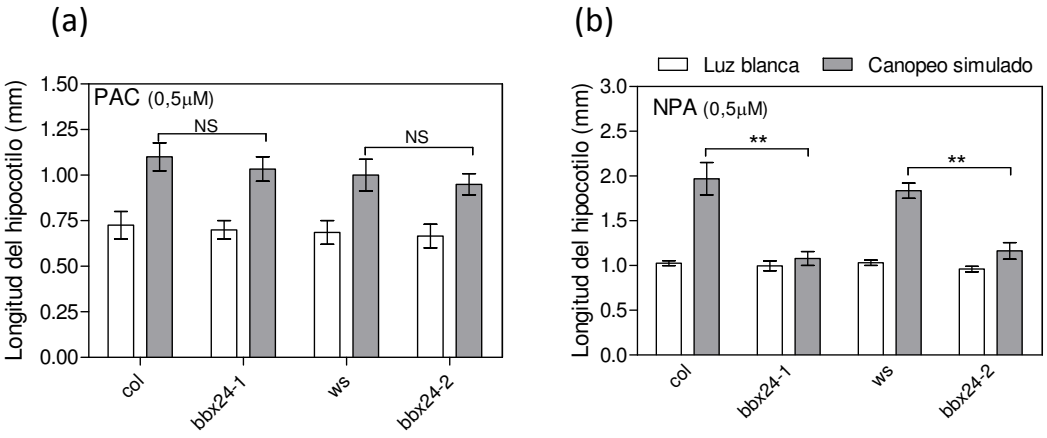


Figura 18. Inhibición de las GA y AUX durante la respuesta de escape al sombreado. Longitud del hipocotilo en plántulas mutantes *bbx24-1, bbx24-2*, Col y Ws *que* crecieron bajo condiciones de luz blanca o canopeo simulado sobre un medio suplementado con (a) PAC (inhibidor de la síntesis de GA) o con (b) NPA (inhibidor transporte polar de AUX). (**P≤0,005). NS: diferencias no significativa entre los hipocotilos señalados.

2.6 Síntesis y percepción a las giberelinas en plántulas mutantes *bbx24*

Para investigar si la síntesis y/o percepción de las GA se encuentran alteradas en las plántulas *bbx24* cuando crecen bajo canopeo, se evaluó el alargamiento del hipocotilo de plántulas con el agregado exógeno de GA3 (GA sintética). La GA3 es una GA activa que se utiliza comúnmente para evaluar el efecto de dicha hormona sobre el alargamiento del hipocotilo (Feng at al., 2008). Se medió el largo del hipocotilo de plántulas mutantes *bbx24-1, bbx24-2, BBX24ox*, y plántulas salvajes (Col y Ws) crecidas en luz blanca o canopeo simulado, sobre un medio de cultivo sin hormona (tratamiento control) o suplementado con 5µM de GA3. La concentración 5µM de GA3 es la concentración óptima para el alargamiento del hipocotilo del genotipo Col. La primera observación es que la GA3

promovió el crecimiento del hipocotilo en plántulas salvajes y mutantes independientemente del tratamiento lumínico, pero con una respuesta diferenciada entre los genotipos (Figura 19a). Las plántulas *bbx24-1* y *bbx24-2* respondieron en mayor medida al GA3 en la condición de canopeo, donde ser observó que la longitud del hipocotilo de las plántulas mutantes *bbx24-1 y bbx24-2* no presentan diferencias significativas al compararlas con sus respectivos genotipos salvajes (Figura 19a), es decir la GA3 restaura el fenotipo alterado de las plántulas mutantes *bbx24* (Figura 19a). Para evaluar el efecto de la GA3 sobre la tasa de crecimiento de los hipocotilos, se realizó una curva de respuesta suplementando al medio de cultivo con 0 (control), 0.5, 1 o 5µM de GA3. Se midió la longitud de los hipocotilos de las plántulas *bbx24-1, bbx24-2,* Col y Ws que crecieron en luz blanca o canopeo simulado (Figura S2-II). Con esta información se estimó el crecimiento relativo para cada concentración de GA3 con respecto al tratamiento control sin hormona en la condición de canopeo simulado (Figura 19b). A concentraciones sub-saturantes de GA3 (0.5 y 1µM) no se observaron diferencias significativas entre las plántulas *bbx24-1* y *bbx24-2* al compararlos con sus respectivos controles. Sin embargo, para la concentración mayor de GA3 (5µM) se observaron diferencias significativas entre la respuesta de los mutantes *bbx24* y sus respectivos controles, donde las plántulas *bbx24-1* y *bbx24-2* responden a esta concentración de GA3 con un tasa de elongación mayor del hipocotilo que el de las plántula salvajes ($p \leq 0,01$) (Figura 19b). Estos resultados sugieren que las plántulas que no expresan BBX24, presentan una mayor respuesta a las GA que las plántulas salvajes en estas condiciones experimentales. Debido a que el experimento fue diseñado sin inhibir la síntesis de GA endógenas, desconocemos si las diferencias observadas entre genotipos son debidas a distintos niveles hormonales o a cambios de sensibilidad a la hormona.

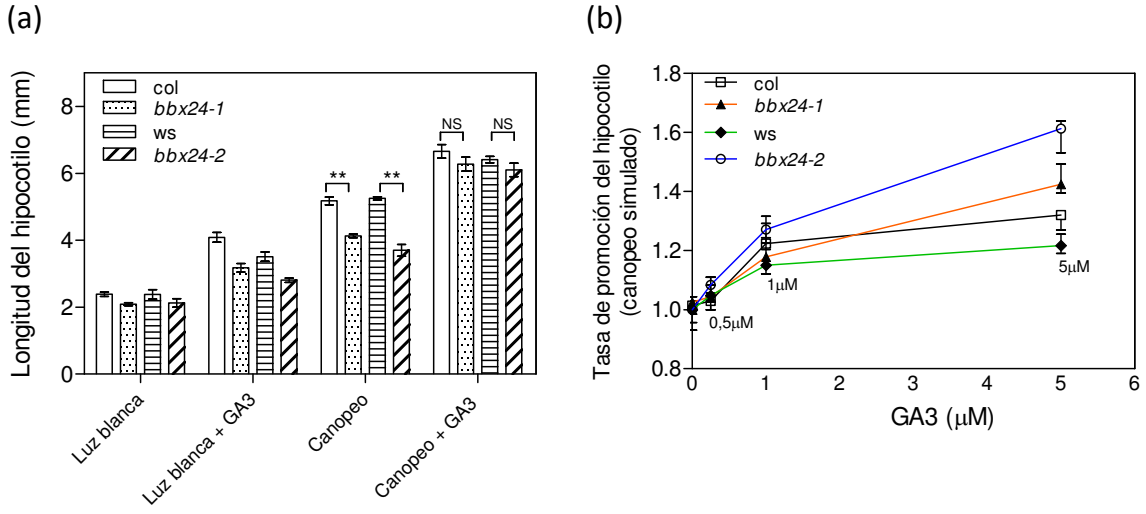


Figura 19. Respuesta al agregado exógeno de GA sobre la elongación de los hipocotilos. (a) Longitud del hipocotilo en plántulas mutantes *bbx24-1, bbx24-2*, Col y Ws *que* crecieron bajo condiciones de luz blanca o sombra simulada sobre un medio sin suplemento (0,8⁄ agar:agua) o suplementado con 5µM de GA3 (GA sintética). (b) Tasa de elongación de los hipocotilos obtenidas para las distintas concentraciones de GA3 utilizadas con respecto al tratamiento control sin GA3 para la condición de canopeo simulado (**P≤0,005). NS: diferencias no significativa entre los hipocotilos señalados.

Para independizarnos de los niveles de GA endógenos se diseñó otro experimento adicionando PAC (inhibidor síntesis GA) y GA3 (5µM) en el medio. A igual nivel de GA exógena, la longitud del hipocotilo de los mutantes *bbx24-1* y *bbx24-2* no presenta diferencias significativas al compararlos con sus correspondientes genotipos salvajes (Figura 20). Estos resultados sugieren que la percepción de GA no se encuentra alterada en las plántulas *bbx24.* Este resultado junto con el rescate del fenotipo en los mutantes *bbx24* con GA3 (5µM) (Figura 20a), sugiere que la proteína BBX24 intervendría sobre la vía de síntesis de GA durante la respuesta de escape al sombreado.

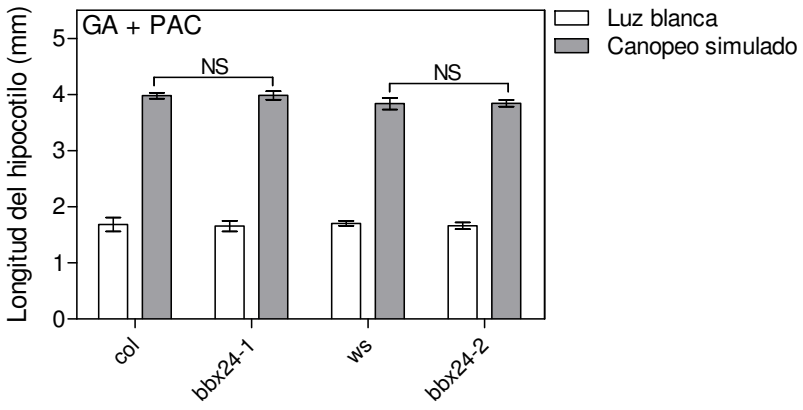


Figura 20. Percepción de GA en las plántulas mutantes bbx24. Longitud del hipocotilo en plántulas mutantes *bbx24-1, bbx24-2*, Col y Ws que crecieron bajo condiciones de luz blanca o canopeo simulado sobre un medio suplementado con 5µM de GA3 (GA sintética) + 0.5µM de PAC (inhibidor de síntesis de GA). NS: diferencias no significativa entre los hipocotilos señalados.

Al evaluar la respuesta del largo del hipocotilo con el agregado exógeno de picloram (AUX sintética), 24-epibrassinolide (BRS sintético) o ACC (Etileno), todos a concentraciones óptimas, se observó que estas hormonas no tienen la capacidad de restaurar el fenotipo mutante que presentan las plántulas *bbx24* cuando crecen en canopeo simulado (Figura S3-II). Estos datos indican que BBX24 promueve el crecimiento del hipocotilo, en respuesta a la baja relación R:RL, actuando por una vía hormonal distinta a las auxinas, brasinosteroides y etileno.

2-7 BBX24 regula la expresión de genes que intervienen en la biosíntesis de las giberelinas

En los microarreglos realizados con *bbx24-1* y Col, se observó que algunos genes que participan en el catabolismo y metabolismo de las GA presentan alterada su expresión. Para tener una idea más clara de la acción de BBX24 sobre la expresión de transcriptos del metabolismo de las GA, se midieron genes que intervienen en la vía metabólica (*GA20ox y GA3ox*) y catabólica (*GA2ox*) de las GA en plántulas del genotipo Col y *bbx24-1* que

crecieron en condiciones de luz blanca o sombra simulada. Los niveles de expresión de los genes *GA2OX1* y *GA3OX1* resultaron ser significativamente mayores en las plántulas *bbx24-1* que en las plántulas Col cuando crecen en sombra simulada (Figura 21). Los genes *GA20OX2 y GA2OX2* presentaron valores de expresión significativamente más bajos en el genotipo mutante *bbx24-1* que en el genotipo salvaje bajo la condición de sombra simulada (Figura 21). Estos resultados demuestran que BBX24 regula la expresión de algunos genes que intervienen en el catabolismo y metabolismo de las GA, y sugiere que la concentración de GA activas podría estar alterada en las plántulas mutantes *bbx24* que crecen en ambientes enriquecidos con bajas relaciones R:RL.

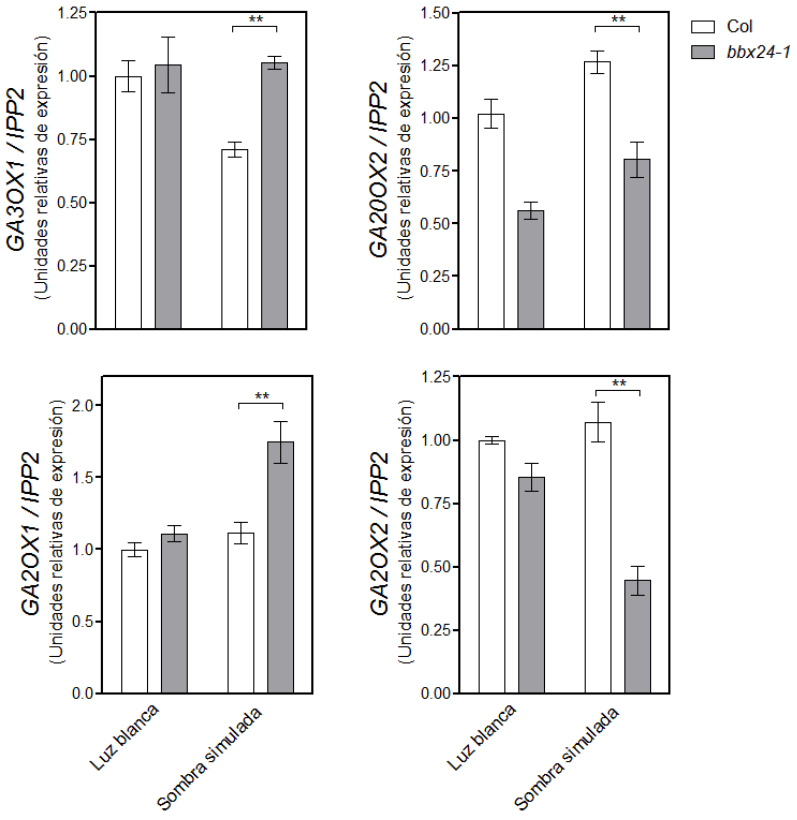


Figura 21. BBX24 regula genes de síntesis y catabolismo de las giberelinas en las respuestas de escape al sombreado. Se midieron los genes *GA3OX1*, *GA2OX1*, *GA20OX2* y *GA2OX2* en plántulas salvajes col y mutantes *bbx24-1* que crecieron bajo condiciones de luz blanca o sombra simulada. Los niveles de expresión están relativizados con al control de carga del gen *IPP2*. (**P≤0,005)

2.8 BBX24 interacciona genéticamente con PIF4 en la respuesta de escape al sombreado.

En ambientes con bajas relaciones R:RL, PIF4 promueve la elongación celular luego de la inactivación de las proteínas DELLA, una familia de proteínas represoras del crecimiento, por las GA (Djakovic-Petrovic et al., 2007). Las plántulas mutantes *pif4* presentan una fuerte supresión de la elongación del hipocotilo en respuesta a la sombra (Lorrain et al., 2008), similar al fenotipo observado en los mutantes *bbx24*. A través del doble mutante *bbx24-1 pif4-101* se evaluó el tipo de interacción genética que existe entre BBX24 y PIF4 en ambientes con bajas relaciones R:RL. Se medió el largo del hipocotilo de plántulas mutantes *bbx24-1, pif4-101, bbx24-1pif4-101* y Col que crecieron en luz blanca o sombra simulada. Bajo estas condiciones experimentales, las plántulas *pif4-101* y *bbx24-1* presentaron disminuida la respuesta de elongación a la sombra con respecto al genotipo salvaje (Figura 22). La longitud del hipocotilo de las plántulas *bbx24-1pif4-101* no presentó diferencias significativas al compararlo con los simples *bbx24-4* y *pif4-101* en sombra simulada (Figura 22). Esto indica la existencia de una relación epistática entre BBX24 y PIF4 en la promoción del crecimiento del hipocotilo que es promovido por las bajas relaciones R:RL.

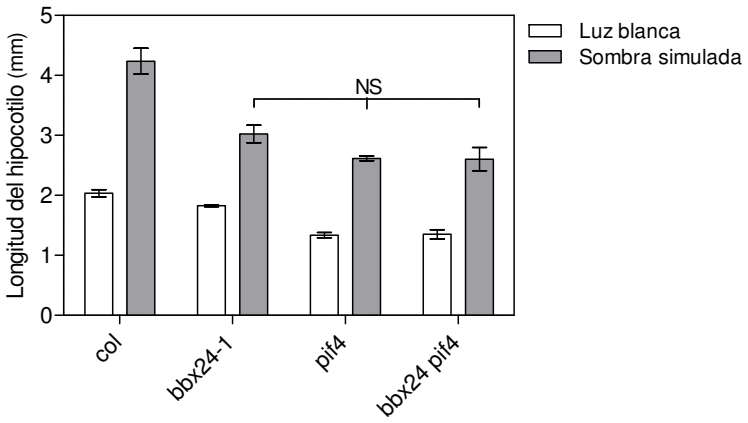


Figura 22. Relación genética entre BBX24 y PIF4 en la respuesta de escape al sombreado. Longitud del hipocotilo en plántulas mutantes *bbx24-1, pif4-101*, el doble mutante *bbx24-1 pif4-101* y el genotipo salvaje (Col) en plántulas crecidas bajo condiciones de luz blanca o sombra simulada. NS: diferencias no significativa entre los hipocotilos señalados.

2.9 Interacción genética entre BBX24 y BBX21 en la regulación del crecimiento del hipocotilo en respuesta a la sombra

En este punto se evaluó si BBX24 y BBX21 participan en la misma vía de señalización modulando el alargamiento del hipocotilo durante las respuestas de escape al sombreado. Bajo tratamientos de sombra y canopeo simulado, se midió la longitud del hipocotilo en plántulas dobles *bbx21-1bbx24-1*, simples *bbx21-1* y *bbx24-1* y las plántulas salvajes Col. Los hipocotilos de las plántulas *bbx21-1bbx24-1* son significativamente más altos que el simple *bbx24-1*, pero significativamente más bajos que el mutante *bbx21-1*, tanto en la condición de sombra simulada (Figura 23a) como en canopeo simulado (Figura23b). En la condición de luz blanca (Figura 23a, b) y en el control de oscuridad (Figura S3-II) la longitud de los hipocotilos no presentan diferencias significativas entre los diferentes genotipos. Estos datos indican que no existe una relación genética de epistasis entre BBX24 y BBX21, motivo por el cual no participarían en la misma vía de señalización que interviene en la regulación del crecimiento del hipocotilo promovido por la baja relación R:RL.

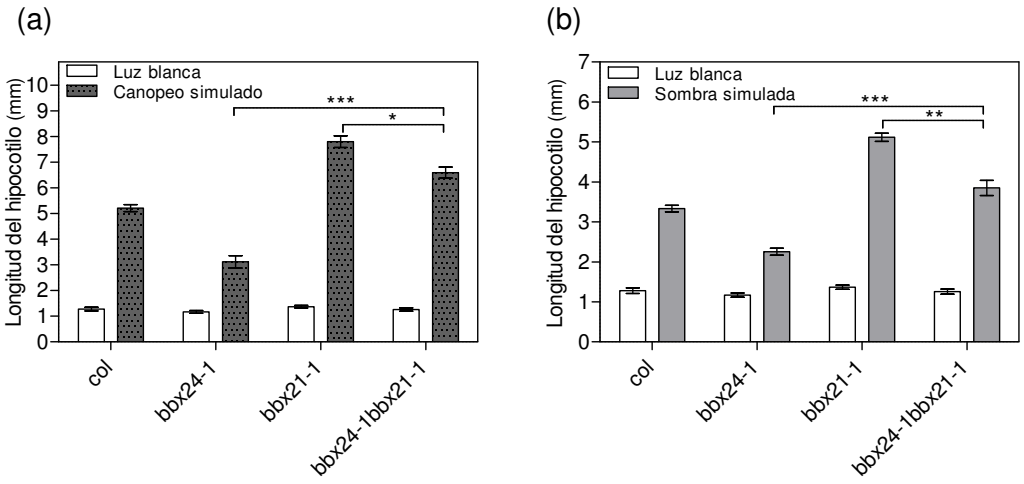


Figura 23. Relación genética entre BBX24 y BBX21 en la respuesta de escape al sombreado. Longitud del hipocotilo en plántulas mutantes *bbx21-1, bbx24-1,* del doble mutante *bbx21-1 bbx24-1* y el genotipo salvaje Col que crecieron bajo luz blanca y (a) sombra simulada o (b) canopeo simulado. (*P≤0,01) (**P≤0,005) (***P≤0,001).

DISCUSIÓN CAPITULO II

BBX24 es un regulador positivo de la respuesta de escape al sombreado

Cuando las plantas crecen en una condición de canopeo, las respuestas de escape al sombreado están determinadas por múltiples señales lumínicas (Ballaré et al., 2000). Bajo esta condición se producen cambios en la cantidad (disminución de la irradiancia) y en la calidad de luz que llega a las plántulas. La calidad se ve afectada por una disminución de fotones de R y azul y por un incremento relativo de fotones de RL. Se demostró que una disminución de la luz azul, que ocurre cuando la densidad de plantas es mayor, produce en las plantas cambios fenotípicos similares a los observados en aquellas plantas que crecen en ambientes con baja relación R:RL (Pierik et al., 2004; Keller et al., 2011). Por ejemplo, la depleción o disminución de la luz azul incidente promueve el crecimiento del hipocotilo en plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Sellaro et al., 2010; Keuskamp et al., 2011). A diferencia de la situación de canopeo, en la condición de sombra simulada solo se produce una disminución en la relación del R:RL. Esto se da por un incremento relativo de luz RL que llega a las plántulas en sentido horizontal, condición que simula la presencia de plantas vecinas. En los experimentos realizados en el marco de esta tesis se demostró que los mutantes *bbx24-1* y *bbx24-2* presentan disminuida la elongación de los hipocotilos cuando crecen en ambientes con bajas relaciones R:RL (Figura 12b). Esta información demuestra que BBX24 actúa como regulador positivo de la promoción del hipocotilo durante las respuestas de escape al sombreado disparadas por una disminución de la relación R:RL. Los mutantes *bbx25-1* y *bbx25-2* no presentan una alteración en el crecimiento del hipocotilo cuando crecen bajo sombra simulada, pero si en la condición de canopeo simulado (Figura 12a, b). Estos resultados sugieren que BBX25 podría integrar otras señales lumínicas características del canopeo, como la disminución de la luz azul o la irradiancia total. Sin embargo, las plántulas del doble mutante *bbx24bbx25* resultaron más petisas que el simple mutante *bbx24* cuando crecen en sombra simulada. Esto indicaría que si BBX24 está activo, BBX25 no participaría en la vía de señalización inducida por la baja relación R:RL, pero sí contribuiría en esta respuesta en ausencia de BBX24. Las plántulas sobrexpresantes *BBX24*ox presentaron un fenotipo complementario al de las

plántulas mutantes *bbx24*, siendo su hipocotilo significativamente más alto que el de las plántulas salvajes bajo las condiciones de canopeo y sombra simulada (Figura 12a, b). También fue observado que en luz blanca el hipocotilo de *BBX24ox* es más largo que el hipocotilo de las plántulas salvajes (Figura 12a, b) sugiriendo que la sobre-expresión de BBX24 puede alterar el desarrollo de la plántula en forma independiente a la calidad de luz.

Interacción genética entre BBX24 y COP1 en la respuesta de escape al sombreado

En esta tesis se demostró que los niveles de expresión de *BBX24* son regulados negativamente por las bajas relaciones R:RL, tanto en condiciones de sombra temprana como en condiciones de sombra prolongada (Figura 5, Figura 13). También se demostró que COP1 es fundamental para que se produzca la represión temprana del transcripto BBX24 en ambientes con bajas relaciones R:RL (Figura 13).

Bajo la condición de sombra simulada prolongada, las plántulas mutantes *cop1-4* y *cop1-6* presentaron suprimida toda la respuesta de elongación del hipocotilo (Figura 13a). Al evaluar el fenotipo de los dobles mutantes *bbx24-1cop1-4* y *bbx24-1cop1-6*, no se observaron diferencias significativas en el largo del hipocotilo con respecto a las plántulas *cop1-4* y *cop1-6* (Figura 13a). Esta epistasis genética entre COP1 y BBX24 sugiere que la acción de BBX24 podría estar río abajo de COP1 en la vía de señalización disparada por las bajas relaciones R:RL.

La condición de canopeo simulado, donde no disminuye solo la relación R:RL sino además se reducen los fotones de azul y la irradiancia, promovió marginalmente el alargamiento del hipocotilo en los mutantes *cop1-4* y *cop1-6* con respecto al tratamiento control de luz blanca (Figura 13b). Sin embargo, las plántulas *bbx24-1cop1-4* y *bbx24-1cop1-6* presentaron suprimida completamente la respuesta de elongación del hipocotilo bajo esa condición (Figura 13b). Estos resultados sugieren que BBX24 y COP1 podrían cooperar aditivamente en la elongación del hipocotilo bajo condiciones de canopeo simulado por una vía diferente a la del R:RL. Existen evidencias previas que demuestran que plántulas mutantes *bbx24* presentan alterado el crecimiento del hipocotilo en respuesta a la luz azul

(Indorf et al., 2007). En base a estos resultados proponemos que BBX24 participaría promoviendo la respuesta de elongación del hipocotilo mediante una vía dependiente de COP1, inducida por las bajas relaciones R:RL, y por una vía independiente a COP1, probablemente promovida por la disminución en la luz azul. Nuevos ensayos deberían ser diseñados para poner a prueba esta hipótesis.

Si bien se ha propuesto que COP1 es un modulador central de las respuestas de escape al sombreado (McNellis et al., 1994; Roig-Villanova et al., 2006), aún no existen evidencias causales del mecanismo molecular por el cual COP1 acciona sobre esta respuesta. Teniendo en cuenta las evidencias de la interacción física entre COP1 y BBX24 durante los procesos de des-etiolacion, proponemos que BBX24 podría actuar como un nexo de la acción de COP1 en las respuestas de elongación del hipocotilo promovida por los ambientes con baja relación R:RL (Holm et al., 2001; Jiang et al., 2012).

BBX24 promueve la elongación del hipocotilo en bajas relaciones R:RL a través de las giberelinas

En esta tesis se realizó un análisis del transcriptoma de plántulas mutantes *bbx24* y plántulas salvajes que crecieron bajo condiciones prolongadas de luz blanca y sombra simulada. Se demostró que 299 genes presentan sus niveles de expresión alterados en las plántulas *bbx24* con respecto a las plántulas salvajes exclusivamente en la condición de sombra. Este grupo se encuentra particularmente sobre-representado en genes que intervienen en diferentes vías de síntesis y/o señalización de hormonas vinculadas a la respuesta de escape al sombreado (Figura 16, 17). Adicionalmente, se demostró que el 32% y 24% de estos genes presentan en sus promotores elementos de respuestas a las GA y AUX, respectivamente (Tabla 1). Entre los genes cuya expresión es promovida por BBX24 en sombra se encuentran *IAA19*, *IAA29* y *SAUR68*. Otros trabajos han demostrado que los niveles de los transcriptos de *IAA19, IAA29* y *SAUR68* son rápidamente promovidos por un incremento de la biosíntesis de auxinas y por las bajas relaciones R:RL del ambiente (Sessa et al., 2005; Roig-Villanova et al., 2007; Tao et al., 2008). Adicionalmente, las plántulas mutantes *bbx24* que crecen en sombra simulada presentan alterados los niveles de

expresión de genes que intervienen en la biosíntesis de las GA. Utilizando qRT-PCR demostramos que los niveles de expresión del transcripto *GA2OX1* (gen del catabolismo de las GA) es mayor en las plántulas *bbx24* que en las plántulas salvajes, mientras que el nivel de *GA20OX2* (gen de anabolismo de las GA) esta reducido en el genotipo mutante (Figura 21). Estos resultados sugieren que la síntesis y/o percepción a las AUX y GA están alteradas en las plántulas mutantes *bbx24* que crecen en sombra simulada. Muchos estudios han demostrado que las AUX y GA pueden interaccionar regulando el crecimiento del hipocotilo en plántulas de *Arabidopsis*. Por ejemplo, las AUX regulan la expresión de algunos genes que codifican para enzimas que están involucradas en el metabolismo de GA activa, como los genes *GA20OX, GA3OX* y *GA2OX* (Frigerio et al., 2006; Desgagne-Penix y Sponsel, 2008; O'Neill et al., 2010). A su vez, se demostró que la biosíntesis de GA es requerida para que el crecimiento del hipocotilo pueda ser promovido correctamente por las AUX (Chapman et al., 2012). Esta red de componentes asociados a las vías de síntesis y señalización de GA y AUX dificulta la identificación causal de la hormona/s que son responsables del fenotipo de las plántulas *bbx24* en condiciones de sombra. Las caracterizaciones fisiológicas llevadas a cabo con NPA (inhibidor transporte polar de AUX), PAC (inhibidor síntesis GA), PIC (AUX sintética) y GA3 (GA sintética), sugieren que el mutante *bbx24* tiene alterada la síntesis endógena de GA que reduce su capacidad de responder a las bajas relaciones de luz R:RL. Esto se deduce porque: 1) La inhibición de la síntesis endógena de GA reduce la respuesta a la sombra en las plántulas salvajes a iguales niveles que en las plántulas *bbx24* (Figura 18a) y 2) La adición exógena de GA3 restaura el fenotipo de las plántulas *bbx24* (Figura 19a). Si bien la señalización de las auxinas parece estar alterada en el mutante *bbx24* descartamos un efecto causal de las auxinas sobre el fenotipo de *bbx24* en sombra porque 1) La inhibición del transporte polar de AUX suprime completamente la respuesta de escape al sombreado en las plántulas *bbx24*, mientras que las plántulas salvajes con BBX24 funcional aún son capaces de responder a las señales de sombra (Figura 19b); 2) las plántulas *bbx24* no recuperan la respuesta de elongación con el agregado de auxinas al medio de crecimiento (Figura S1-II). Por lo tanto, la disminución de los transcriptos *IAA19*, *IAA29* y *SAUR68* observado en

las plántulas *bbx24* podría ser explicada por el mecanismo propuesto en el trabajo de Chapman et al. (2012).

BBX24 interacciona genéticamente con PIF4 en la regulación de la respuesta de escape al sombreado.

En esta tesis se demostró que las plántulas mutantes *bbx24* presentan disminuida la respuesta de elongación del hipocotilo promovida principalmente por la baja relación R:RL, mientras que el sobre-expresante *BBX24ox* presenta un fenotipo de hipocotilo alto tanto en luz blanca como en sombra (Figura 12). Otros estudios han demostrado que las plántulas mutantes *pif4* también presentan una respuesta de elongación disminuida, mientras que la sobre-expresión de *PIF4* (*PIF4ox*) causa un fenotipo de hipocotilo constitutivo de respuesta de escape al sombreado (Khanna et al., 2004; Lorrein et al., 2008). Esta similitud entre los fenotipos demuestra que tanto PIF4 como BBX24 actúan como reguladores positivos promoviendo la elongación del hipocotilo bajo sombra, sin embargo se desconocía si estas proteínas intervenían por vías independientes o por una vía de señalización en común para regular esta respuesta. Mediante la caracterización fisiológica del doble mutante *bbx24 pif4* se demostró que BBX24 actúa en la misma vía de señalización que PIF4 para promover la elongación del hipocotilo en ambientes sombreados (Figura 22). Sin embargo, la longitud de los hipocotilos entre el doble *bbx24pif4 y los simples bbx24* y *pif4* no presentaron diferencias significativas entre ellos cuando crecen en sombra simulada. En base a estos resultados fisiológicos, no es posible definir si BBX24 se encuentra rio abajo o rio arriba de la vía de señalización de PIF4. Otras investigaciones han demostró que PIF4 se une específicamente a elementos del tipo G-box de los promotores promoviendo la transcripción de los genes que contienen este tipo de elemento en Cis. Muchos de estos genes codifican para proteínas que intervienen en el crecimiento y desarrollo del hipocotilo (Huq et al., 2002; Sun et al., 2012). Sin embargo, aún no ha sido reportado que BBX24 actúe como factor de transcripción uniéndose a los elementos G-box, lo que sugiere que la acción de BBX24 se encontraría río arriba de PIF4. Una evidencia molecular que soporta este tipo de interacción genética se obtiene del

análisis del transcriptoma de las plántulas *bbx24-1*. De los 299 genes, cuyos niveles de expresión se encuentran alterados en las plántulas *bbx24-1* bajo sombra, 56 genes (19⁄) contienen elementos regulatorios del tipo G-box en su promotor (Tabla 1) y sus niveles de expresión son menores de los esperado (Tabla S1-II). En base a estas evidencias proponemos un modelo por el cual BBX24 regularía la acción de PIF4 durante la respuesta de escape al sombreado.

Posible mecanismo de acción de BBX24 en sombra prolongada

En condiciones lumínicas de alta relación R:RL, PIF4 interacciona físicamente con la forma activa del phyB (Pfr) y como producto de esa interacción la proteína PIF4 es degradada vía proteosoma (Lorrain et al., 2008; Leivar y Quail, 2011). Adicionalmente, las proteínas DELLA (GAI, RGA y RGL1-2-3) interactúan físicamente con PIF4 (Diagrama 2). Esta interacción previene que PIF4 se una a los promotores de sus genes blancos, provocando de esta forma la inhibición del crecimiento del hipocotilo característica de la etapa fotomorfogénica (De Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). Este mecanismo se ve evidenciado en el cuádruple mutante *gai rga rgl-1 rgl-2* donde la proteína PIF4 se encuentra liberada y promueve el crecimiento celular generando un hipocotilo más alto que el del genotipo salvaje en la condición de luz blanca (Djakovic-Petrovic et al., 2007).

En ambientes con baja relación R:RL, la mayor parte del phyB se fotoconvierte a su forma inactiva Pr dejando liberado al PIF4. Los niveles de GA activa se incrementan en la plántula, las GA son reconocidas por el transportador GID1 e ingresan al núcleo en la forma GA-GID1 (Nakajima et al., 2006; Griffiths et al., 2006). Una vez en el núcleo, GA-GID1 interacciona con las DELLA (Diagrama 2). La interacción GA-GID1-DELLA es reconocida por el complejo SCF provocando la marcación de las DELLA que las conducirán a su degradación vía el proteosoma (Fu et al., 2004; De Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Wang y Deng, 2011). El mutante de ganancia de función *gai*, el cual presenta una proteína GAI más estable, presenta una respuesta disminuida a las bajas relaciones R:RL, lo que indica que la degradación de GAI es un requisito para la promoción del crecimiento

del hipocotilo en la sombra (Djakovic-Petrovic et al., 2007). La reducción de los niveles de las DELLA en el núcleo permiten que PIF4 se libere, active la transcripción de genes de crecimiento y se promueva el alargamiento del hipocotilo (Lorrein et al., 2008). Sabiendo que COP1, proteína con actividad ligasa tipo E3 de ubiquitina, interacciona *in vivo* con BBX24 y que las proteínas DELLA son degradadas luego de su ubiquitinización, proponemos que BBX24 sería un posible nodo de interacción entre la proteína COP1 y las proteínas DELLA. En esta interacción, COP1 reconocería al complejo BBX24-DELLA y marcaría (ubiquitinaría) a las DELLA conduciéndolas a su degradación vía el proteosoma. Por lo tanto, la interacción COP1-BBX24-DELLA sería necesaria para que se produzca la desestabilización de las DELLA y así se libere PIF4 dando lugar a un aumento de la expresión de los genes de crecimiento (Diagrama 2). En base a este modelo, en las plántulas mutantes *bbx24* que crecen bajo sombra sucedería lo siguiente: 1) En ausencia de BBX24, las proteínas DELLA no son reconocidas por COP1, por lo tanto no son marcadas y no se produce su degradación por este mecanismo. 2) Al aumentar la estabilidad de las DELLA, la abundancia de PIF4 libre en el núcleo es menor. 3) Al haber menos PIF4 libre, los genes implicados en el crecimiento celular no son totalmente promovidos. 4) Las células del hipocotilo no logran expandirse totalmente y esto provoca un fenotipo de hipocotilo corto en las plántulas *bbx24*, similar al observado en las plántulas mutantes *pif4* bajo la misma condición de sombra. Sin embargo, se ha demostrado que el agregado exógeno de GA3 provoca la restauración del fenotipo de hipocotilo corto del mutante *bbx24* en la sombra. Esto podría deberse a que las plántulas mutantes *bbx24* no sintetizan correctamente las GA en respuesta a la sombra. Por lo tanto, ingresaría menos GA-GID1 al núcleo provocando una interacción menor del tipo GA-GID1-DELLA y el complejo SCF conduciría una menor cantidad de proteína DELLA a su degradación. El agregado exógeno de GA3 al medio de cultivo de las plántulas *bbx24*, favorecería la interacción GA-GID1-DELLA la cual es reconocida por el complejo SCF que conduce a la marcación y degradación de las DELLA vía proteosoma. De esta forma, la falta de la degradación de las DELLA por parte del complejo BBX24-COP1, estaría compensada por la degradación mediada por el complejo SCF. Esto produce la liberación de PIF4, aún en ausencia de

BBX24, y aumentan los niveles de expresión de los genes que codifican para factores de crecimiento celular, provocando la restauración de la elongación del hipocotilo en las plántulas mutantes *bbx24* que crecen bajo sombra.

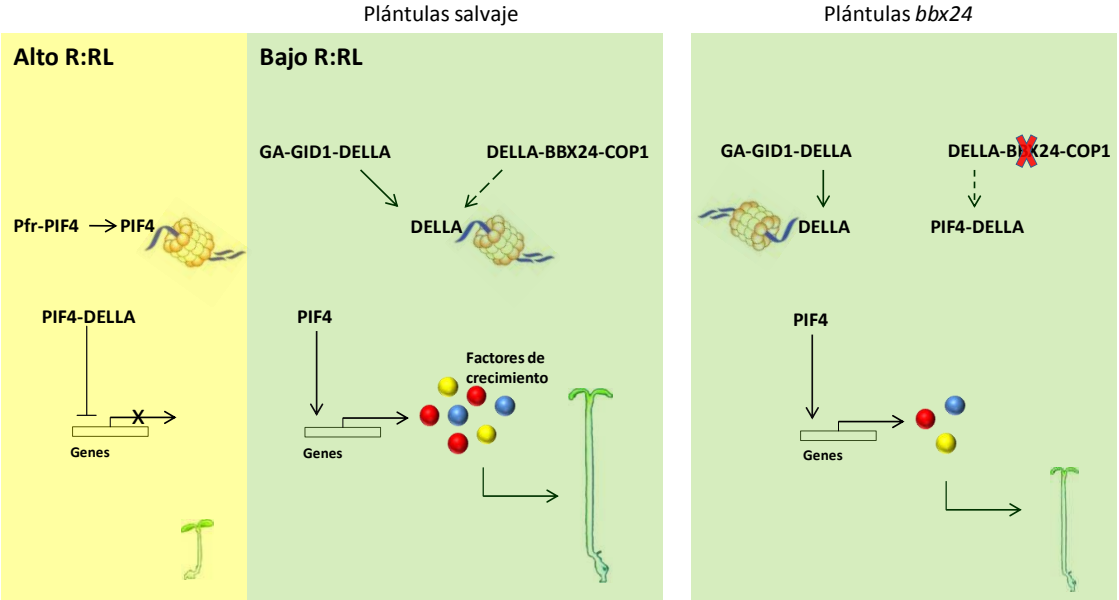


Diagrama 2 – Posible mecanismo de acción de BBX24 en la respuesta de escape el sombreado.
El diagrama muestra las formas de regulación de la proteína PIF4 en plántulas salvajes que se desarrollan en condiciones de alta (fondo amarillo) o baja relación R:RL (fondo verde). Este mecanismo muestra como, en altas relaciones R:RL, PIF4 es regulado a nivel proteico por la interacción PIF4-DELLA y es conducido a la degradación por la interacción Pfr-PIF4, impidiendo así la activación de los genes que codifican para factores de crecimiento. Cuando las plántulas salvajes crecen en ambientes sombreados (baja relación R:RL), la abundancia de PIF4 aumenta en el núcleo, principalmente por la degradación de las DELLA mediada por el complejo GA-GID1. En este modelo proponemos que otro mecanismo de degradación de las DELLA estaría dado por la interacción DELLA-BBX24-COP1. En las plántulas mutantes *bbx24*, el complejo BBX24-DELLA no se formaría, COP1 no marcaría a las DELLA, las DELLA no se degradarían por esta vía y la abundancia de PIF4 libre en el núcleo sería menor que en las plantas salvajes. Las líneas sólidas (—) muestran las vías de señalización demostradas, mientras que las líneas punteadas (---) muestran las vías de señalización sugeridas.

BBX21 y BBX24 modulan el alargamiento del hipocotilo por vías independientes

Evaluando la respuesta fisiológica del doble mutante *bbx21bbx24* se observó que los hipocotilos de las plántulas *bbx21bbx24* presentan un fenotipo intermedio entre las plántulas mutantes *bbx24* y *bbx21* cuando crecen bajo sombra simulada (Figura 23). Si BBX24 y BBX21 intervendrían en la regulación del largo del hipocotilo mediante una misma vía de acción, se esperaría obtener alguna relación epistática entre ellos. Sin embargo, la falta de BBX21 parece ser compensada parcialmente por la falta de BBX24. Este resultado sugiere que BBX21 y BBX24 regularían el crecimiento del hipocotilo mediante vías de acciones diferentes que se establecen cuando las plántulas se encuentran bajo un sombreado prolongado. En la discusión general se discute como interaccionan los posibles mecanismos de acción de BBX21 y de BBX24 para modular el crecimiento del hipocotilo durante la respuesta de escape al sombreado (ver discusión general).

MATERIAL SUPLEMENTARIO II

Tabla S1-II. Genes que son regulados por BBX24 exclusivamente en condiciones de sombreado o luz blanca o que son regulados indistintamente al tratamiento de luz utilizado (efecto genotipo). Affy ID, es la identificación asignada por Affymetrix para cada sonda asociada a uno o más locis. AGI ID (*Arabidopsis* gene loci number) es el número de identificación asignado para cada loci de *Arabidopsis thaliana*.

	Affy ID	AGI ID	Col Luz blanca (1)	Col Luz blanca (2)	bbx24 Luz blanca (1)	bbx24 Luz blanca (2)	Col sombra (1)	Col sombra (2)	bbx24 sombra (1)	bbx24 sombra (2)	(col/bbx24) sombra
Regulados por BBX24 en Sombra simulada	At3g58650	251527_at	48,12	63,11	50,92	70,23	15,08	14,88	73,47	59,24	0,23
	At3g07070	258832_at	81,82	109,80	75,60	110,17	29,48	68,35	155,52	117,03	0,36
	At1g65570	264682_at	254,03	217,08	270,93	356,70	156,78	249,05	507,38	556,01	0,38
	At1g50060	261691_at	95,49	67,22	124,35	93,20	37,19	77,80	150,07	137,96	0,40
	At1g34330	262564_at	42,46	43,56	36,39	39,13	23,75	35,04	79,69	65,99	0,40
	At3g47040	252447_at	85,05	78,23	92,96	78,47	48,06	59,68	143,34	121,99	0,41
	At3g10710	258765_at	329,69	261,88	286,29	363,77	145,58	155,97	401,45	321,96	0,42
	At4g02270	255516_at	1997,70	2126,16	1871,14	2702,73	1158,73	1350,81	3072,23	2732,15	0,43
	At1g34510	261157_at	217,74	171,52	169,36	169,55	87,93	112,84	272,88	190,80	0,43
	At2g20520	263376_at	192,52	136,87	125,90	142,30	75,07	80,13	184,96	172,48	0,43
	At3g27330	257740_at	50,61	51,22	48,75	47,34	26,47	28,75	58,02	68,68	0,44
	At4g19680	254534_at	218,60	178,80	168,52	191,61	71,04	91,79	192,15	176,44	0,44
	At5g54790	248130_at	42,09	42,78	44,75	56,30	36,17	36,07	83,42	78,90	0,45
	At2g34340	267003_at	106,29	113,22	100,75	93,14	37,57	74,72	138,14	112,67	0,45
	At4g26320	253957_at	472,47	322,36	466,93	431,98	148,53	262,20	367,89	480,78	0,48
	At3g01430	258953_at	74,08	92,64	66,80	78,94	12,11	17,86	17,45	42,91	0,50
	At1g30840	264497_at	141,83	168,92	183,11	202,66	116,05	104,69	198,08	244,52	0,50
	At5g38610	249518_at	136,49	169,34	135,90	135,29	104,61	101,70	248,11	163,91	0,50
	At2g23410	267137_at	83,46	79,32	117,36	116,01	38,40	84,11	116,76	124,21	0,51
	At2g03720	264029_at	216,51	132,63	145,53	171,47	118,14	116,43	221,47	239,19	0,51
	At3g50300	252202_at	267,47	259,01	311,31	293,53	237,31	239,69	472,62	463,83	0,51
	At5g66280	247094_at	431,36	423,65	608,78	635,24	251,08	376,48	579,47	651,97	0,51
	At2g02680	267240_at	137,84	106,60	144,91	151,36	101,03	87,55	182,72	183,96	0,51

At2g14095	263282_at	146,23	166,24	167,30	161,81	91,52	91,32	179,50	170,89	0,52
At3g49960	252238_at	1632,65	1449,06	1224,18	1403,77	1027,04	1087,51	2214,40	1826,88	0,52
At5g60660	247586_at	654,85	716,06	692,29	770,13	362,19	473,91	893,96	703,65	0,52
At5g11230	250417_at	366,95	386,74	477,38	563,99	305,83	319,69	613,64	578,91	0,52
At1g79060	257427_at	75,76	65,93	94,10	82,39	33,70	52,39	80,64	83,12	0,53
At2g25240	263614_at	158,49	151,95	142,53	157,27	108,58	114,11	197,45	220,57	0,53
At3g60720	251381_at	128,80	87,56	105,29	114,05	68,20	88,45	143,48	147,96	0,54
At5g22410	249934_at	247,74	166,82	194,12	242,45	136,45	150,69	283,22	249,58	0,54
At4g19370	254571_at	133,80	124,48	130,77	100,80	84,17	45,27	126,06	111,48	0,54
At5g35670	249709_at	105,16	129,64	116,08	106,68	74,20	53,98	118,25	113,02	0,55
At1g62980	261099_at	663,02	417,00	414,52	452,30	254,30	348,03	595,32	489,79	0,56
At4g22330	254306_at	765,97	552,38	689,74	749,62	509,88	501,77	889,03	927,31	0,56
At1g79320	264144_at	339,61	395,73	309,66	352,04	304,01	254,66	555,10	446,22	0,56
At4g00680	255632_at	428,62	453,28	465,32	508,68	260,30	311,37	499,63	511,46	0,57
At3g56440	251686_at	113,35	107,16	104,87	121,70	69,71	71,17	118,63	129,72	0,57
At4g33790	253309_at	155,76	132,55	136,52	133,61	84,16	94,29	156,78	157,59	0,57
At4g26010	253998_at	3776,96	3099,87	3655,57	3543,76	1938,10	2256,65	3741,63	3645,56	0,57
At3g16440	259328_at	895,92	1175,39	1177,82	1081,06	723,08	874,57	1484,40	1312,12	0,57
At1g14220	262658_at	280,33	270,39	328,80	369,47	193,67	187,18	350,55	315,35	0,57
At5g42180	249227_at	789,32	864,77	717,89	838,65	695,33	559,70	1160,70	1033,42	0,57
At4g22640	254324_at	161,07	134,24	218,13	201,58	66,54	100,05	118,09	172,49	0,57
At5g59090	247755_at	1079,97	850,80	920,53	1142,71	491,64	649,82	953,25	1035,07	0,57
At5g59520	247678_at	733,16	517,89	666,10	732,61	367,08	420,98	654,87	717,61	0,57
At1g33440	256447_at	88,57	130,55	113,88	168,46	115,44	132,01	185,97	244,66	0,57
At5g06630	250682_x_at	412,75	353,29	468,45	519,79	299,75	462,31	793,74	531,79	0,57
At2g23560	267123_at	159,84	122,32	106,17	93,59	76,02	91,46	150,52	137,51	0,58
At1g52070	265050_at	1562,80	1513,95	1512,77	1732,56	882,83	1287,99	1777,36	1946,96	0,58
At2g25160	264404_at	450,21	349,74	512,44	420,07	285,03	299,87	504,89	488,16	0,59
At1g73620	260077_at	285,89	260,75	286,91	328,02	131,81	207,47	252,38	322,56	0,59
At4g11290	254914_at	441,36	376,08	407,18	526,57	223,78	262,98	371,18	451,82	0,59
At4g11210	254909_at	679,14	440,30	530,17	469,55	327,78	382,57	577,05	621,70	0,59
At4g09990	255005_at	463,40	318,18	365,63	405,46	236,54	248,89	381,54	436,79	0,59
At1g43160	264415_at	280,11	224,16	340,51	359,49	153,23	191,35	286,19	286,93	0,60
At5g47450	248790_at	184,76	166,81	201,39	231,40	171,58	181,13	299,72	285,14	0,60
At2g46860	266765_at	105,69	98,39	101,77	123,68	91,26	98,59	159,63	155,05	0,60
At5g40730	249375_at	3063,76	2439,72	2882,25	3007,88	2011,28	2153,96	3474,01	3403,82	0,61
At3g01190	259276_at	2705,11	2199,94	2560,11	3033,62	1779,58	2052,37	2993,72	3316,68	0,61
At1g12010	264346_at	218,92	253,70	254,03	260,70	168,78	159,51	256,51	282,60	0,61
At3g11550	259291_at	771,50	594,45	500,70	696,39	393,18	407,94	624,50	687,70	0,61
At1g60390	264277_at	414,95	288,93	392,82	379,26	272,56	273,47	493,35	398,52	0,61

At1g22190	255926_at	351,43	352,28	352,93	399,51	214,78	261,17	390,85	385,91	0,61
At1g12560	259525_at	260,63	197,87	225,57	258,72	183,28	168,87	317,01	256,63	0,61
At2g01480	266340_at	266,11	375,08	297,12	338,77	245,95	245,50	413,40	386,84	0,61
At5g05500	250778_at	678,01	730,06	720,04	705,96	518,11	495,28	794,33	850,69	0,62
At3g51540	252109_at	142,56	154,62	228,21	183,70	74,67	123,79	149,35	171,96	0,62
At4g25790	254025_at	505,73	514,43	548,58	541,09	527,21	356,83	728,03	702,76	0,62
At1g55120	256150_at	228,15	204,26	183,63	235,62	195,88	147,21	305,87	249,36	0,62
At3g19660	257074_at	551,62	383,41	408,85	467,96	242,42	310,18	499,38	392,49	0,62
At2g29750	266669_at	969,30	708,06	719,46	868,00	501,75	572,27	944,60	788,78	0,62
At1g64590	261956_at	3740,95	3411,06	4586,09	4139,28	3163,60	2798,38	5351,38	4239,83	0,62
At4g33730	253353_at	340,17	360,82	345,44	304,12	301,59	250,73	514,16	369,46	0,63
At3g04480	258593_at	464,19	613,79	698,92	757,00	494,03	507,41	828,56	769,45	0,63
At2g43600	260558_at	122,28	132,03	140,62	139,60	81,44	90,09	140,63	132,53	0,63
At1g30870	265102_at	1548,13	1142,06	1270,76	1556,56	703,84	1128,50	1475,82	1436,26	0,63
At2g17580	263068_at	121,67	121,97	80,85	97,28	76,45	83,28	117,09	136,64	0,63
At1g80290	260301_at	201,80	259,56	229,45	268,48	219,15	186,11	349,30	292,78	0,63
At2g21650	263549_at	433,30	386,35	544,34	506,07	150,96	207,15	231,13	335,56	0,63
At5g56540	247965_at	1263,12	1258,21	1440,61	1483,55	1084,44	1131,82	1851,65	1653,67	0,63
At3g50640	252172_at	361,76	316,79	290,98	370,84	257,67	263,71	416,94	406,02	0,63
At1g78440	260773_at	125,94	138,82	154,27	139,97	157,12	137,50	262,40	201,90	0,63
At5g11970	250301_at	852,22	799,69	770,67	938,83	641,63	580,20	1072,43	846,86	0,64
At5g60410	247629_at	369,48	349,65	322,83	423,19	181,93	232,40	339,77	311,07	0,64
At2g34910	267409_at	304,48	234,38	247,32	300,13	175,40	101,90	218,57	216,84	0,64
At5g04960	250801_at	975,71	700,84	590,48	773,23	529,82	640,26	926,08	909,85	0,64
At2g46270	266555_at	308,97	246,95	260,12	332,85	179,94	212,95	328,39	285,82	0,64
At1g53770	257470_at	189,86	185,34	178,06	146,14	121,41	124,27	184,01	198,66	0,64
At5g03510	250949_at	180,22	218,53	257,52	225,88	128,77	154,65	206,81	234,57	0,64
At3g23870	256913_at	124,69	95,04	133,97	140,73	96,22	95,54	159,08	139,42	0,64
At1g22880	264775_at	173,98	173,35	171,44	224,31	164,01	191,60	270,40	283,06	0,64
At5g15180	250157_at	387,65	340,56	321,12	317,18	265,54	329,74	528,74	397,74	0,64
At1g53680	259964_at	307,58	263,96	247,95	275,30	207,31	196,64	310,77	317,73	0,64
At5g53070	248295_at	166,57	165,04	195,52	189,91	133,14	148,32	197,99	239,30	0,64
At3g16760	258425_at	395,04	442,76	417,62	406,15	346,44	323,51	516,61	524,11	0,64
At5g64100	247297_at	3250,64	3881,55	4695,01	4638,87	3540,43	2567,30	4632,84	4849,85	0,64
At1g01750	261562_at	730,16	644,77	645,90	748,26	373,00	568,62	693,29	762,58	0,65
At1g26820	263689_at	602,43	569,60	634,61	619,81	447,46	447,06	669,35	710,83	0,65
At5g10430	250437_at	967,21	1058,99	1053,49	1172,18	946,86	1034,50	1701,45	1353,57	0,65
At2g40080	267364_at	281,47	272,15	427,89	352,22	496,83	388,01	652,85	711,34	0,65
At2g36830	263867_at	2955,21	3399,29	3199,20	3323,94	2749,17	2750,03	4827,18	3642,08	0,65
At5g40590	249364_at	811,79	1001,86	1113,07	1344,31	360,04	507,71	497,23	838,86	0,65

At5g13980	250203_at	539,65	519,69	575,57	564,35	465,05	543,93	825,39	727,64	0,65
At2g44110	267191_at	509,09	451,30	380,93	395,34	384,20	288,92	545,36	488,26	0,65
At2g03500	265719_at	118,37	123,91	153,90	150,57	108,07	113,76	156,01	183,91	0,65
At4g01650	255593_at	190,10	240,26	236,66	274,36	194,88	166,94	275,60	278,59	0,65
At2g41710	260498_at	224,89	219,66	245,35	247,00	156,79	203,67	275,71	275,50	0,65
At1g48930	260758_at	669,66	433,46	477,89	510,25	424,68	430,79	656,92	648,68	0,66
At5g53110	248298_at	272,28	252,42	291,94	273,85	179,81	232,65	300,09	327,35	0,66
At5g16530	250123_at	131,93	148,37	198,67	184,84	149,78	162,53	201,27	272,37	0,66
At4g21870	254384_at	1566,27	1813,78	1806,67	1228,38	2025,41	1413,57	3030,51	2168,59	0,66
At4g01440	255576_at	437,64	347,29	434,05	517,89	266,79	231,82	334,28	419,48	0,66
At2g37040	263845_at	5600,67	5506,54	7961,88	6435,54	3032,74	4162,46	5022,63	5838,78	0,66
At1g50630	261863_at	493,12	367,16	450,11	550,43	318,15	414,18	541,86	563,46	0,66
At1g77000	264957_at	512,17	540,57	556,30	691,41	577,30	474,53	846,35	740,48	0,66
At5g64410	247284_at	989,00	1028,58	929,53	1002,77	547,43	815,07	1058,25	994,01	0,66
At1g02950	262120_at	287,80	248,32	336,89	368,43	246,92	180,72	339,91	304,04	0,66
At1g13300	259365_at	218,28	197,11	129,83	197,63	222,71	167,94	335,20	251,74	0,67
At5g16570	250100_at	1393,44	1099,79	1319,58	1411,57	680,54	967,60	1084,62	1391,33	0,67
At1g06240	260790_at	221,59	261,35	188,84	221,16	166,28	206,35	306,63	252,85	0,67
At5g24410	249729_at	316,07	309,62	318,44	283,84	220,03	274,20	381,66	359,61	0,67
At3g04060	258813_at	579,96	465,56	583,15	583,48	463,84	504,58	835,03	610,86	0,67
At2g23430	267135_at	237,47	263,93	309,93	284,55	205,07	179,98	307,17	267,67	0,67
At2g39430	266978_at	435,82	372,85	371,03	486,45	296,78	327,60	463,36	468,76	0,67
At4g11820	254845_at	1818,70	2138,10	1720,67	1888,65	997,38	1514,18	1644,79	2100,88	0,67
At4g16860	245448_at	785,66	777,42	915,72	926,12	658,52	792,57	1082,42	1079,84	0,67
At3g03440	259043_at	190,19	164,18	251,27	254,25	163,85	180,02	232,16	280,23	0,67
At5g52250	248347_at	378,80	352,75	397,43	376,56	440,80	304,46	595,42	514,15	0,67
At4g34600	253246_at	647,11	517,64	728,74	618,16	922,28	485,89	1024,47	1071,63	0,67
At1g61890	264289_at	464,28	514,94	650,75	741,10	405,08	505,13	728,74	624,61	0,67
At2g43140	257373_at	363,96	487,53	580,07	497,41	294,58	303,93	381,38	507,77	0,67
At5g49470	248604_at	145,18	134,28	166,08	175,28	108,42	133,26	175,36	183,15	0,67
At3g25930	258080_at	745,34	636,80	794,08	721,69	671,06	725,62	1117,01	952,88	0,67
At3g21390	256819_at	679,65	836,06	714,33	682,52	989,47	799,61	672,56	565,06	1,45
At3g25250	257840_at	484,55	552,12	668,86	568,96	449,05	412,87	213,52	381,67	1,45
At1g48330	262236_at	83,35	116,57	93,15	103,11	187,74	175,70	139,19	111,43	1,45
At4g37980	252983_at	627,28	550,88	523,28	529,25	1203,46	1097,26	797,82	786,82	1,45
At1g30530	261804_at	893,28	930,12	641,64	746,60	840,10	961,14	628,81	611,49	1,45
At2g34357	267044_at	348,70	281,20	326,14	320,64	458,48	386,59	245,61	335,71	1,45
At2g35980	263948_at	757,85	756,11	864,71	733,32	488,01	493,95	261,53	413,34	1,46
At4g28085	253827_at	640,95	737,14	735,54	633,16	490,82	411,11	245,48	372,24	1,46
At4g01130	255607_at	103,90	116,36	118,54	124,73	177,83	240,06	110,25	175,64	1,46

At5g64940	247232_at	1272,93	1266,39	1387,37	1172,86	927,86	1106,85	704,09	682,90	1,47
At5g02760	251017_at	1230,49	1083,02	747,27	865,74	1510,49	1626,43	1055,63	1079,68	1,47
At2g20550	263365_at	130,14	142,81	98,50	134,84	170,20	167,42	120,98	108,45	1,47
At5g02490	250994_at	555,19	636,94	548,78	378,92	695,77	649,30	538,19	374,15	1,47
At2g26110	266845_at	181,83	220,24	204,48	249,50	345,41	328,80	223,88	233,23	1,47
At1g29510	259783_at	56,10	42,15	38,87	71,54	180,90	175,31	119,95	121,26	1,48
At4g39670	252908_at	523,99	474,01	677,26	674,03	351,22	454,61	203,45	340,67	1,48
At2g04040	263403_at	808,42	749,18	822,43	758,23	514,62	627,12	246,96	521,27	1,49
At4g32280	253423_at	239,92	82,31	116,67	116,52	602,42	771,97	458,23	465,82	1,49
At3g21950	257254_at	165,05	156,94	163,24	149,55	160,26	145,94	96,38	109,32	1,49
At5g54960	248138_at	1890,83	2189,32	2287,60	1909,26	2881,51	3236,80	1811,94	2280,61	1,49
At3g15030	257267_at	450,64	380,79	367,74	399,59	355,22	410,40	238,72	272,64	1,50
At4g13640	254682_at	277,93	310,10	214,21	281,97	324,45	291,40	174,77	234,92	1,50
At1g17170	262518_at	5765,76	5715,64	7129,70	5946,11	3893,78	4759,91	1725,63	4023,69	1,51
At2g46390	263785_at	699,42	702,89	511,91	587,66	1011,06	744,67	639,54	526,21	1,51
At3g62820	251181_at	218,70	243,06	187,37	269,23	371,01	327,29	202,62	259,42	1,51
At5g13680	250244_at	199,39	192,60	200,47	219,11	278,70	289,49	190,30	184,63	1,52
At5g12110	250304_at	115,81	89,25	42,79	99,32	258,38	171,80	170,07	113,75	1,52
At4g09900	255025_at	308,42	286,01	301,40	279,29	524,62	389,71	296,14	306,42	1,52
At3g23325	258297_at	834,45	807,24	1043,81	979,78	1058,66	1046,48	695,91	685,95	1,52
At2g36000	263946_at	147,16	227,94	290,42	233,87	244,98	253,51	153,33	173,85	1,52
At4g23940	254181_at	295,03	275,25	226,19	231,56	262,85	263,73	172,04	173,43	1,52
At3g28080	257300_at	175,71	156,55	125,71	141,41	142,76	170,19	86,46	118,70	1,53
At2g03760	264042_at	2045,92	2001,07	2313,54	2429,55	1795,50	1484,94	614,30	1525,33	1,53
At3g02840	258606_at	102,40	153,85	154,33	131,84	80,75	92,28	71,38	41,42	1,53
At1g35430	260103_at	136,93	147,39	161,45	119,60	197,31	190,60	140,54	111,63	1,54
At3g53230	251975_at	787,02	686,60	684,88	727,86	1118,37	920,57	604,38	719,92	1,54
At1g68600	262232_at	265,49	206,26	140,45	191,36	247,23	271,28	170,38	166,17	1,54
At5g50335	248509_at	83,77	94,48	80,36	60,90	164,95	215,42	139,62	106,87	1,54
At1g33030	261216_at	152,16	163,65	163,57	183,28	146,65	157,09	73,89	122,93	1,54
At5g17990	250014_at	1057,62	986,32	1197,01	1020,23	1194,04	1155,30	722,51	794,86	1,55
At1g74360	260239_at	287,79	246,32	422,34	364,46	318,32	244,75	171,20	192,32	1,55
At1g56350	259630_at	209,80	188,76	224,04	197,19	209,00	226,02	140,33	140,10	1,55
At1g18570	255753_at	391,61	515,92	557,89	485,07	498,53	411,75	288,19	297,87	1,55
At1g80130	262050_at	558,24	478,44	596,15	565,43	755,55	924,85	436,05	645,81	1,55
At2g41100	267083_at	3767,57	5493,28	5396,00	4435,95	3509,57	3399,33	1779,53	2663,88	1,55
At5g52900	248282_at	253,44	226,53	196,31	209,04	409,04	458,59	265,92	291,92	1,56
At5g47110	248828_at	2879,59	2983,43	2420,04	2684,91	3009,71	3257,82	1868,81	2151,62	1,56
At5g38900	249481_at	509,96	561,51	740,97	650,17	608,70	486,26	222,87	477,82	1,56
At1g76930	264960_at	837,01	1026,79	1314,88	1255,48	1516,63	1299,80	943,99	857,01	1,56

	At4g28350	253819_at	243,46	265,68	368,72	268,89	276,28	239,23	141,82	186,76	1,57
	At4g08770	255110_at	1072,68	951,83	1121,60	1106,74	746,00	767,58	318,60	645,55	1,57
	At5g44400	249046_at	665,79	603,31	481,93	526,45	565,54	520,78	297,44	393,36	1,57
	At2g32020	265668_at	967,99	804,89	1168,02	1078,18	737,68	512,81	223,49	570,31	1,58
	At3g15570	257294_at	714,33	653,28	664,29	777,81	711,04	704,72	372,53	525,54	1,58
	At5g25610	246908_at	4512,17	3855,88	3764,85	4106,64	3950,42	3520,20	2083,57	2644,15	1,58
	At5g28630	246108_at	580,28	460,42	523,82	478,37	406,38	428,99	266,29	262,05	1,58
	At3g09350	259037_at	334,13	270,40	240,13	262,24	399,53	431,93	251,46	274,32	1,58
	At5g02590	251005_at	267,94	284,50	239,28	234,85	390,31	332,81	202,22	247,39	1,61
	At4g33666	253305_at	2174,21	2274,73	2991,14	2427,27	2681,15	1795,42	980,67	1800,64	1,61
	At2g15490	265501_at	1311,60	1287,13	1232,24	1230,00	1050,56	861,98	435,47	748,75	1,62
	At5g57220	247949_at	860,87	1115,90	1298,29	973,50	425,31	677,26	141,05	537,28	1,63
	At5g54060	248185_at	269,53	253,31	293,71	311,62	143,21	150,57	30,71	149,03	1,63
	At4g39210	252888_at	429,86	409,12	313,30	390,33	480,22	538,78	270,27	352,91	1,64
	At1g32940	261240_at	834,55	1088,30	1392,32	1126,13	975,44	908,44	403,48	735,80	1,65
	At3g54150	251884_at	329,92	333,26	464,49	363,56	306,52	246,85	128,64	205,42	1,66
	At4g33070	253416_at	2943,96	3702,38	4373,21	4321,30	3172,01	2696,35	965,70	2576,66	1,66
	At1g03660	264832_at	469,49	535,65	705,18	591,17	607,36	456,24	239,72	400,75	1,66
	At1g15520	261763_at	131,06	176,94	152,14	98,83	113,81	102,29	57,65	71,36	1,67
	At1g14550	261475_at	551,17	652,61	942,50	752,99	329,30	301,62	79,44	297,05	1,68
	At4g08780	255111_at	344,16	467,84	517,34	420,78	424,08	319,72	178,36	265,28	1,68
	At1g60750	264912_at	340,47	288,14	504,81	328,86	299,09	290,31	120,65	230,07	1,68
	At4g29240	253723_at	135,76	110,00	110,29	108,68	165,92	159,56	80,51	112,88	1,68
	At3g25610	256756_at	1296,65	1437,55	1719,18	1168,33	1118,39	1116,57	531,30	789,10	1,69
	At5g37570	249624_at	71,29	68,09	55,37	49,01	85,90	95,75	48,89	58,29	1,69
	At1g30070	260025_at	193,27	190,94	207,65	170,93	327,95	238,97	136,14	198,17	1,70
	At2g16900	266536_at	909,94	769,48	857,73	920,43	691,02	866,56	357,35	560,72	1,70
	At5g01550	251096_at	227,11	243,27	249,22	308,23	214,64	270,00	96,59	188,93	1,70
	At1g79560	262937_at	293,55	300,15	273,42	288,35	416,87	337,44	189,77	253,79	1,70
	At2g25140	264402_at	214,19	248,07	338,60	260,22	291,64	265,15	188,12	138,51	1,70
	At1g24020	263034_at	1043,18	900,14	855,48	714,59	706,00	805,78	364,02	522,59	1,71
	At3g56290	251727_at	1637,74	1437,84	1356,96	1120,89	1494,95	1682,79	801,04	1055,44	1,71
	At5g42830	249188_at	633,59	835,14	1158,52	949,68	525,89	634,61	186,74	490,78	1,71
	At1g17180	262517_at	6771,12	6887,83	7682,59	7194,52	6094,16	6594,33	2014,33	5355,88	1,72
	At3g28580	256989_at	82,70	145,36	138,47	136,25	70,46	77,19	22,83	61,89	1,74
	At3g25655	256762_at	247,28	221,42	271,75	295,04	258,16	192,35	105,89	151,92	1,75
	At1g10170	264460_at	1129,66	1394,45	1813,12	1625,94	1589,28	1288,47	590,65	1048,87	1,76
	At4g23190	254241_at	812,21	674,09	650,51	833,38	685,91	598,92	299,38	429,78	1,76
	At5g25450	246944_at	118,06	144,99	132,47	138,79	292,33	236,42	164,94	134,86	1,76
	At5g09970	250509_at	12,66	52,10	31,91	42,32	107,09	81,98	58,86	46,00	1,80

At5g64510	247293_at	62,15	99,25	69,71	83,07	167,58	167,62	95,72	87,43	1,83
At3g01830	258947_at	91,62	115,25	116,10	97,52	95,61	70,11	48,44	42,10	1,83
At1g61800	264400_at	1005,23	905,18	722,68	785,27	609,81	776,58	219,52	537,75	1,83
At1g30080	260024_at	93,81	67,54	87,01	122,62	65,97	46,32	18,50	42,68	1,84
At2g23680	267288_at	184,81	222,24	205,05	210,36	194,44	120,98	46,77	124,85	1,84
At1g19690	261147_at	165,82	174,21	135,53	125,43	232,22	210,52	119,57	120,44	1,84
At5g59820	247655_at	1477,24	1310,95	1690,32	1299,06	1252,32	1212,76	491,94	839,05	1,85
At3g11750	258782_at	85,51	98,38	62,53	73,89	109,57	129,02	48,61	79,65	1,86
At1g01480	259439_at	92,10	103,69	113,13	103,94	110,67	102,82	57,12	56,78	1,87
At1g05680	263231_at	3803,54	3642,49	5120,51	3528,08	2817,46	3717,63	1313,79	2143,64	1,89
At5g48570	248657_at	164,94	161,34	119,43	112,09	337,39	231,84	178,47	118,29	1,92
At2g23170	245076_at	150,35	205,70	163,34	141,26	586,31	539,30	265,25	320,29	1,92
At5g52670	248316_at	121,36	124,59	136,80	162,09	83,51	83,70	45,41	39,74	1,96
At1g05575	263182_at	213,59	276,25	257,87	204,58	233,89	154,35	109,75	86,62	1,98
At4g36430	246228_at	921,09	1200,32	1313,93	1149,26	892,40	864,12	286,29	600,76	1,98
At1g30040	260023_at	277,89	286,61	330,75	211,55	264,67	246,08	106,47	150,87	1,98
At2g38870	266168_at	901,90	1033,25	1050,95	1067,46	1127,66	780,81	294,80	666,15	1,99
At1g64160	262325_at	178,65	162,61	212,70	159,01	70,11	82,94	13,01	64,03	1,99
At3g15650	258270_at	159,24	190,70	189,08	172,26	201,96	168,23	67,83	118,20	1,99
At3g05370	259298_at	167,43	155,58	140,92	136,80	141,76	162,37	77,68	72,75	2,02
At1g05060	265192_at	1949,67	1956,21	2639,58	1852,86	1749,95	1911,50	552,45	1231,28	2,05
At1g77200	264481_at	26,76	80,80	66,50	55,67	203,64	222,50	93,58	113,41	2,06
At3g09405	259033_at	363,58	500,15	713,51	513,05	349,90	458,39	121,78	270,30	2,06
At5g01870	251065_at	730,06	811,05	704,79	614,17	841,40	843,30	348,25	468,80	2,06
At5g06720	250646_at	80,62	80,21	83,89	84,25	93,34	105,30	49,50	46,61	2,07
At4g37710	253060_at	98,67	110,29	103,38	41,55	48,48	39,52	5,71	36,85	2,07
At3g26830	258277_at	437,25	610,79	581,93	510,33	409,99	528,27	69,09	379,31	2,09
At5g05190	250821_at	356,85	516,61	537,05	408,37	437,96	400,05	105,79	292,65	2,10
At2g43000	265260_at	384,76	496,95	607,59	445,99	406,78	395,36	133,51	247,10	2,11
At1g73010	262369_at	226,19	177,28	172,31	148,62	191,26	167,01	77,45	88,94	2,15
At1g26380	261021_at	937,26	1211,79	1419,90	971,39	871,46	902,23	124,08	695,04	2,17
At3g60140	251428_at	237,00	290,20	260,62	144,16	492,05	412,63	193,55	220,84	2,18
At3g28210	256576_at	816,08	638,19	733,56	566,06	743,29	657,45	192,39	444,03	2,20
At1g08260	261811_at	95,75	84,65	53,62	98,58	121,74	117,90	46,40	59,06	2,27
At4g28460	253796_at	362,55	432,24	502,82	427,77	457,40	300,64	170,09	161,00	2,29
At2g19190	267436_at	150,01	165,87	193,26	177,50	80,43	149,02	3,42	95,68	2,32
At3g62100	251246_at	67,70	46,33	43,49	41,10	84,01	82,59	31,29	39,62	2,35
At2g04050	263402_at	595,96	544,30	784,75	730,14	688,65	709,81	133,24	451,84	2,39
At3g14620	258063_at	242,92	297,06	246,74	217,94	454,81	471,40	191,71	194,14	2,40
At1g66090	256526_at	154,03	196,82	164,57	118,73	235,64	193,82	64,65	112,10	2,43

	At5g42380	249197_at	189,75	219,05	207,51	129,24	213,08	152,45	48,14	100,99	2,45
	At2g46240	266590_at	135,61	174,09	151,88	144,04	318,92	273,95	103,00	137,23	2,47
	At1g69920	260406_at	370,37	550,48	696,12	499,98	217,36	232,63	26,88	153,62	2,49
	At2g19990	265586_at	99,28	107,52	67,78	90,58	158,11	105,92	40,17	63,57	2,55
	At2g21640	263515_at	412,29	609,15	682,24	561,20	710,90	525,77	167,25	314,89	2,56
	At2g43620	260556_at	387,24	632,75	590,20	504,13	555,13	501,79	99,96	307,38	2,59
	At1g71140	259743_at	165,06	122,08	236,16	141,81	209,32	236,43	68,08	102,13	2,62
	At3g23250	257919_at	90,48	122,80	89,54	100,85	79,95	66,52	5,51	49,91	2,64
	At5g39670	249417_at	140,12	175,01	163,65	150,69	197,99	103,79	53,49	60,05	2,66
	At1g22110	255950_at	68,48	79,96	72,27	93,64	59,74	86,55	28,73	25,64	2,69
	At2g30750	267565_at	591,91	933,28	1319,97	834,28	485,69	845,41	88,30	401,71	2,72
	At2g41730	260522_x_at	2493,36	2582,66	3129,88	2574,75	2858,12	2054,85	420,42	1387,76	2,72
	At1g13650	256096_at	143,20	93,62	102,82	106,96	37,69	52,00	8,08	24,78	2,73
	At4g12400	254839_at	220,10	163,94	139,32	143,77	526,19	309,64	139,97	164,74	2,74
	At4g37290	253044_at	461,36	562,42	760,36	422,20	445,49	388,47	69,46	231,95	2,77
	At3g50930	252131_at	616,30	767,65	960,59	582,82	473,95	505,82	96,70	240,44	2,91
	At2g04070	263401_at	376,08	271,19	345,76	325,72	401,34	417,97	66,01	215,32	2,91
	At1g69930	260405_at	390,10	577,69	595,14	370,82	310,56	291,30	68,44	137,84	2,92
	At3g48850	252334_at	294,57	337,81	413,19	273,63	333,51	332,93	7,89	218,90	2,94
	At1g16030	261838_at	200,47	126,72	141,22	123,60	463,90	282,27	81,77	167,92	2,99
	At1g53540	260978_at	88,54	78,77	84,17	41,49	247,50	144,35	60,60	67,01	3,07
	At4g04490	255340_at	83,10	106,83	95,51	118,30	106,50	114,65	19,89	51,14	3,11
	At5g57510	247913_at	129,95	153,29	154,89	126,99	127,70	138,70	5,66	79,83	3,12
	At5g51440	248434_at	884,14	702,45	591,47	597,32	1154,39	898,70	196,06	452,59	3,17
	At4g25380	254062_at	155,80	140,94	158,44	145,95	177,39	193,50	28,26	88,05	3,19
	At1g26390	261020_at	346,54	446,26	417,66	253,67	485,39	425,88	28,04	254,78	3,22
	At4g37370	253046_at	1752,62	1723,94	2282,22	1562,93	1778,85	1520,38	160,34	804,92	3,42
	At4g14090	245624_at	316,03	321,95	314,47	373,30	219,52	127,68	7,78	92,15	3,47
	At5g06730	250702_at	147,76	221,51	183,03	123,31	162,25	182,65	29,52	68,99	3,50
	At2g20720	265428_at	99,99	96,87	103,32	99,02	107,73	118,16	11,04	53,42	3,50
	At1g32350	260706_at	594,69	671,60	827,65	502,51	765,73	688,71	65,05	348,24	3,52
	At2g01300	265732_at	323,57	439,89	467,08	350,35	417,74	404,66	66,04	160,46	3,63
	At3g60120	251456_at	74,25	100,91	88,88	74,18	100,03	140,67	27,18	29,36	4,26
	At2g29500	266294_at	307,00	239,08	257,63	202,75	1198,25	539,70	138,78	242,34	4,56
	At5g19880	246145_at	65,58	67,85	75,74	63,67	57,34	60,68	8,47	11,11	6,03
	At4g28420	253795_at	44,93	59,78	40,70	51,90	35,97	51,35	1,38	9,62	7,94

	Affy ID	AGI ID	Col Luz blanca (1)	Col Luz blanca (2)	bbx24 Luz blanca (1)	bbx24 Luz blanca (2)	Col sombra (1)	Col sombra (2)	bbx24 sombra (1)	bbx24 sombra (2)	(col/bbx24) Luz Blanca
Regulados por BBX24 en Luz blanca	At3g26140	257629_at	4,13	6,49	27,13	42,52	45,29	52,10	29,43	39,41	0,15
	At2g25680	265897_at	13,07	6,09	72,90	41,26	94,51	47,11	80,55	103,92	0,17
	At4g19430	254574_at	9,64	5,66	39,44	39,69	7,43	4,12	8,07	4,16	0,19
	At4g37950	253016_at	12,49	1,01	30,85	32,71	52,64	50,65	36,43	41,63	0,21
	At4g27370	253913_at	13,90	27,37	52,14	44,76	65,20	61,47	75,41	61,86	0,43
	At3g25870	258078_at	33,01	110,92	160,07	171,31	86,10	90,07	118,09	82,41	0,43
	At5g24655	249721_at	61,38	88,95	171,36	144,53	110,96	105,10	116,43	128,65	0,48
	At5g47920	248777_at	55,09	59,49	128,40	101,07	88,34	72,88	80,73	77,42	0,50
	At5g50310	248549_at	272,06	309,04	575,11	535,71	387,36	448,86	468,71	414,97	0,52
	At3g25810	257637_at	28,80	29,84	57,70	52,67	58,75	53,97	80,43	68,92	0,53
	At4g11900	254870_at	57,14	52,78	96,87	103,55	34,45	65,90	32,79	42,28	0,55
	At1g65390	264153_at	370,75	444,59	902,21	476,42	182,40	331,00	249,66	273,31	0,59
	At4g25480	254066_at	239,03	222,76	383,87	396,29	421,47	568,50	580,72	522,94	0,59
	At1g68500	260264_at	156,65	125,07	222,41	247,29	223,50	172,45	294,37	279,30	0,60
	At2g31240	264084_at	252,81	232,11	414,97	385,29	342,45	370,59	396,40	343,51	0,61
	At5g41140	249340_at	165,05	184,20	291,36	277,42	268,67	280,87	243,39	273,11	0,61
	At3g22430	258446_at	92,63	76,86	153,53	122,33	85,96	99,00	119,99	111,12	0,61
	At1g65060	261907_at	248,33	256,04	387,97	428,98	253,21	332,45	305,22	396,98	0,62
	At3g20150	257115_at	53,30	47,12	79,92	82,70	23,66	41,63	53,10	37,84	0,62
	At1g07840	261419_at	140,84	183,31	243,50	276,57	194,13	299,43	313,59	283,38	0,62
	At3g10190	259143_at	137,26	199,03	252,40	286,83	215,71	195,30	243,06	288,63	0,62
	At1g15210	262575_at	764,92	595,21	1082,97	1095,92	770,62	1002,13	1175,30	957,17	0,62
	At5g18470	249983_at	358,99	551,31	819,12	638,67	386,62	422,90	252,35	361,93	0,62
	At5g37550	249622_at	175,75	176,41	276,90	286,80	196,90	189,69	186,33	191,99	0,62
	At1g30810	264528_at	106,77	140,90	193,54	199,07	153,08	203,13	265,37	196,47	0,63
	At2g20840	265419_at	231,52	264,89	352,63	434,04	279,88	291,31	404,31	328,60	0,63
	At5g02270	251020_at	1836,29	1775,25	2736,72	2901,89	1927,63	1419,14	2314,06	2230,14	0,64
	At1g23720	265169_x_at	273,97	415,03	523,93	549,82	311,16	376,91	473,96	481,86	0,64
	At4g12500	254819_at	593,91	507,79	820,08	884,28	368,67	539,31	259,61	574,23	0,65
	At5g57740	247877_at	210,94	211,16	323,39	328,68	147,27	207,47	214,30	290,37	0,65
	At2g19080	267442_at	383,94	430,03	647,05	602,50	511,27	559,98	642,02	797,86	0,65
	At3g54420	251895_at	1072,00	977,70	1499,20	1623,96	848,48	962,21	814,01	1330,99	0,66

At3g47850	252388_at	117,50	122,14	165,56	196,95	130,41	151,03	165,33	183,60	0,66
At2g46560	265455_at	412,64	449,30	589,46	714,05	477,25	468,17	646,27	620,27	0,66
At5g50315	248510_at	74,19	88,04	115,15	129,03	68,88	74,11	75,36	90,44	0,66
At3g02980	258604_at	44,45	72,21	85,48	89,49	107,94	96,65	118,75	148,45	0,67
At5g54800	248144_at	767,29	660,53	1070,69	1068,20	917,87	860,96	1059,96	1114,22	0,67
At3g61700	251274_at	236,47	181,31	280,83	344,39	200,74	231,43	272,00	250,84	0,67
At1g31150	263700_at	108,85	94,23	159,24	144,30	108,20	98,56	111,24	112,22	0,67
At1g74770	262218_at	193,75	171,15	259,71	285,16	117,94	143,43	215,18	162,66	0,67
At2g18220	265326_at	134,66	174,65	207,82	251,12	156,00	124,89	153,30	156,41	0,67
At1g21120	261449_at	204,48	315,35	349,99	421,31	112,61	149,17	65,31	178,41	0,67
At1g01440	261052_at	214,89	192,31	302,36	301,53	228,64	206,69	256,76	332,95	0,67
At1g04000	265039_at	205,90	220,58	322,51	309,93	210,45	221,22	239,91	264,03	0,67
At2g27420	265665_at	320,57	251,21	198,74	195,68	220,49	217,91	170,97	132,60	1,45
At1g68440	259856_at	1214,72	1236,34	781,65	908,53	1042,09	1003,18	1347,04	971,96	1,45
At4g31050	253553_at	105,43	116,90	79,46	73,73	133,17	84,75	161,63	140,13	1,45
At2g33380	255795_at	110,15	117,70	53,95	102,43	148,34	207,89	142,92	186,53	1,46
At1g17460	261086_at	103,35	69,37	54,36	62,81	128,58	132,57	156,71	121,69	1,47
At3g47340	252415_at	1911,92	3467,38	1830,96	1817,34	4952,39	4104,17	4716,89	3535,39	1,47
At3g15950	257798_at	5549,20	3963,40	3319,87	3112,77	3662,29	3183,32	3686,65	3290,30	1,48
At3g25190	257823_at	1128,63	871,76	665,10	684,25	583,39	661,68	663,72	736,65	1,48
At1g70880	262301_at	121,36	144,33	95,44	81,18	136,42	131,61	204,42	164,02	1,50
At1g13330	259409_at	43,88	44,08	25,98	32,48	2,43	4,82	5,76	4,07	1,50
At1g14200	262656_at	264,26	231,28	160,37	164,10	163,41	169,92	135,88	158,84	1,53
At3g16050	258336_at	343,50	353,24	207,92	247,42	274,49	260,74	238,11	310,11	1,53
At4g28720	253794_at	352,47	226,10	200,69	177,33	1042,47	909,12	1060,93	860,57	1,53
At1g54200	263002_at	144,47	129,35	89,84	88,10	171,05	140,65	194,21	141,31	1,54
At3g62300	251256_at	346,47	290,67	173,21	240,74	237,47	253,62	203,25	239,68	1,54
At1g78270	260799_at	155,85	168,24	112,37	97,19	85,95	116,71	118,53	122,66	1,55
At1g11940	257422_at	88,93	104,65	64,67	59,96	73,64	92,15	108,78	108,48	1,55
At5g36170	249691_at	929,37	998,96	598,12	643,15	809,46	719,69	736,43	899,73	1,55
At5g13690	250245_at	387,00	287,45	204,92	228,74	304,21	392,46	339,23	343,11	1,56
At4g32350	253478_at	211,50	178,58	109,85	140,07	215,02	191,87	238,18	191,79	1,56
At3g06140	256400_at	125,50	110,28	75,14	74,79	98,00	109,24	77,82	76,47	1,57
At3g57980	251615_at	88,55	87,77	48,60	62,08	50,27	55,50	69,71	69,46	1,59
At1g13050	262778_at	58,19	76,12	45,37	38,93	75,45	66,68	86,74	101,36	1,59
At5g07000	250657_at	359,04	193,27	165,54	179,15	576,98	452,06	470,84	451,31	1,60
At1g19530	260668_at	236,71	175,43	121,35	132,78	298,55	276,88	263,69	221,77	1,62
At1g31290	262549_at	22,22	32,77	20,14	13,59	45,50	39,70	57,78	49,47	1,63
At2g17880	264788_at	171,83	301,00	104,86	183,16	434,29	254,86	374,07	335,71	1,64
At2g43050	265246_at	491,29	563,64	345,53	296,43	750,33	516,82	539,96	474,40	1,64

	At4g35720	253155_at	106,25	136,82	64,12	75,88	133,42	146,73	138,62	104,39	1,74
	At1g68780	260041_at	222,98	210,11	111,98	135,39	165,44	177,31	173,15	127,24	1,75
	At2g39980	267337_at	1020,09	998,89	588,34	556,08	913,00	1022,33	1041,96	940,75	1,76
	At1g12460	259531_at	160,19	150,57	77,62	95,52	134,41	129,61	163,39	127,45	1,79
	At1g02720	260928_at	72,38	62,35	46,87	26,72	74,93	98,48	87,71	88,64	1,83
	At5g51810	248371_at	110,11	92,21	52,64	50,81	124,85	130,38	82,85	117,12	1,96
	At3g44140	252665_at	392,93	338,98	177,52	156,00	199,79	205,75	293,13	271,29	2,19
	At3g03840	259331_at	40,84	11,08	12,74	10,19	65,20	51,04	63,65	52,22	2,26
	At5g18060	250012_x_at	111,72	104,16	48,49	38,98	216,52	297,42	284,01	216,10	2,47
	At2g27690	266246_at	103,44	106,63	45,16	22,59	108,28	63,57	98,19	83,34	3,10
	At2g30560	267525_at	140,41	183,50	43,25	54,47	78,70	33,21	111,03	42,96	3,31
	At2g21910	263894_at	71,79	34,99	4,80	22,61	119,85	108,77	132,14	87,72	3,90

Regulados por BBX24 (efecto genotipo)	At3g46860	252500_at	3,55	4,01	34,28	41,50	17,89	3,80	4,34	4,66	
	At4g19690	254550_at	67,90	52,51	203,18	313,39	2,89	23,31	33,18	90,03	
	At4g35180	253181_at	8,37	27,42	71,53	68,38	35,66	10,43	9,54	11,76	
	At1g53490	260973_at	9,78	31,95	79,22	60,55	27,46	17,68	85,64	78,31	
	At1g12210	260996_at	7,67	36,96	74,70	60,13	27,96	21,26	52,78	64,35	
	At3g32270	256641_at	20,87	8,37	37,44	46,76	82,10	76,36	59,01	25,56	
	At5g04970	250802_at	43,68	19,93	67,45	96,55	11,81	8,01	41,55	45,87	
	At2g18820	266943_at	28,90	20,55	65,84	36,53	43,76	50,09	78,89	79,12	
	At3g46130	252534_at	65,52	45,08	119,96	92,70	86,52	83,27	53,61	62,02	
	At4g18250	254660_at	63,31	90,12	167,87	122,47	76,47	97,94	53,74	57,62	
	At5g26270	246888_at	365,19	333,01	686,00	608,99	388,06	426,55	721,38	552,02	
	At2g29460	266267_at	368,78	440,20	807,03	635,92	415,16	528,66	137,46	377,70	
	At1g10880	260473_at	42,89	52,49	88,63	80,82	30,96	5,98	22,35	51,91	
	At2g28570	264082_at	80,42	152,10	200,56	199,82	114,81	107,83	260,95	199,52	
	At3g18450	257720_at	39,97	43,53	73,92	69,29	2,86	3,66	29,98	69,20	
	At2g45400	245141_at	532,70	576,28	966,64	903,94	463,58	493,94	779,46	717,98	
	At3g55110	251826_at	47,63	69,20	108,05	87,31	53,90	85,61	110,59	128,51	
	At3g14280	258362_at	122,32	197,07	312,85	216,97	203,16	134,07	271,07	308,66	
	At2g17430	264905_at	74,64	104,28	163,67	125,02	168,42	173,55	108,54	115,15	
	At4g21380	254416_at	144,22	132,98	246,29	192,29	144,83	193,08	63,96	140,77	
	At1g54970	256352_at	238,17	200,56	339,36	353,79	111,19	209,58	187,93	332,40	
	At4g31470	253527_at	64,06	41,27	77,03	83,13	6,47	6,44	66,92	66,31	
	At3g06460	258912_at	344,76	405,94	520,97	609,24	267,55	400,16	566,76	580,47	
	At2g29660	266644_at	836,80	650,90	724,87	1504,24	744,54	662,74	1321,61	1454,55	
	At3g44780	252657_at	4,28	5,22	10,69	3,52	8,23	8,23	34,96	32,45	
	At5g48430	248703_at	194,05	216,36	319,06	293,33	91,63	130,47	102,21	239,15	

	At1g57630	246405_at	151,50	193,56	275,06	238,10	147,54	150,83	6,83	91,49
	At5g54370	248178_at	501,24	480,73	634,54	822,31	147,52	400,16	552,61	704,67
	At1g60060	263738_at	36,01	41,17	30,02	23,34	87,44	73,31	56,13	37,72
	At3g60280	251410_at	203,53	157,12	129,87	118,95	61,55	84,87	133,16	175,73
	At2g44460	267389_at	237,49	297,34	227,31	132,01	69,62	176,95	61,08	39,38
	At5g40460	249379_at	32,58	36,61	21,00	24,33	25,28	44,85	104,32	69,42
	At5g52640	248332_at	826,99	735,87	521,95	500,60	2261,50	1431,68	405,80	604,07
	At3g49920	252228_at	69,09	76,50	47,01	47,74	113,49	91,32	55,68	65,77
	At2g20560	263374_at	178,35	156,59	136,35	76,96	233,04	179,42	123,64	117,74
	At3g12580	256245_at	1816,61	1260,67	1087,35	868,46	3096,00	2965,13	1364,22	1197,07
	At5g59320	247717_at	374,75	343,91	220,04	225,46	509,13	371,72	190,34	171,79
	At5g03390	250920_at	39,78	57,52	31,44	28,57	45,12	62,74	9,89	7,11
	At1g16090	261836_at	134,57	147,74	83,44	84,68	158,80	114,25	91,33	79,93
	At2g32140	265723_at	110,89	139,00	88,51	52,49	62,76	72,34	11,34	44,78
	At3g46230	252515_at	351,04	244,78	188,85	146,34	1396,21	760,14	59,00	172,50
	At5g25240	246926_at	163,26	156,11	95,98	80,33	93,26	74,65	223,96	213,74
	At3g24500	258133_at	394,81	340,32	195,03	193,20	451,53	325,66	194,78	150,15
	At4g23280	254249_at	91,09	101,55	52,54	45,14	68,78	95,72	50,57	31,68
	At5g12030	250351_at	308,97	207,74	125,55	127,86	650,23	503,44	59,28	144,77
	At1g48660	256139_at	51,62	43,30	13,93	23,57	21,62	23,92	5,62	3,55
	At4g33720	253301_at	77,13	52,56	19,53	24,18	72,56	74,03	46,27	53,48
	AtMg01330	257331_at	38,97	40,60	12,84	13,96	79,88	57,78	25,61	10,29
	At1g02450	260904_at	44,95	11,38	3,64	10,23	26,22	17,80	60,32	63,30

Figura S1-II Longitud del hipocotilo de las diferentes líneas mutantes en oscuridad. Longitud del hipocotilo de plántulas creciendo en oscuridad contínua durante 5 días. Se evaluó plántulas de los genotipos salvajes Col y Ws, los mutantes simples *bbx24-1, bbx24-2, bbx25-1 y bbx25-2,* los dobles mutantes *bbx24-1bbx25-2* y *bbx24-2bbx25-1* y la línea sobre-expresante *BBX24ox.* NS: diferencias no significativas.

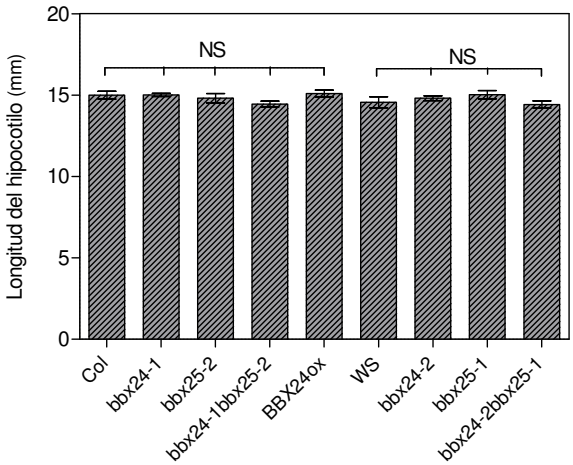


Figura S2-II. Efectos de las giberelinas exógena sobre los fenotipos mutantes *bbx24*. Se midió la longitud de los hipocotilos de plántulas *bbx24-1*, *bbx24-2*, Col y Ws crecidas en (a) luz blanca o (b) canopeo simulado sobre un medio sin suplemento (0,8⁄ agar:agua) o con suplemento de GA3 con tres concentraciones diferentes: 0.5uM, 1uM o 5uM de GA3. La barra negra indica las distintas concentraciones utilizadas comenzando desde el tratamiento control sin hormonas hasta la concentración de 5uM de GA3.

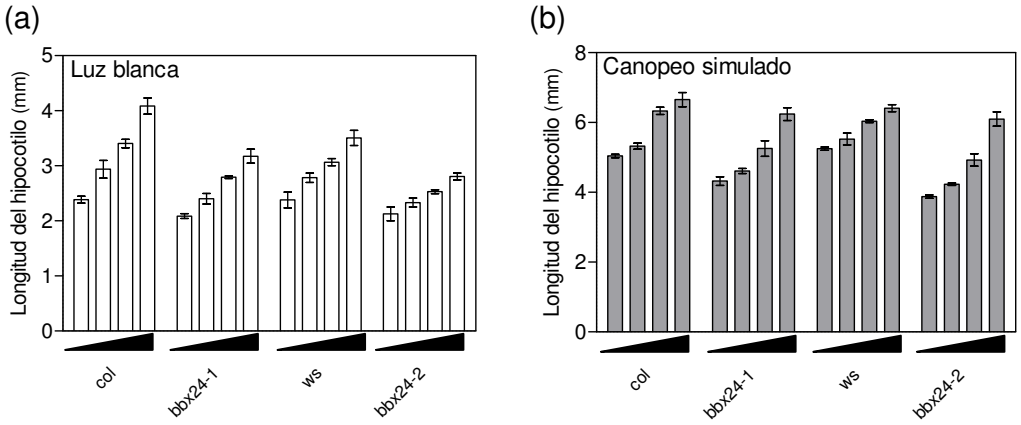
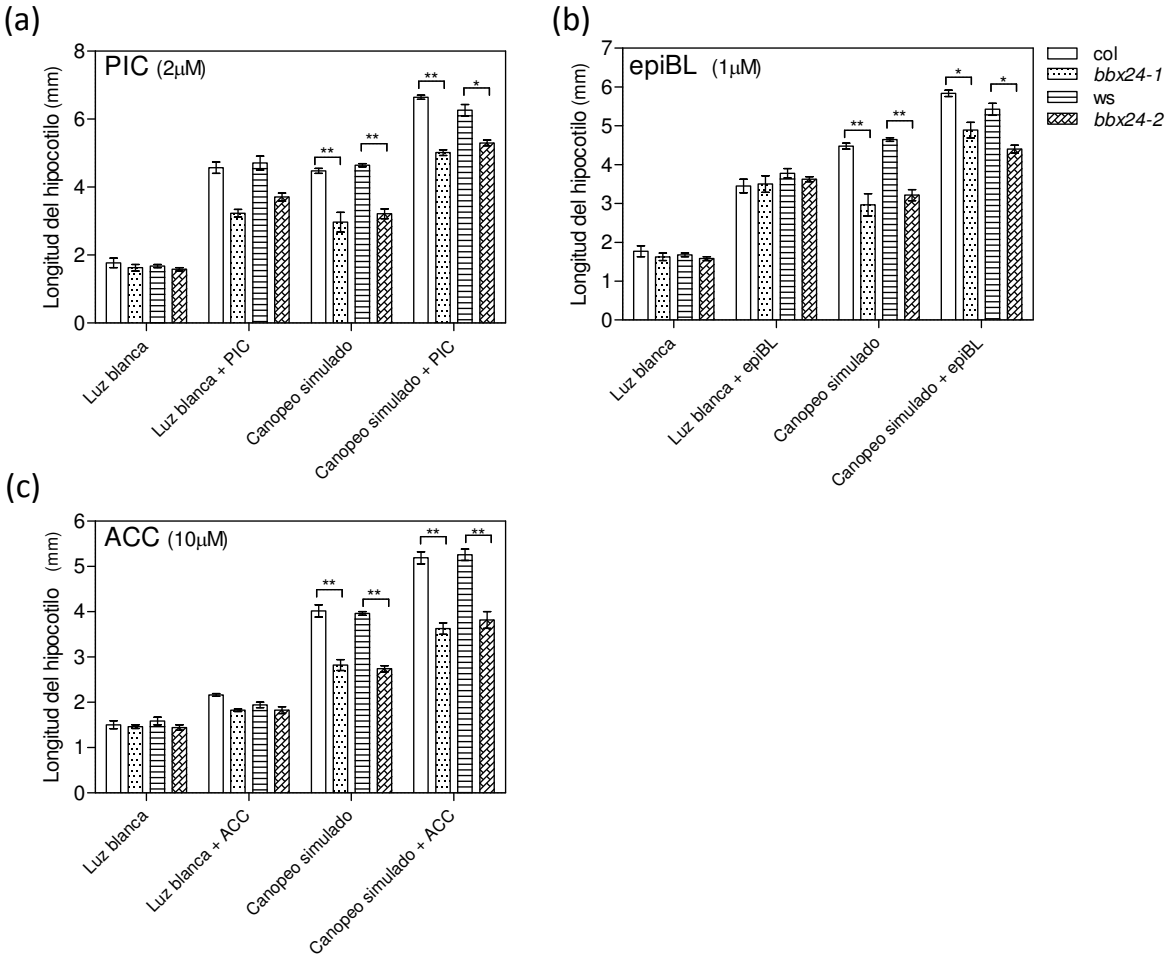


Figura S3-II. Efectos de las Auxinas, Brasinosteroides y Etileno sobre los fenotipos mutantes *bbx24*. Se midió la longitud de los hipocotilos en plántulas *bbx24-1*, *bbx24-2*, Col y Ws crecidas en luz blanca o canopeo simulado sobre un medio sin suplemento (0,8⁄ agar:agua) o con sumplemento de (a) Picloram (PIC), (b)EpiBrassinolide (EpiBS) o (c) Acido 1-aminociclopropano 1 carboxílico (ACC).



DISCUSIÓN GENERAL

En esta tesis se demostró que las proteínas BBX19, BBX21 y BBX22 actúan como reguladores negativos del crecimiento del hipocotilo en la respuesta de escape al sombreado, previniendo que la plántula desarrolle una respuesta de elongación exagerada (Figura 4). Adicionalmente, se demostró que BBX21 y BBX22 presentan funciones aditivas para esta respuesta. Por otro lado, BBX18 y BBX24 actúan como reguladores positivos del crecimiento del hipocotilo en ambientes de baja relación R:RL, mientras que BBX25 solo presenta el rol de regulador positivo en ausencia de BBX24 en sombra simulada (Figura 4 y 12). Esto indica que existe una complementación funcional entre BBX24 y BBX25 para promover la elongación del hipocotilo en ambientes con baja relación R:RL. A pesar de la alta similitud entre sus secuencias proteicas (Khanna et al., 2009), las proteínas BBX del grupo estructural IV modulan la elongación del hipocotilo en respuesta a la sombra cumpliendo funciones antagónicas, aditivas y complementarias.

Con el fin de comprender el mecanismo por el cual estas proteínas BBX intervienen en la regulación de las respuestas de escape al sombreado, se caracterizó genética y molecularmente al regulador negativo BBX21 y posteriormente al regulador positivo BBX24. Los datos obtenidos nos permitieron poner a prueba la hipótesis central de este trabajo: "Las proteínas del tipo BBX, pertenecientes al grupo estructural IV (BBX18-BBX25), intervienen en una de las vías de señalización por bajas relaciones R:RL modulando la expresión de un grupo común de genes".

Los resultados obtenidos en el marco de esta tesis nos permiten rechazar la hipótesis planteada porque: 1) Los análisis de clasificación funcional llevados a cabo con los genes regulados por BBX21 (Figura 10b) y por BBX24 (Figura 16b) mostraron que los enriquecimientos funcionales son diferentes entre ambos grupos. Además, al comparar todos los genes regulados por BBX21 (549 genes) con todos los regulados por BBX24 (299 genes) (Tabla S1-I y Tabla S1-II), se observó que BBX21 y BBX24 no regulan a un grupo significativo de genes en común durante la respuesta de escape al sombreado (información no mostrada). 2) Fisiológicamente, se demostró que BBX21 y BBX24 cumplen

roles antagónicos en la regulación del hipocotilo en condiciones de sombra prolongada, pero la caracterización del doble mutante *bbx21bbx24* permitió observar que la falta de BBX21 puede ser parcialmente compensada por la falta de BBX24 (Figura 23).

En esta tesis proponemos que las proteínas BBX podrían estar regulando el crecimiento del hipocotilo modulando la abundancia de PIF4 en el núcleo por dos vías independientes de acción (Diagrama 3). Mientras BBX21 actuaría modulando la transcripción de *PIF4*, BBX24 intervendría mediante un mecanismo que la regula la acción de PIF4 a nivel proteico. Este modelo supone que a mayores niveles de PIF4 libre en el núcleo se promoverán más los genes que codifican para factores de crecimiento, lo que se traducirá en una mayor elongación del hipocotilo bajo la sombra. Los niveles de PIF4 libre se encuentran principalmente regulados por la interacción PIF4-DELLA y por la interacción Pfr-PIF4 (De Lucas et al., 2008). En la sombra, el Pfr se fotoconvierte a Pr liberando al PIF4 y el complejo GA-GID1 ingresa al núcleo y promueve la degradación de las DELLA por medio del complejo SCF (Fu et al., 2004; Wang y Deng, 2011). Por otra parte, BBX24 también promovería la degradación de las DELLA mediante COP1, provocando la liberación de PIF4 por un mecanismo diferente al del Pr-PhyB y GA-GID1. El incremento de PIF4 libre en el núcleo provoca un aumento en la transcripción de genes que codifican para diferentes factores de crecimiento, promoviendo de esta forma la elongación del hipocotilo (De Lucas et al., 2008). Por otra parte, cuando la sombra es prolongada, BBX21 regula negativamente la elongación del hipocotilo para que no se produzca un crecimiento exagerado. En este modelo sugerimos que BBX21 podría suprimir la expresión de *PIF4*, lo cual provocaría la disminución de la síntesis *de novo* de la proteína que llevaría a reducir la abundancia de la proteína PIF4 en el núcleo. Sin embargo, BBX21 también podría regular los niveles de expresión de aquellos genes vinculados al crecimiento celular por una vía independiente a la de PIF4. De esta forma, BBX24 y BBX21 regularían la abundancia de la proteína PIF4 por medio de mecanismos antagónicos de regulación.

COP1 podría actuar como un integrador de las vías de señalización de BBX21 y BBX24 en sombra. Sabemos que BBX21 interacciona genéticamente, mientras que BBX24 interacciona física y genéticamente con COP1 (Holm et al., 2001; Crocco et al., 2010; Yan

et al., 2012). En esta tesis demostramos que si bien el mutante *cop1* no responde a la sombra, el triple mutante *bbx21bbx22cop1* recupera parcialmente el fenotipo de escape al sombreado (Figura 7). Según este modelo propuesto, en el mutante *cop1* las DELLA no se degradarían correctamente, por lo tanto el PIF4 quedaría retenido en la interacción PIF4-DELLA evitando el crecimiento del hipocotilo en la sombra. Sin embargo, en el triple mutante *bbx21bbx22cop1* la síntesis *de novo* de PIF4 aumentaría debido a que BBX21 y BBX22 no estarían reprimiendo la transcripción de *PIF4*. Esto podría causar una mayor abundancia de proteína PIF4 que de proteínas DELLA, por lo tanto parte del PIF4 estaría siendo reclutado en el complejo PIF4-DELLA y parte estaría libre en el núcleo para promover el crecimiento. Esto produciría la recuperación parcial del fenotipo a la sombra en el mutante *bbx21bbx22cop1*. De todas formas, no descartamos la posibilidad de que COP1 interaccione junto a BBX21 por otro mecanismo de acción, independiente al propuesto, para regular la respuesta de elongación del hipocotilo. Sin embargo, es necesario realizar nuevos experimentos para poner a prueba la existencia de este mecanismo general de regulación de PIF4, donde dos mecanismos de señalización operarían en forma independiente para modular la elongación del hipocotilo de plántulas de *Arabidoposis thaliana* cuando crecen en ambientes sombreados.

La información adquirida en el marco de esta tesis doctoral no solo contribuyó al conocimiento de la regulación molecular de las respuestas de escape al sombreado, sino que también contribuyó a la caracterización funcional de las proteínas BBX, asociando su acción a un nuevo proceso fisiológico en las plantas.

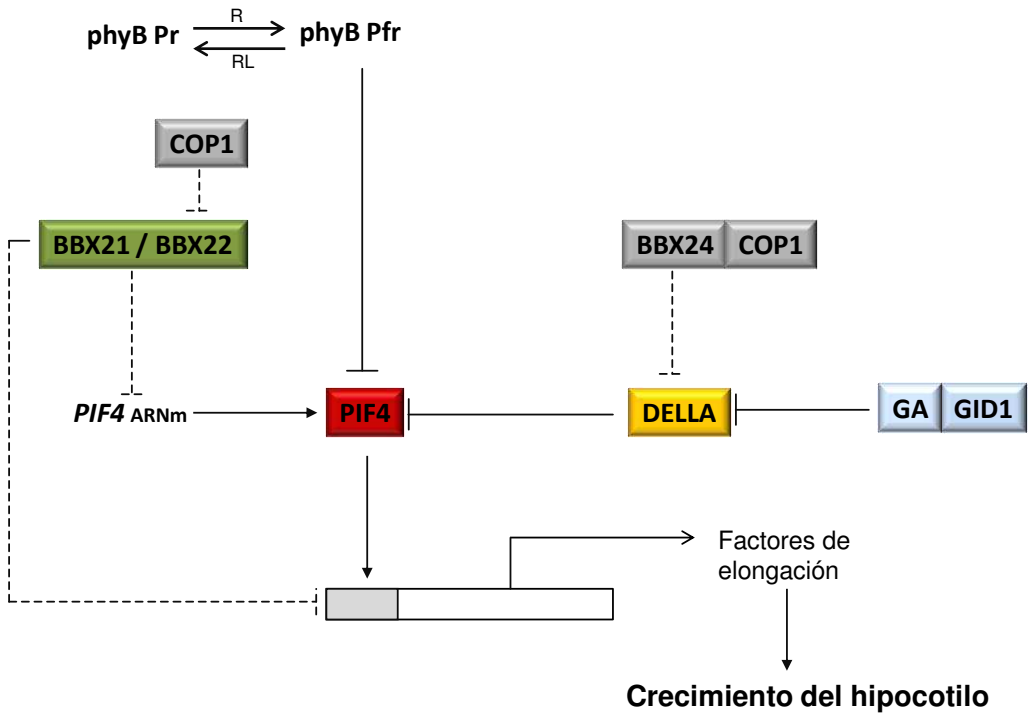


Diagrama 3 – Posible mecanismo de regulación de PIF4 mediado por las proteínas BBX.

EL diagrama muestra como diferentes vías de señalización pueden intervenir sobre la abundancia de PIF4 libre en el núcleo. Las DELLA reprimen la actividad de PIF4 reteniendo a esta proteína en la interacción PIF4-DELLA. Esta interacción se desestabilizaría luego de que COP1 produce una marcación sobre DELLA que sería reconocida por el proteosoma provocando su degradación. BBX24 sería un componente necesario para que COP1 pueda reconocer y marcar a las DELLA. El complejo GA-GID1 también promueve la degradación de las DELLA vía proteosoma. La actividad de PIF4 también se ve reprimida por la interacción PIF4-Pfr (forma activa del phyB), la cual conduce la degradación de PIF4. BBX21 y BBX22 regularían negativamente los niveles de PIF4 a nivel transcripcional y podrían regular a los genes que codifican para los factores de elongación por una vía independiente a la de PIF4. COP1 también podría intervenir en la regulación de BBX21 y BBX22. Las líneas sólidas (—) muestran las vías de señalización demostradas, mientras que las líneas punteadas (---) muestran las vías de señalización sugeridas.

BIBLIOGRAFÍA

Achard P, Vriezen WH, Van Der Straeten D, Harberd NP. (2003) Ethylene regulates arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. Plant Cell 15:2816-25.

Ahmad M (1999) Seeing the world in red and blue: insight into plant vision and photoreceptors. Curr Opin Plant Biol. 2: 230-235

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

Ahmad M, Jarillo JA, Cashmore AR (1998) Chimeric proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. Plant Cell 10: 197-208

Andel F, Lagarias JC and Mathies, R.A. (1996). Resonance raman analysis of chromophore structure in the lumi-R photoproduct of phytochrome. Biochemistry 35: 15997-16008.

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: 213–222.

Aukerman MJ, Hirschfeld M, Wester L, Weaver M, Clack T, Amasino RM, Sharrock RA. (1997) A deletion in the *PHYD* gene of the Arabidopsis Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/far-red light sensing. Plant Cell 9:1317–1326.

Bai MY, Shang JX, Oh E, Fan M, Bai Y, Zentella R, Sun TP, Wang ZY.(2012). Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in Arabidopsis. Nat Cell Biol. 14:810-7

Ballaré C.L., Scopel, A.L., Sánchez, R.A. (1990) Far-red reflected from adjacent leaves: an early signal of competition in plant canopies. Science 247:329-332.

Ballaré C.L., Scopel, A.L., Roush, M.L., Radosevich, S.R. (1995) How plants find light in patchy canopies. A comparison between wild-type and phytochrome-B-deficient mutant plants of cucumber. Functional Ecology 9:859-868.

Ballaré C.L., Casal, J.J. (2000) Light signals perceived by crop and weed plants. Field Crops Research, 67:149-160. Briggs, W.R., et al. (2001) The phototropin family of photoreceptors. Plant Cell 13:993–997.

Baudry A, Ito S, Song YH, Strait AA, Kiba T, Lu S, Henriques R, Pruneda-Paz JL, Chua NH, Tobin EM, Kay SA, Imaizumi T.(2010). F-box proteins FKF1 and LKP2 act in concert with ZEITLUPE to control Arabidopsis clock progression. Plant Cell 22:606-22.

Briggs WR, Christie JM, Salomon M. (2001) Phototropins: a new family of flavin-binding blue light receptors in plants. Antioxid Redox Signal 3:775-88.

Carabelli M, Morelli G, Whitelam G, Ruberti I. (1996) Twilight-zone and canopy shade induction of the Athb-2 homeobox gene in green plants.Proc Natl Acad Sci U S A. 93:3530-5.

Casal J.J. and Boccalandro H. (1995) Co-action between phytochrome B and HY4 in *Arabidopsis thaliana*. Planta 197:213-218.

Casal JJ.(2012) Shade avoidance. Arabidopsis Book. 2012;10:e0157.

Cashmore A.R., Jarillo J.A., Wu Y.J., and Liu D. (1999) Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. Science 284:760–765.

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

Chang CS, Li YH, Chen LT, Chen WC, Hsieh WP, Shin J, Jane WN, Chou SJ, Choi G, Hu JM, Somerville S, Wu SH (2008) LZF1, a HY5-regulated transcriptional factor, functions in Arabidopsis de-etiolation.Plant J. 54:205-19.

Chapman EJ, Greenham K, Castillejo C, Sartor R, Bialy A, Sun TP, Estelle M.(2012). Hypocotyl transcriptome reveals auxin regulation of growth-promoting genes through GA-dependent and -independent pathways. PLoS One 7:e36210.

Chen IC, Huang IC, Liu MJ, Wang ZG, Chung SS, Hsieh HL.(2007). Glutathione S-transferase interacting with far-red insensitive 219 is involved in phytochrome A-mediated signaling in Arabidopsis. Plant Physiol. 143:1189-202.

Cheng XF, Wang ZY (2005) Overexpression of COL9, a CONSTANS-LIKE gene, delays flowering by reducing expression of CO and FT in Arabidopsis thaliana. Plant J. 43:758-68.

Chory J (1992) A genetic model for light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. Development 115:337–354.

Clack T, Mathews S, Sharrock RA. (1994) The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of *PHYD* and *PHYE*. Plant Mol Biol. 25:413–427.

Clough SJ, Bent AF. (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana.Plant J. 16:735-43.

Clough RC, Vierstra RD. Phytochrome degradation (1997) Plant Cell Environ. 20:713–721.

Cole B, Kay SA, Chory J. (2010) Automated analysis of hypocotyl growth dynamics during shade avoidance in Arabidopsis. Plant J. 65:991-1000.

Coluccio MP, Sanchez SE, Kasulin L, Yanovsky MJ, Botto JF.(2011). Genetic mapping of natural variation in a shade avoidance response: ELF3 is the candidate gene for a QTL in hypocotyl growth regulation. J Exp Bot. 262:167-76.

Crocco CD, Holm M, Yanovsky MJ, Botto JF (2010) AtBBX21 and COP1 genetically interact in the regulation of shade avoidance. Plant J. 64:551-62.

Crocco CD, Holm M, Yanovsky MJ, Botto JF (2011) Function of B-BOX under shade. Plant Signal Behav. 6:101-4.

Datta S, Hettiarachchi GH, Deng XW, Holm M (2006) ArabidopsisCONSTANS-LIKE3 is a positive regulator of red light signaling and root growth. Plant Cell 18: 70–84.

Datta S, Hettiarachchi C, Johansson H, Holm M. (2007) SALT TOLERANCE HOMOLOG2, a B-box protein in Arabidopsis that activates transcription and positively regulates light-mediated development. Plant Cell 19:3242-55.

Datta S, Johansson H, Hettiarachchi C, Irigoyen ML, Desai M, Rubio V, Holm M (2008) LZF1/SALT TOLERANCE HOMOLOG3, an Arabidopsis B-box protein involved in light-dependent development and gene expression, undergoes COP1-mediated ubiquitination. Plant Cell 20:2324–2338.

de Lucas M, Davière JM, Rodríguez-Falcón M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blázquez MA, Titarenko E, Prat S. (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. Nature 451:480-4.

de Montaigu A, Tóth R, Coupland G.(2010). Plant development goes like clockwork. Trends Genet. 26:296-306.

Demarsy E, Fankhauser C. (2009). Higher plants use LOV to perceive blue light. Curr Opin Plant Biol. 12:69-74.

Deng XW, Quail PH. (1999) Signaling in light-controlled development. Semin Cell Dev Biol. 10:121–129.

Desgagné-Penix I, Sponsel VM.(2008). Expression of gibberellin 20-oxidase1 (AtGA20ox1) in Arabidopsis seedlings with altered auxin status is regulated at multiple levels. J Exp Bot.59:2057-70.

Devlin P.F., Rood S.B., Somers D.E., Quail P.H., and Whitelam, G.C. (1992) Photophysiology of the *elongated internode* (*ein*) mutant of *Brassica rapa*: *ein* mutant lacks a detectable phytochrome B-like protein. Plant Physiol. 100:1442–1447.

Devlin, P.F., Robson, P.R.H., Patel, S.R., Goosey, L.,Sharrock, R.A., Whitelam, G. (1999) Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in Arabidopsis by controlling elongation growth and flowering time. Plant Physiol. 119:909-916.

Devlin P.F., Yanovsky M.J. and Kay S.A. (2003) A genomic analysis of the shade avoidance response in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 133:1617-1629.

Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M. (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. Nature 435:441-5.

Djakovic-Petrovic T, de Wit M, Voesenek LA, Pierik R.(2007) DELLA protein function in growth responses to canopy signals.Plant J. 51:117-26.

Duek PD, Fankhauser C. (2003) HFR1, a putative bHLH transcription factor, mediates both phytochrome A and cryptochrome signalling. Plant J. 34:827-36.

Faigón-Soverna A, Harmon FG, Storani L, Karayekov E, Staneloni RJ, Gassmann W, Más P, Casal JJ, Kay SA, Yanovsky MJ.(2006). A constitutive shade-avoidance mutant implicates TIR-NBS-LRR proteins in Arabidopsis photomorphogenic development. Plant Cell 18:2919-28.

Fairchild CD, Schumaker MA, Quail PH. (2000) HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. Genes Dev. 14:2377-91.

Fan XY, Sun Y, Cao DM, Bai MY, Luo XM, Yang HJ, Wei CQ, Zhu SW, Sun Y, Chong K, Wang ZY.(2012). BZS1, a B-box protein, promotes photomorphogenesis downstream of both brassinosteroid and light signaling pathways. Mol Plant. 5:591-600.

Feng S., Martinez C., Gusmaroli G., Wang Y., Zhou J., Wang F., Chen L., Yu L., Iglesias-Pedraz J.M., Kircher S., Schafer E., Fu X., Fan L.M., and Deng X.W. (2008). Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. Nature 451:475-479.

Fleet CM, Sun TP (2005) A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis.Curr Opin Plant Biol. 8:77-85.

Franklin K.A., Praekelt U., Stoddart W.M., Billingham O.E., Halliday K.J. and Whitelam, G.C. (2003) Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in Arabidopsis. Plant Physiol. 131:1340–1346.

Franklin K.A. and Whitelam G.C. (2005) Phytochromes and shade avoidance responses in plants. Ann. Bot. (Lond.) 96: 169–175.

Frigerio M, Alabadí D, Pérez-Gómez J, García-Cárcel L, Phillips AL, Hedden P, Blázquez MA.(2006). Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in Arabidopsis. Plant Physiol. 142:553-63.

Friml J. (2003). Auxin transport - shaping the plant. Curr Opin Plant Biol. 6:7-12.

Fu X, Harberd NP. (2003) Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. Nature 421:740-3.

Fu X, Richards DE, Fleck B, Xie D, Burton N, Harberd NP.(2004). The Arabidopsis mutant sleepy1gar2-1 protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCFSLY1 E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates.Plant Cell 16:1406-18.

Gallego-Bartolomé J, Minguet EG, Grau-Enguix F, Abbas M, Locascio A, Thomas SG, Alabadí D, Blázquez MA. (2012). Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci USA. 109:13446-51.

Giuliano G, Pichersky E, Malik VS, Timko MP, Scolnik PA, Cashmore AR (1988) An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. Proc Natl Acad Sci USA 85:7089-7093.

Goosey L, Palecanda L, Sharrock RA. (1997) Differential patterns of expression of the *Arabidopsis* PHYB, PHYD, and PHYE phytochrome genes. Plant Physiol.115:959–969.

Griffiths S, Dunford RP, Coupland G, Laurie DA (2003) The evolution of CONSTANS-like gene families in barley, rice, and Arabidopsis. Plant Physiol 131: 1855–1867.

Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun TP, Thomas SG.(2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. Plant Cell 18:3399-414.

Gubler F, Jacobsen JV. (1992) Gibberellin-responsive elements in the promoter of a barley high-pI alpha-amylase gene.Plant Cell 4:1435-41.

Hennig L, Büche C, Eichenberg K, Schäfer E. (2009). Dynamic properties of endogenous phytochrome A in Arabidopsis seedlings. Plant Physiol. 121:571-7.

Holm M., Hardtke C.S., Gaudet R., and Deng X.W. (2001). Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of Arabidopsis COP1. EMBO J. 20: 118-127.

Holm M, Ma LG, Qu LJ, Deng XW. (2002) Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in Arabidopsis. Genes Dev. 16:1247-59.

Hornitschek P., Lorrain S., Zoete V., Michielin O., and Fankhauser C. (2009). Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. EMBO J. 28: 3893-3902.

Hudson ME, Quail PH.(2003)Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data.Plant Physiol. 133:1605-16.

Huq E., Tepperman J.M. and Quail P.H. (2000). GIGANTEA is a nuclear protein involved in phytochrome signaling in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 9789-9794.

Huq E, Quail PH (2002) PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in Arabidopsis. EMBO J. 21: 2441–2450.

Indorf M, Cordero J, Neuhaus G, Rodríguez-Franco M.(2007). Salt tolerance (STO), a stress-related protein, has a major role in light signalling. Plant J. 51:563-74.

Jang I.C., Yang J.Y., Seo H.S., and Chua N.H. (2005). HFR1 is targeted by COP1 E3 ligase for post-translational proteolysis during phytochrome A signaling. Genes Dev. 19: 593-602.

Jang S., Marchal V., Panigrahi K.C., Wenkel S., Soppe, W., Deng, X.W., Valverde, F., and Coupland, G. (2008). Arabidopsis COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. EMBO J. 27: 1277-1288.

Jang I.C., Henriques R., Seo H.S., Nagatani A., and Chua, N.H. (2010). Arabidopsis PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR proteins promote phytochrome B polyubiquitination by COP1 E3 ligase in the nucleus. Plant Cell 22: 2370-2383.

Jiang L, Wang Y, Li QF, Björn LO, He JX, Li SS.(2012). Arabidopsis STO/BBX24 negatively regulates UV-B signaling by interacting with COP1 and repressing HY5 transcriptional activity. Cell Res. 22:1046-57.

Johnson, E., Bradley, M., Harberd, N.P., and Whitelam, G.C. (1994) Photoresponses of light-grown phyA mutants of *Arabidopsis*. Plant Physiol. 105:141–149.

Keller MM, Jaillais Y, Pedmale UV, Moreno JE, Chory J, Ballaré CL. (2011) Cryptochrome 1 and phytochrome B control shade-avoidance responses in Arabidopsis via partially independent hormonal cascades. Plant J. 67:195-207.

Kepinski S, Leyser O. (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. Nature 435:446-51.

Keuskamp DH, Pollmann S, Voesenek LA, Peeters AJ, Pierik R. (2010) Auxin transport through PIN-FORMED 3 (PIN3) controls shade avoidance and fitness during competition.Proc Natl Acad Sci U S A. 107:22740-4.

Keuskamp DH, Sasidharan R, Vos I, Peeters AJ, Voesenek LA, Pierik R.(2011). Blue-light-mediated shade avoidance requires combined auxin and brassinosteroid action in Arabidopsis seedlings. Plant J. 67:208-17.

Keuskamp D, Keller M, Ballaré C, Pierik R. (2012) Blue light regulated shade avoidance. Plant Signal Behav. 7:514-517.

Khanna R., Kikis E.A., and Quail P.H. (2003). EARLY FLOWERING 4 functions in phytochrome B-regulated seedling de-etiolation. Plant Physiol. 133: 1530-1538.

Khanna R., Huq E., Kikis E.A., Al-Sady B., Lanzatella C., and Quail P.H. (2004). A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. Plant Cell 16: 3033-3044.

Khanna R, Kronmiller B, Maszle DR, Coupland G, Holm M, Mizuno T, Wu S-H (2009) The Arabidopsis B-box zinc finger family. Plant Cell 21:3416–3420

Kliebenstein DJ, Lim JE, Landry LG, Last RL. (2002) Arabidopsis UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human regulator of chromatin condensation 1.Plant Physiol. 130:234-43.

Koornneef M, Rolff E, Spruit CJP (1980) Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in Arabidopsis thaliana. Z. Pflanzenphysiol. 100:147–160.

Kumagai T, Ito S, Nakamichi N, Niwa Y, Murakami M, Yamashino T, Mizuno, T (2008) The common function of a novel subfamily of B-Box zinc finger proteins with reference to circadian-associated events in Arabidopsis thaliana. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72: 1539–1549.

Ledger S, Strayer C, Ashton F, Kay SA, Putterill J. (2001). Analysis of the function of two circadian-regulated CONSTANS-LIKE genes. Plant J. 26:15-22.

Li C and Wong HW (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: Expression index computation and outlier detection. Proc Natl Acad Sci U S A. 98:31-6.

Li J, Li G, Wang H, Wang Deng X. (2011). Phytochrome signaling mechanisms. Arabidopsis Book 2011.

Li L, Ljung K, Breton G, Schmitz RJ, Pruneda-Paz J, Cowing-Zitron C, Cole BJ, Ivans LJ, Pedmale UV, Jung HS, Ecker JR, Kay SA, Chory J.(2012) Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture. Genes Dev. 26:785-90.

Lin C., Yang H., Guo H., Mocker T., Chen J., and Cashmore A.R. (1998) Enhancement of blue light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:7686–7699.

Liscum E., and Hangarter R.P. (1991) Arabidopsis mutants lacking blue light-dependent inhibition of hypocotyl elongation. Plant Cell 3:685–694.

Liu Y.G., Mitsukawa N., Oosumi T., and Whittier R.F. (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. Plant J. 8:457–463.

Lorrain S, Allen T, Duek PD, Whitelam GC, Fankhauser C. (2008) Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. Plant J. 53:312-23.

Mancinelli AL. (1994) The physiology of phytochrome action. In: Kendrick RE, Kronenberg GHM. , editors. Photomorphogenesis in Plants, Ed 2. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 211–269.

Mazza CA, Boccalandro HE, Giordano CV, Battista D, Scopel AL, Ballaré CL. (2000)

McNellis TW, von Arnim AG, Araki T, Komeda Y, Miséra S, Deng XW. (1994). Genetic and molecular analysis of an allelic series of cop1 mutants suggests functional roles for the multiple protein domains. Plant Cell 6:487-500.

Meroni G, and Diez-Roux G (2005) TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. Bioessays 27: 1147–1157.

Menkens AE, Cashmore AR.(1994) Isolation and characterization of a fourth Arabidopsis thaliana G-box-binding factor, which has similarities to Fos oncoprotein.Proc Natl Acad Sci U S A 91:2522-6.

Monte E., Alonso J.M., Ecker J.R., Zhang Y., Li X., Young J., Austin-Phillips S., and Quail P.H. (2003) Isolation and characterization of phyC mutants in Arabidopsis reveals complex crosstalk between phytochrome signaling pathways. Plant Cell 15:1962–1980.

Nagaoka S, Takano T.(2003). Salt tolerance-related protein STO binds to a Myb transcription factor homologue and confers salt tolerance in Arabidopsis. J Exp Bot. 54:2231-7.

Nagatani A, Chory J, Furuya M. (1991) Phytochrome B is not detectable in the *hy3* mutant of *Arabidopsis*, which is deficient in responding to end-of-day far-red light treatments. Plant Cell Physiol. 32:1119–1122.

Nagatani A, Reed JW, Chory J. (1993) Isolation and initial characterization of *Arabidopsis* mutants that are deficient in phytochrome A. Plant Physiol. 102:269–277.

Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi-Tanaka M, Suzuki H, Katoh E, Iuchi S, Kobayashi M, Maeda T, Matsuoka M, Yamaguchi I.(2006). Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. Plant J. 46:880-9.

Niwa Y, Yamashino T, Mizuno T.(2009). The circadian clock regulates the photoperiodic response of hypocotyl elongation through a coincidence mechanism in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol. 50:838-54.

Nozue K., Covington M.F., Duek P.D., Lorrain S., Fankhauser C., Harmer S.L., and Maloof J.N. (2007). Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. Nature 448: 358-361.

O'Neill DP, Davidson SE, Clarke VC, Yamauchi Y, Yamaguchi S, Kamiya Y, Reid JB, Ross JJ.(2010). Regulation of the gibberellin pathway by auxin and DELLA proteins. Planta 232:1141-9.

Onouchi H, Igeño MI, Périlleux C, Graves K, Coupland G (2000) Mutagenesis of plants overexpressing CONSTANS demonstrates novel interactions among Arabidopsis flowering-time genes. Plant Cell 12:885-900.

Osterlund MT, Hardtke CH, Deng XW. (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated *Arabidopsis* development. Nature 405:462–466.

Parks BM, Quail PH. (1993) *hy*8, A new class of Arabidopsis long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. Plant Cell 5:39–48.

Pierik R, Whitelam GC, Voesenek LACJ, de Kroon H, Visser (2004) EJW: Canopy studies on ethylene-insensitive tobacco identify ethylene as a novel element in blue light and plant–plant signalling. Plant J. 38:310-319.

Piñeiro M, Gómez-Mena C, Schaffer R, Martínez-Zapater JM, Coupland G.(2003). EARLY BOLTING IN SHORT DAYS is related to chromatin remodeling factors and regulates flowering in Arabidopsis by repressing FT. Plant Cell 15:1552-62.

Provart, N.; Zhu, T.(2003). A Browser-based Functional Classification SuperViewer for Arabidopsis Genomics. Currents in Computational Molecular Biology, p271-272

Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G (1995) The CONSTANS gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. Cell 80:847-57.

Quail PH (1991) Phytochrome: a light-activated molecular swicht that regulates plant gene expression. Annu Rev Genet. 25:389-409.

Quail P.H. (1997). An emerging molecular map of the phytochromes. Plant Cell Environ. 20: 657-665.

Quail PH (2002) Phytochrome photosensory signalling networks. Nat Rev Mol Cell Biol. 3:85–93.

Quail PH.(2008). The phytochrome family: dissection of functional roles and signalling pathways among family members.Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.353:1399-403.

Reed JW, Nagpal P, Poole DS, Furuya M, Chory J. (1993) Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development. Plant Cell 5:147–157.

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

Reed J.W., Nagpal P., Bastow R.M., Solomon K.S., Dowson-Day M.J., Elumalai R.P., and Millar A.J. (2000). Independent action of ELF3 and phyB to control hypocotyl elongation and flowering time. Plant Physiol. 122: 1149-1160.

Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E, Baumeister R, Schäfer E, Nagy F, Jenkins GI, Ulm R.(2011) Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein.Science 332:103-6.

Robson F, Costa MM, Hepworth SR, Vizir I, Pineiro M, Reeves PH, Putterill J, Coupland G (2001) Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene CONSTANS demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. Plant J. 28:619–631.

Roig-Villanova I., Bou J., Sorin C., Devlin P.F., and Martinez-Garcia J.F. 2006. Identification of primary target genes of phytochrome signaling. Early transcriptional control during shade avoidance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 141: 85–96.

Roig-Villanova I, Bou-Torrent J, Galstyan A, Carretero-Paulet L, Portolés S, Rodríguez-Concepción M, Martínez-García JF. (2007)Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins. EMBO J. 26:4756-67.

Saijo Y, Sullivan JA, Wang H, Yang J, Shen Y, Rubio V, Ma L, Hoecker U, Deng XW (2003) The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. Genes Dev. 17:2642–2647.

Salter MG, Franklin KA, Whitelam GC (2003) Gating of the rapid shade-avoidance response by the circadian clock in plants. Nature 426:680–683.

Sambrook J et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition)

Sasidharan R, Chinnappa CC, Staal M, Elzenga JT, Yokoyama R, Nishitani K, Voesenek LA, Pierik R.(2010). Light quality-mediated petiole elongation in Arabidopsis during shade avoidance involves cell wall modification by xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases. Plant Physiol. 154:978-90

Sasidharan R, Chinnappa CC, Voesenek LA, Pierik R. (2008) The regulation of cell wall extensibility during shade avoidance: a study using two contrasting ecotypes of Stellaria longipes. Plant Physiol. 148:1557-69.

Sawa S, Ohgishi M, Goda H, Higuchi K, Shimada Y, Yoshida S, Koshiba T. (2002) The HAT2 gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in Arabidopsis. Plant J. 32:1011-22.

Sellaro R, Crepy M, Trupkin SA, Karayekov E, Buchovsky AS, Rossi C, Casal JJ. (2010). Cryptochrome as a sensor of the blue/green ratio of natural radiation in Arabidopsis. Plant Physiol. 154:401-9.

Seo H.S., Watanabe E., Tokutomi S., Nagatani A., and Chua N.H. (2004). Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. Genes Dev. 18: 617-622.

Serino G., and Deng X.W. (2003). The COP9 signalosome: regulating plant development through the control of proteolysis. Annu. Rev. Plant Biol. 54: 165-182.

Sessa G., Carabelli M., Sassi M., Ciolfi A., Possenti M., Mittempergher F., Becker, J., Morelli G., and Ruberti I. (2005) A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in *Arabidopsis*. Genes & Dev. 19: 2811–2815.

Sharrock R.A., and Quail P.H. (1989) Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: Structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. Genes Dev. 3:1745–1757.

Shen Y, Khanna R, Carle CM, Quail PH. (2007) Phytochrome induces rapid PIF5 phosphorylation and degradation in response to red-light activation. Plant Physiol. 145:1043-51.

Sieberer T, Seifert GJ, Hauser MT, Grisafi P, Fink GR, Luschnig C. (2000) Post-transcriptional control of the Arabidopsis auxin efflux carrier EIR1 requires AXR1. Curr Biol. 10:1595-8.

Smalle J, Haegman M, Kurepa J, Van Montagu M, Straeten DV. (1997) Ethylene can stimulate Arabidopsis hypocotyl elongation in the light. Proc Natl Acad Sci U S A. 94:2756-61.

Smith H., and Whitelam G.C. (1997). The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. Plant Cell Environ. 20: 840-844.

Smith H. (2000) Phytochromes and light signal perception by plants—An emerging synthesis. Nature 407: 585–591.

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

Song SH, Dick B, Penzkofer A, Pokorny R, Batschauer A, Essen LO. (2006) Absorption and Fluorescence Spectroscopic Characterization of Cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana.* Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 85:1-16.

Staiger D, Allenbach L, Salathia N, Fiechter V, Davis SJ, Millar AJ, Chory J, Fankhauser C.(2003). The Arabidopsis SRR1 gene mediates phyB signaling and is required for normal circadian clock function. Genes Dev. 17:256-68.

Steindler C, Matteucci A, Sessa G, Weimar T, Ohgishi M, Aoyama T, Morelli G, Ruberti I (1999) Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-Zip protein, a negative regulator of gene expression. Development 126: 4235-4245.

Sun J, Qi L, Li Y, Chu J, Li C.(2012). PIF4-mediated activation of YUCCA8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating arabidopsis hypocotyl growth. PLoS Genet. 8:e1002594.

Tao Y, Ferrer JL, Ljung K, Pojer F, Hong F, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Ivans LJ, Cheng Y, Lim J, Zhao Y, Ballaré CL, Sandberg G, Noel JP, Chory J. (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. Cell 133:164-76.

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G.(2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc Natl Acad Sci U S A. 98:5116-21.

Ulm R, Baumann A, Oravecz A, Máté Z, Adám E, Oakeley EJ, Schäfer E, Nagy F.(2004) Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A. 101:1397-402.

Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ. (1999) Activation and repression of transcription by auxin-response factors.Proc Natl Acad Sci U S A 96:5844-9.

Vandenbussche F, Vriezen WH, Smalle J, Laarhoven LJ, Harren FJ, Van Der Straeten D. (2003). Ethylene and auxin control the Arabidopsis response to decreased light intensity. Plant Physiol. 133:517-27.

Wagner D, Hoecker U, Quail PH.(1997). RED1 is necessary for phytochrome B-mediated red light-specific signal transduction in Arabidopsis. Plant Cell 9:731-43.

Wang ZY, Kenigsbuch D, Sun L, Harel E, Ong MS, Tobin EM (1997) A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an Arabidopsis Lhcb gene.Plant Cell 9:491-507.

Wang H, Deng XW.(2002) Arabidopsis FHY3 defines a key phytochrome A signaling component directly interacting with its homologous partner FAR1. EMBO J. 21:1339-49.

Wang H, Deng XW. (2004) Phytochrome signaling mechanisms. In: The Arabidopsis Book—Somerville CR, Meyerowitz EM, eds. 2004 Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists.

Wang Q, Zeng J, Deng K, Tu X, Zhao X, Tang D, Liu X.(2011). DBB1a, involved in gibberellin homeostasis, functions as a negative regulator of blue light-mediated hypocotyl elongation in Arabidopsis. Planta 233:13-23.

Wang F, Deng XW.(2011). Plant ubiquitin-proteasome pathway and its role in gibberellin signaling.Cell Res. 21:1286-94.

Whitelam GC, Johnson E, Peng J, Carol P, Anderson ML, Cowl JS, Harberd NP. (1993) Phytochrome A null mutants of Arabidopsis display a wild-type phenotype in white light. Plant Cell 5:757-68.

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

Yang J, Lin R, Sullivan J, Hoecker U, Liu B, Xu L, Deng XW, Wang H.(2005). Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in Arabidopsis. Plant Cell 17:804-21.

Yan H, Marquardt K, Indorf M, Jutt D, Kircher S, Neuhaus G, Rodríguez-Franco M (2011) Nuclear localization and interaction with COP1 are required for STO/BBX24 function during photomorphogenesis.Plant Physiol.156:1772-82.

Yanovsky M, Casal J. and Whitelam G. (1995) Phytochrome A, phytochrome B and HY4 are involved in hypocotyl growth responses to natural radiation in Arabidopsis:Weak de-etiolation of the phyA mutant under dense canopies. Plant Cell Environ. 18:788–794.

Yanovsky MJ, Casal JJ, Luppi JP. (1997) The VLF loci, polymorphic between ecotypes Landsberg erecta and Columbia, dissect two branches of phytochrome A signal

transduction that correspond to very-low-fluence and high-irradiance responses. Plant J. 12:659-67.

Yi C., and Deng X.W. (2005). COP1 - from plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis. Trends Cell Biol. 15: 618-625.

Zhu D., Maier A., Lee J.H., Laubinger, S., Saijo, Y., Wang, H., Qu, L.J., Hoecker, U., and Deng, X.W. (2008). Biochemical characterization of Arabidopsis complexes containing CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1 and SUPPRESSOR OF PHYA proteins in light control of plant development. Plant Cell 20: 2307-2323.