

Tesis Doctoral

# Mecanismos de acción de COP1 en la respuesta de las plantas al sombreado

Pacín, Manuel

2017

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pacín, Manuel. (2017). Mecanismos de acción de COP1 en la respuesta de las plantas al sombreado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6167\\_Pacin](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6167_Pacin)

Cita tipo Chicago:

Pacín, Manuel. "Mecanismos de acción de COP1 en la respuesta de las plantas al sombreado". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017.  
[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6167\\_Pacin](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6167_Pacin)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

## **Mecanismos de acción de COP1 en la respuesta de las plantas al sombreado**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

**Manuel Pacín**

Director de tesis: Dr. Jorge José Casal  
Consejero de Estudios: Dr. Pablo Cerdán

Lugar de trabajo: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FISIOLÓGICAS Y ECOLÓGICAS VINCULADAS A LA AGRICULTURA (IFEVA), FAUBA-CONICET.

Buenos Aires, 2017

## Mecanismos de acción de COP1 en la respuesta de las plantas al sombreado

### Resumen:

El crecimiento y el desarrollo de las plantas se encuentran fuertemente influenciados por el ambiente luminoso que las rodea. Las señales de sombreado por plantas vecinas desencadenan respuestas como el aumento del crecimiento del tallo. CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) es una E3 ligasa involucrada en la ubiquitinización de proteínas dirigidas a degradación. En plántulas crecidas en oscuridad, COP1 se acumula en el núcleo y la exposición a la luz causa la migración de COP1 al citosol. Si bien COP1 es también necesario para que se produzca la respuesta de crecimiento a las señales de sombra, sus mecanismos de acción en esta condición no han sido dilucidados. Los resultados expuestos en este trabajo muestran que COP1 se acumula en el núcleo en sombra natural y sombra simulada, sugiriendo un rol activo en la señalización de la sombra.

Las proteínas PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR (PIF) son factores de transcripción centrales en la regulación de la señalización de la sombra y la promoción del crecimiento del tallo a través de las auxinas. Estudiamos la posible convergencia de la vía de señalización de los PIF con COP1 mediante el análisis del transcriptoma, los niveles de auxinas y distintas respuestas fisiológicas. Las proteínas HY5 y HFR1 son blancos moleculares de COP1 antes que las plántulas sean expuestas a la luz por primera vez. Ambos regulan negativamente la actividad de los PIF mediante diferentes mecanismos. Los resultados presentados demostraron que COP1 regula negativamente los niveles de HFR1, pero no de HY5, en condiciones de sombra, por lo que proponemos que este sería un punto convergencia entre ambas vías de señalización. Finalmente, mostramos que COP1 también regularía negativamente los niveles de proteínas DELLA, que son claves en la señalización de giberelinas e inhiben la acción de los PIF formando heterodímeros.

**Palabras clave:** *Arabidopsis thaliana*, respuesta al sombreado  
CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1), PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF), ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5), LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED (HFR1).

## Mechanisms of action of COP1 on the response of plants to shade

### Abstract:

Plant growth and development are highly influenced by the light environment. Neighbour plant signals lead to responses like enhanced stem growth. CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) is an E3 ligase involved in the ubiquitin labeling of proteins targeted for degradation. In dark-grown seedlings, COP1 accumulates in the nucleus and light exposure causes COP1 migration to the cytosol. Although COP1 is also necessary for the growth response to shade signals, its mechanisms of action in this condition have not been elucidated. Here, we show that in *Arabidopsis thaliana*, COP1 accumulates in the nucleus under natural or simulated shade.

PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS (PIF) are key transcriptional factors in shade signalling and growth control by modifying auxin levels. We studied the possible convergence among PIF and COP1 pathways by comparing their transcriptome, auxin levels and different physiological outputs. HY5 and HFR proteins are molecular targets of COP1 before the seedlings are exposed to light by the first time. Both negatively regulate PIF activity through different mechanisms. Our results demonstrate that COP1 negatively regulates HFR1 levels, but not HY5, in shade conditions. We propose that this would be a convergence point between both signaling pathways. Finally, we show that COP1 also negatively regulates DELLA protein levels, central regulators of gibberellins signaling that inhibit the PIF action forming heterodimers.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*, shade avoidance  
CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1), PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF), ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5), LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED (HFR1).

Tres capítulos de esta tesis han sido publicados en revistas científicas. Los resultados del capítulo 1 fueron publicados por Manuel Pacín, Martina Legris y Jorge J. Casal en “*COP1 re-accumulates in the nucleus under shade*”, *The Plant Journal*, 2013; del capítulo 2 por Manuel Pacín, Martina Legris y Jorge J. Casal en “*Rapid decline in nuclear COP1 abundance anticipates the stabilisation of its target HY5 in the light*”, *Plant Physiology*, 2014; y del capítulo 3 por Manuel Pacín, Mariana Semmoloni, Martina Legris, Scott A. Finlayson y Jorge J. Casal en “*Convergence of CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 and PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR signalling during shade avoidance*”, *New Phytologist*, 2016. Los resultados del capítulo 4 no han sido publicados.

## Índice

Resumen .....	2
Abstract .....	3
Índice .....	5
Agradecimientos .....	7
Introducción .....	8
Percepción y respuestas a las señales de sombra .....	9
La red de señalización de los PIF .....	10
Principales vías hormonales involucradas en la respuesta al sombreado .....	12
CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) .....	13
Objetivos .....	15
Materiales y métodos .....	16
Material vegetal .....	17
Tratamientos lumínicos .....	19
Microscopía .....	20
Crecimiento del hipocotilo .....	21
RT-PCR cuantitativa .....	21
Determinación de niveles de clorofila y antocianinas .....	22
Determinación de niveles Ácido indol-3-acético (IAA) .....	22
Tinción de $\beta$ -glucuronidasa (GUS) .....	23
Análisis de la expresión génica por microarreglos .....	23
Blots de proteínas .....	23
Análisis estadístico .....	24
Resultados .....	26
<i>Capítulo 1: COP1 en la respuesta al sombreado, evidencias genéticas y localización subcelular</i> .....	27
COP1 y SPA son necesarios para la respuesta al sombreado .....	29
COP1 se acumula en el núcleo en sombra simulada y sombra natural .....	32
Patrón diario de abundancia nuclear de COP1 .....	34
Rápida re-acumulación de COP1 en el núcleo en respuesta a la sombra .....	36
La reducción tanto de la luz azul como la luz roja inducen la acumulación nuclear de COP1 .....	38
El patrón diario de sensibilidad a la sombra requiere niveles normales de COP1 .....	39
Sensibilidad diaria de la acumulación de COP1 en respuesta a la sombra .....	41
La sensibilidad diurna del crecimiento a la sombra requiere patrones normales de expresión de <i>CSN1/FUS6</i> .....	42
<i>Capítulo 2: Cinética de localización sub-celular de COP1 durante la desetiología</i> .....	44
Rápida caída de YFP-COP1 nuclear inducida por luz .....	46
Hay un retraso en la estabilización de HY5 inducida por luz .....	47
<i>Capítulo 3: Convergencia de las vías de señalización de COP1 y PIFs</i> .....	50
A pesar de su fenotipo severo para la respuesta al sombreado, <i>cop1-4</i> retiene un conjunto significativo de respuestas a nivel transcripcional .....	51
Genes que fallaron en la respuesta a la sombra en el mutante <i>cop1-4</i> .....	54
Genes afectados por la mutación <i>cop1-4</i> incluso en ausencia de sombra .....	55
Los mutantes <i>cop1-4</i> y <i>cop1-6</i> retienen respuestas fisiológicas a la sombra .....	56
La sombra aumenta la convergencia entre las respuestas transcripcionales de <i>cop1</i> y <i>pifq</i> .....	57
Los niveles de auxinas no aumentan en <i>cop1</i> ni <i>pifq</i> en respuesta a la sombra .....	60
COP1 promueve la degradación de HFR1 en sombra, pero no de HY5 .....	62
La mutación <i>hfr1</i> rescata las respuestas al sombreado de <i>cop1</i> .....	66

Capítulo 4: COP1 regula la estabilidad de las proteínas DELLA.....	71
COP1 regula negativamente los niveles de RGA en la desetiología y la respuesta al sombreado .....	72
La reducción de los niveles de DELLAs revierte parcialmente el fenotipo de <i>cop1</i> en la respuesta al sombreado .....	74
Discusión .....	75
COP1 en la respuesta al sombreado.....	76
Mecanismos de inactivación de COP1 inducida por luz .....	77
COP1 en la vía de señalización de los PIFs.....	78
COP1 en la regulación de los niveles de DELLAs .....	81
Conclusión .....	81
Bibliografía.....	83
Anexo .....	99

**Agradecimientos:**

Quisiera agradecer a mi director Jorge Casal, por su permanente apoyo, motivación y buenos consejos durante mis años de formación, y a Romina Sellaro por su apoyo incondicional desde el primer día.

De la misma forma quiero agradecer a mis compañeros del grupo Casal y el labo grande por soportarme y acompañarme durante estos años.

También quiero agradecer a mis amigos de La Madrid y de la facultad por las alegrías y andanzas compartidas.

No puedo dejar de agradecer a mis padres y mis hermanos por estar siempre y ser mi ejemplo a seguir, y en especial a Luciana por su amor.



# Introducción

---

## Percepción y respuestas a las señales de sombra

La luz tiene un rol fundamental en el desarrollo vegetal, ya que además de ser esencial para la fotosíntesis, constituye una señal que brinda información sobre el ambiente. Las plantas perciben cambios en la calidad (longitud de onda), cantidad (irradiancia), duración (fotoperíodo) y dirección del estímulo lumínico, y utilizan esta información para ajustar su crecimiento y desarrollo a las condiciones lumínicas del ambiente, ejecutando respuestas adaptativas específicas que permiten optimizar el uso de la luz como recurso ambiental. Las señales lumínicas permiten a las plantas detectar situaciones ecológicas tan variadas como la proximidad a la superficie del suelo durante el proceso de emergencia, la presencia de plantas vecinas que representan un riesgo de sombreado futuro y la llegada de la estación climática favorable para su crecimiento y/o inducción floral, entre otros (Casal et al., 2003).

Las condiciones de **sombreado vegetal** implican tanto una reducción de la irradiancia como una alteración del espectro lumínico, que incluye una disminución de la relación entre la luz roja y rojo lejano (R:RL). Estas señales desencadenan respuestas de escape al sombreado, como el alargamiento del tallo, y respuestas de aclimatación, que tienden a reducir el impacto de condiciones adversas que no pueden ser evitadas (Franklin, 2008; Martínez-García *et al.*, 2010; Casal, 2013).

Las señales de sombra son percibidas principalmente por el **fitocromo B** (phyB). Los fitocromos son fotorreceptores de luz roja y rojo lejano que contienen un tetrapirrol lineal como cromóforo (J., Li *et al.*, 2011). Los fitocromos se encuentran en dos formas foto-interconvertibles: la forma activa Pfr, que absorbe en la longitud de onda del rojo lejano, y la inactiva Pr, que absorbe en la longitud de onda del rojo (Vierstra and Zhang, 2011). En *Arabidopsis* se conocen cinco genes que codifican fitocromos (*PHYA* a *PHYE*), aunque phyA y phyB son claramente los más importantes. En condiciones de luz saturante, se establece un fotoequilibrio entre las formas Pr y Pfr, y la proporción de Pfr en el fotoequilibrio depende de la relación rojo: rojo lejano (R:RL) (Holmes and Smith, 1977; Smith *et al.*, 1990). La forma Pfr también puede revertir a la forma Pr en un proceso más lento y que no requiere de la absorción de luz, conocido como reversión oscura (Elich and Chory, 1997; Hennig *et al.*, 2001). Este proceso de reversión es termodependiente, por lo que se sugiere que phyB podría participar en la percepción de la temperatura (Jung *et al.*, 2016; Legris *et al.*, 2016). Además, la forma Pfr puede ser degradada por el proteosoma 26S mediante un proceso que implica la unión covalente de moléculas de ubiquitina a las moléculas de fitocromo; esta

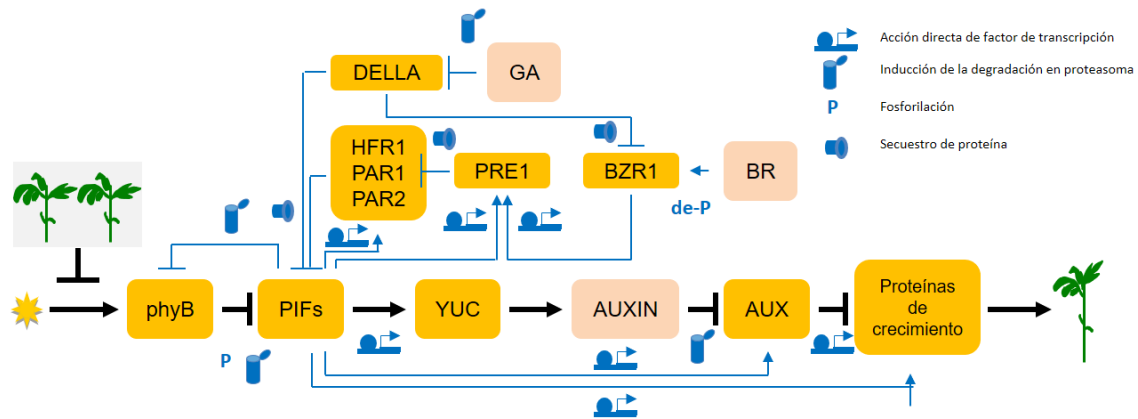
reacción es catalizada por la enzima CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 (COP1) en el caso de phyA y phyB (Jang et al., 2010; Seo et al., 2004).

En Arabidopsis, el **criptocromo 1** (cry1) y en segundo lugar cry2 participan en las respuestas al sombreado. Los criptocromos son receptores de luz azul tipo fotoliasa (Yu et al., 2010) . Su actividad aumenta con los niveles de luz azul y por lo tanto los criptocromos son sensores de los niveles de irradiancia modificados por el nivel de sombreado. Se han descrito respuestas de escape al sombreado generadas por cambios en la relación azul/verde que requieren la acción de los criptocromos (Sellaro et al., 2010) pero las bases moleculares de esta dependencia es materia de debate (Banerjee et al., 2007; Bouly et al., 2007; Liu et al., 2010).

Si bien phyB, y en segundo lugar cry1 son los fotorreceptores más importantes de la respuesta al sombreado, la sombra vegetal también reduce la irradiancia de UV-B y este cambio podría ser percibido por el fotorreceptor **UVR8** (Rizzini et al., 2011) y este desencadenar respuestas a la sombra (Ballaré et al., 1991). Los canopeos son heterogéneos y crean gradientes horizontales que pueden ser percibidos por las **fototropinas** (Briggs and Christie, 2002).

### **La red de señalización de los PIF**

En Arabidopsis, la vía de señalización de phyB tiene como elemento central las proteínas **PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR (PIF)** (Fig. 1). Los PIFs son factores de transcripción del tipo hélice-bucle-hélice básico que unen la forma activa de phyB (algunos también unen phyA) en el núcleo y como resultado de esta interacción son rápidamente fosforilados, aparentemente ubiquitinizados y finalmente degradados en el proteasoma (Leivar and Quail, 2011). La baja relación R:RL disminuye actividad de phyB, promoviendo la acumulación de PIF4 y PIF5 (Lorrain et al., 2008). Una mayor actividad de los PIFs se traduce en la activación directa de la expresión de genes **YUCCA**, relacionados con la biosíntesis de auxinas, y otros genes relacionados al crecimiento del tallo (Fig. 1). Se ha reportado que los criptocromos interaccionan directamente con PIF4 y PIF5, y afectan su actividad como factores de transcripción (Pedmale et al., 2016).



**Figura 1: Red de señalización de los PIFs en la respuesta al sombreado.** Esquema modificado de Casal 2013. GA: giberelinas; BR: brasinoesteroides; AUXIN: auxinas; YUC: genes *YUCCA*.

Los genes bHLH ***LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED LIGHT (HFR1)***, ***PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED 1 (PAR1)*** y ***PAR2*** son reguladores negativos de la respuesta al sombreado cuya expresión es promovida por las señales de sombra, generando un *feedback* negativo (Fig. 1). Las proteínas HFR1, PAR1 y PAR2 carecen de los dominios típicos necesarios para el pegado a los motivos E-box y G-box en los promotores de genes blanco. HFR1 forma heterodímeros con PIF4 y PIF4, evitando su pegado al ADN y por lo tanto su actividad biológica (Hornitschek *et al.*, 2009). El mecanismo de acción de PAR1 sería similar al de HFR1 (Galstyan *et al.*, 2011). De manera similar, las **proteínas DELLA** actúan impidiendo el pegado de PIF4 y PIF3 al ADN (de Lucas *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008). Recientemente se ha reportado que las DELLAs podrían incluso regular negativamente la estabilidad de los PIFs (Zheng *et al.*, 2016).

Las giberelinas y brasinoesteroides favorecen la actividad de los PIFs. Las giberelinas promueven la degradación de las DELLAs. Los brasinoesteroides estabilizan a BZR1, activando la transcripción de ***PACLOBUTRAZOL RESISTANCE1 (PRE1)***, que secuestra a los principales reguladores negativos de los PIFs.

## Principales vías hormonales involucradas en la respuesta al sombreado

Casi todas las fitohormonas se encuentran involucradas o son afectadas por las respuestas a las señales de sombra. Las mutaciones que afectan la síntesis, transporte o percepción de **auxinas** impiden la promoción del crecimiento del hipocotilo por la baja relación R:RL (Tao *et al.*, 2008; Friml *et al.*, 2002; Sieberer *et al.*, 2000; Kepinski and Leyser, 2005; Keuskamp *et al.*, 2010). La baja relación R:RL promueve los niveles de auxina libre (Tao *et al.*, 2008) en la plántula, la expresión de genes asociados al transporte de auxinas como *PIN-FORMED 3 (PIN3)* y *PIN7*, y los genes de los factores de transcripción inducidos por auxinas *INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 1 (IAA1)*, *IAA3*, *IAA5*, *IAA11* e *IAA19*, entre varios otros genes relacionados a las auxinas (Devlin *et al.*, 2003). La promoción de la expresión del factor de transcripción *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 2 (ATHB2) / HAT4* y *HAT2* (Carabelli *et al.*, 1993; Roig-Villanova *et al.*, 2006) podría afectar además la sensibilidad a las auxinas.

La biosíntesis de **giberelinas** es también necesaria para que se produzca la respuesta de crecimiento (Reed *et al.*, 1996; Djakovic-Petrovic *et al.*, 2007). Se ha detectado el aumento de los niveles de giberelinas inducidos por la baja relación (R:RL) (Bou-Torrent *et al.*, 2014). Se propone que las señales de sombra también podrían afectar la señalización de las giberelinas, ya que las bajas relaciones R:RL promueven la expresión de *GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE (GAI)*, y a su vez reducen la abundancia de las proteínas *DELLA* (Djakovic-Petrovic *et al.*, 2007). Las proteínas *DELLA GAI*, *REPRESSOR OF GA (RGA)*, *RGA-Like1 (RGL1)*, *RGL2* y *RGL3* son degradadas después de la activación del receptor de giberelinas (Sun, 2008).

En el caso de los **brasinoesteroides**, solo se observa una pérdida completa de la respuesta cuando se produce el bloqueo simultáneo de las vías de auxinas y brasinoesteroides (Keuskamp *et al.*, 2011). La expresión de varios genes *XYLOGLUCAN ENDOTRANS-GLUCOSYLASE /HYDROLASE (XTH)*, involucrados en la elongación celular, es promovida reduciendo la luz azul y la respuesta de algunos de esos genes requiere tanto la percepción de las auxinas o la síntesis de brasinoesteroides (Keuskamp *et al.*, 2011).

Un punto de integración de las vías de auxinas y brasinoesteroides involucra la fosforilación de *AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2)* por *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 (BIN2)*, una kinasa GSK3 regulada por brasinoesteroides (Vert *et al.*, 2008). Esto reduce el pegado al ADN y reprime la actividad de ARF2, llevando al aumento sinérgico de la transcripción de genes de respuesta a auxinas (Vert *et al.*, 2008) La expresión de *BRI1*

(Devlin *et al.*, 2003) y los factores de transcripción *ATHB4* y *HAT3* (Roig-Villanova *et al.*, 2006; Sorin *et al.*, 2009) es promovida por la baja relación R:RL.

## **CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1)**

**COP1** es una E3 ligasa de ubiquitina clave en la señalización de la luz. Fue el primer locus *COP/DET/FUS* clonado (Yi Deng, X.W., 2005; Deng *et al.*, 1992) y es uno de los mejor caracterizados. En plantas, la función de COP1 está muy relacionada a las vías de señalización de la luz. COP1 actúa como un represor central de dicha vía, donde promueve la ubiquitinización y degradación de los reguladores positivos, y se encuentra regulado por múltiples fotorreceptores. Más allá de la fotomorfogénesis, las investigaciones de los últimos años han fortalecido y expandido el rol de COP1 en otros procesos, en su mayoría relacionados a respuestas reguladas por luz. Estos procesos incluyen la floración (Liu *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008), los ritmos circadianos (Yu *et al.*, 2008), la señalización del UV-B (Favory *et al.*, 2009; Oravecz *et al.*, 2006), la apertura y desarrollo estomático (Mao *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2009), las respuestas a la sombra (Crocco *et al.*, 2010), las defensas (Jeong *et al.*, 2009), la inter-regulación entre la señalización de la luz y los brasinoesteroides (Luo *et al.*, 2014), la aclimatación al frío (Catalá *et al.*, 2011) y la elongación de la raíz inducida por luz en *Arabidopsis* (Dyachok *et al.*, 2011). En muchos de estos procesos, la participación de COP1 consiste en su interacción directa y ubiquitinización de factores regulatorios clave.

En oscuridad, COP1 ubiquitina para su posterior degradación factores de transcripción como **ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5)**, HFR1 y LONG AFTER FAR-RED LIGHT 1 (LAF1), conduciendo a la supresión de la fotomorfogénesis (Saijo *et al.*, 2003; Osterlund *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005; Duek *et al.*, 2004). En presencia de luz, los fotorreceptores activos reprimen la función de COP1 y permiten la acumulación de factores de transcripción que promueven la fotomorfogénesis, resultando en el desarrollo fotomorfogénico (Yi Deng, X.W., 2005). Un mecanismo bien establecido de inhibición de COP1 por la luz visible involucra su exportación del núcleo ante la exposición a la luz, impidiendo así de su actividad contra factores de transcripción localizados en el núcleo (von Arnim and Deng, 1994). Sin embargo, las cinéticas iniciales en las que se estudió la exclusión nuclear indicaron que esta sería relativamente lenta (aproximadamente 24 h), por lo cual esta estrategia podría representar solo una supresión a largo plazo de COP1 en condiciones extendidas de exposición a la luz (Yi Deng, X.W., 2005; von Arnim *et al.*, 1997).

Se cree que existe un mecanismo más rápido de regulación negativa de COP1 por los fitocromos y criptocromos, debido a que en 1 h pueden observarse cambios en el transcriptoma, inducidos por luz rojo lejana, roja y azul (Tepperman et al. 2001; Tepperman et al. 2004; Jiao et al. 2003). Además, una gran proporción de dichos genes son blancos directos de HY5, un sustrato de COP1 (Lee *et al.*, 2007). Congruentemente, la proteína HY5 se acumula rápidamente (en una hora) en tratamientos de luz rojo lejana (Li *et al.*, 2010). Uno de los objetivos de esta tesis será profundizar nuestro entendimiento sobre la exclusión de COP1 del núcleo como mecanismo de regulación negativa de su actividad nuclear. En el capítulo 1 se estudiará la localización nucleo-citoplasmática de COP1 en el contexto de la respuesta al sombreado, mientras que en el capítulo 2 se reevaluará específicamente la cinética de salida del núcleo de COP1 en el mismo contexto fisiológico (desetiolación) en el cual se realizaron los primeros estudios, hace ya dos décadas.

Algunos estudios muestran que la señalización de criptocromos involucran la interacción directa de COP1 y su proteína asociada **SPA1**. La interacción directa de COP1 y los criptocromos fue reportada hace dos décadas y es importante para la respuesta fotomorfogénica mediada por luz (Wang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001). Sin embargo, como dicha interacción no es dependiente de la luz, no está claro cómo los criptocromos activos pueden regular a COP1. Existen indicios sobre esto mostrando que cry1 y cry2 interaccionan con SPA1 en forma dependiente de la luz azul (B. Liu et al. 2011; Lian et al. 2011). Aunque los modos detallados de acción de cry1 y cry2 difieren, se cree que ambas interacciones criptocromo-SPA perturban la función del complejo E3 COP1-SPA y suprimen su actividad (B., Liu *et al.*, 2011; Fankhauser and Ulm, 2011). A diferencia de su rol en luz visible, COP1 es un regulador positivo de la señalización de UV-B (Oravec *et al.*, 2006). Ante la irradiación con UV-B, UVR8 se monomeriza e interacciona con COP1 (Favory *et al.*, 2009; Rizzini *et al.*, 2011). A través de un mecanismo desconocido promueven la expresión de *HY5*, que es responsable de la activación de un subgrupo de genes inducidos por UV-B (Heijde and Ulm, 2012). Además, COP1 está involucrado en un *loop* de regulación negativa de los fotorreceptores en luz, promoviendo la degradación de phyA, phyB y cry2 (Seo *et al.*, 2004; Shalitin *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2010). En el caso de phyA y phyB, COP1 es la E3 ligasa que promueve su ubiquitinización.

## Objetivos:

Esta tesis tiene como objetivo general analizar el posible rol de COP1 en la respuesta al sombreado en *Arabidopsis thaliana*. Los objetivos específicos son: analizar los posibles mecanismos de regulación de la actividad de COP1 por las señales de sombra, dilucidar su posible mecanismo de señalización y establecer los puntos de convergencia con las principales vías de regulación de la respuesta al sombreado, incluyendo la red de señalización de los PIFs y las principales hormonas.

Para su mejor comprensión, los resultados de esta tesis se han dividido en cuatro capítulos, que apuntan a cubrir los objetivos planteados. El capítulo 1 está dedicado al estudio de evidencias genéticas que destacan la importancia de *COP1* en las respuestas al sombreado, y a los cambios en su localización subcelular que den indicios sobre cambios en su actividad biológica. Hasta el momento, la relocalización de COP1 no se consideraba un mecanismo de respuesta rápida a los cambios en el ambiente lumínico, ya que los estudios originales, realizados hace dos décadas, indican que su exclusión del núcleo en la transición de oscuridad a luz blanca (desetiolación) es demasiado lenta para justificar los cambios subsiguientes a nivel molecular y fisiológico. El capítulo 2 se propone revisar esta concepción analizando su cinética de salida del núcleo, y la estabilización de HY5 (uno de sus principales blancos de degradación) durante la desetiolación.

El capítulo 3 se centrará en un estudio comparativo de las vías de señalización de COP1 y PIFs, reguladores centrales de la respuesta al sombreado. Se estudiará la posible vinculación de ambas vías de señalización a través de la regulación de la estabilidad de HY5 y HFR1, dos blancos de COP1 en oscuridad que por diferentes mecanismos inhiben la actividad de los PIFs. Finalmente, en el capítulo 4 se estudia la posible regulación de los niveles de proteínas DELLAs por parte de COP1. Las proteínas DELLAs son también reguladores negativos de la actividad de los PIFs, y son degradadas en presencia de giberelinas, por lo cual podrían ser un punto de convergencia entre la vía de señalización de COP1, las giberelinas y los PIFs



# Materiales y métodos

---

## Material vegetal

Mutantes en fondo genético Columbia (Col-0):

*cop1-4* (McNellis *et al.*, 1994)\*

*cop1-6* (McNellis *et al.*, 1994)\*

*cop1-6 phyB-9* (Boccalandro *et al.*, 2004)

*cop1-6 phyA-211* (Boccalandro *et al.*, 2004)

*phyB-9* (Reed *et al.*, 1993)

*phyA-211* (Reed *et al.*, 1994)

*phyA-211 phyB-9* (Reed *et al.*, 1994)

*cry1-304* (Guo *et al.*, 1999)

*cry2-1* (Guo *et al.*, 1999)

*cry1-304 cry2-1* (Guo *et al.*, 1999)

*spa2-1* (Laubinger *et al.*, 2004)

*spa3-1* (Laubinger *et al.*, 2004)

*spa4-1* (Laubinger *et al.*, 2004)

*hfr1-101* (Duek *et al.*, 2004)

*hfr1-201* (Kim *et al.*, 2002)

*cop1-4 hfr1-201* (Yang *et al.*, 2005)

*cop1-6 hfr1-201* (Yang *et al.*, 2005)

*hy5-211* (Shin *et al.*, 2007)

*pif3-3* (Monte *et al.*, 2004)

*pif4-101* (Lorrain *et al.*, 2008)

*pif5-3* (Lorrain *et al.*, 2008)

*pif4-101 pif5-3* (Lorrain *et al.*, 2008)

*hfr1-101 pif4-101 pif5-3* (Hornitschek *et al.*, 2009)

*pifq* (Leivar *et al.* 2008)

\**cop1-4* y *cop1-6* son considerados mutantes débiles de *COP1*. Las mutaciones fuertes producen letalidad embrionaria en homocigosis (McNellis *et al.*, 1994).

Mutantes en fondo genético RLD:

*spa1-3* (Hoecker *et al.*, 1998)

Líneas transgénicas en fondo genético Columbia (Col-0):

*cop1-4/Pro35S:YFP-COP1* (Oravecz *et al.*, 2006)

*ProHY5:HY5-YFP* (Oravecz *et al.*, 2006)

*ProHY5:LUC+* (Ulm *et al.*, 2004)

*hy5-211/35S:HY5-MYC* (Shin *et al.*, 2007)

*ProMSG2:GUS* (Kami *et al.*, 2014)

*35S:GFP-HFR1* (Yang *et al.*, 2005)

*cop1-6/35S:GFP-HFR1* (Yang *et al.*, 2005)

Líneas transgénicas en fondo genético Wassilewskija (Ws):

*fus6/FS1-3-4* (Wang *et al.*, 2009)

Líneas transgénicas en fondo genético Nossen (No-0):

*COP1OX1* (Boccalandro *et al.*, 2004)

*COP1OX2* (Boccalandro *et al.*, 2004)

Los dobles mutantes *cop1-4 pif3-3*, *cop1-6 pif3-3*, *cop1-4 pif4-101*, *cop1-6 pif4-101* y *cop1-4 hy5-211*, y el mutante *cop1-6* portando los transgenes *ProMSG2:GUS* y *35S:HY5-MYC*, fueron obtenidos por cruzamiento simple y genotipados por PCR o secuenciación (*cop1-4*, *cop1-6* y *hy5-211*) utilizando los primers detallados en la siguiente tabla:

Método	Locus	Alelo	Descripción	Primer	Secuencia
PCR	AT1G09530	<i>PIF3</i>	WT	Sense	AGAAGCAATTTGGTCACCATGCTC
PCR	AT1G09530	<i>PIF3</i>	WT	Antisense	TGCATACAAATAGTCGATCGTATG
PCR	AT1G09530	<i>pif3-3</i>	Delección	Sense	GGTGTGTATGTGAGAAGGTACATCCATCG
PCR	AT1G09530	<i>pif3-3</i>	Delección	Antisense	AAGCTTAGCTTTGGTGAGCCTGAAAAGCTC
PCR	AT2G43010	<i>PIF4</i>	WT	Sense	AATACATTTTGCAGGCAATCG
PCR	AT2G43010	<i>PIF4</i>	WT	Antisense	CGTAATGAAGTTGCACGTTTACTC
PCR	AT2G43010	<i>pif4-101</i>	Inserción	Sense	AATACATTTTGCAGGCAATCG
PCR	AT2G43010	<i>pif4-101</i>	Inserción	Antisense	TAGCATCTGAATTTATAACCAATCTCGATACAC
Secuenciación	AT2G32950	<i>cop1-6</i>	Sustitución	Sense	ACTAACAGTTCTGTGAATACTATGC
Secuenciación	AT2G32950	<i>cop1-6</i>	Sustitución	Antisense	ATAGCCTTCCCTCCGTACTAC
Secuenciación	AT2G32950	<i>cop1-4</i>	Sustitución	Sense	GCCACATGAGAAGAACCAGATTG
Secuenciación	AT2G32950	<i>cop1-4</i>	Sustitución	Antisense	TGAGTAGACAAGGAGGAACAAACC
Secuenciación	AT5G11260	<i>hy5-211</i>	Sustitución	Sense	TGTATCACCATTGATTCACATCTAG
Secuenciación	AT5G11260	<i>hy5-211</i>	Sustitución	Antisense	GCCGATCCAGATTCTCTACC

En todos los experimentos las plántulas crecieron en agar 0,8 % en cajas plásticas translúcidas. Las cajas fueron incubadas en oscuridad a 5 °C por 5 días y tratadas con 8 h de luz roja seguida de 16 h de oscuridad (22 °C) antes de los tratamientos. El fotoperiodo fue de 10 h.

### Tratamientos lumínicos

Las plántulas fueron crecidas en luz blanca, provista por una combinación de lámparas fluorescentes e incandescentes, con una relación R:RL característica de la luz solar (1,1), o en sombra simulada provista por las mismas fuentes de luz en combinación con dos filtros de acetato verde (Filtro LEE #089, <http://www.leefilters.com>) para reducir la luz azul, la luz roja y la relación R:RL. La distribución espectral de la luz fue medida con un espectrómetro USB4000-UVVIS, preconfigurado con un detector DET4-200-850 y una fibra óptica QP600-2-SR (Ocean Optics Inc., <http://www.oceanoptics.com>). La luz azul, luz roja y luz rojo lejana se redujeron de 7,2, 5,1 y 4,9  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$  en luz blanca a 0,4, 0,1 y 1,4  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ , respectivamente, en sombra simulada. La relación R:RL se redujo de 1,1 a 0,1 (Fig. S1b). La temperatura se mantuvo a 22°C.

Experimentos específicos se realizaron en condiciones de campo, donde las cajas fueron expuestas diariamente a un fotoperiodo artificial de 10 h, tanto en luz solar plena (radiación fotosintéticamente activa 600  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$  y relación R:RL de 1,1 al mediodía) o en sombra natural de un canopeo de *Lolium multiflorum* (radiación fotosintéticamente activa 40  $\mu\text{mol}$

$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  y relación R:RL de 0,1 al mediodía)(Fig. S1a). Los controles de oscuridad se dispusieron bajo la luz solar envueltos en plástico negro (capa interior) y aluminio (capa exterior).

Para investigar la contribución de señales de luz de sombra seleccionadas, las plántulas fueron crecidas en una combinación de luz azul ( $7,4 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ), luz roja ( $7,1 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ) y luz rojo lejana ( $6,5 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ , con relación R:RL de 1,1) y transferidas a condiciones que simulan las características particulares de la sombra: reducción de luz ( $27 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ , sin cambio en la relación R:RL), reducción de la luz roja ( $2 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ , sin cambio en la luz azul ni rojo lejana y con una relación R:RL = 0,3) o reducción de la luz azul y la luz roja (sin cambios en la luz rojo lejana). La luz azul y la luz roja fueron provistas por filas alternadas de diodos emisores de luz (LEDs) con máximos de emisión a los 465 nm y 623 nm respectivamente. La luz rojo lejana fue provista a través del espacio entre las filas de LEDs por lámparas incandescentes combinadas con un filtro de acetato azul (Paolini 2031, La Casa del Acetato, Buenos Aires, Argentina) dispuesto encima del panel de LEDs.

## Microscopía

Las imágenes de microscopía de fluorescencia de campo amplio fueron tomadas con un microscopio Olympus BX60F5 (<http://www.olympus-global.com>), con un lente objetivo de inmersión en aceite (UplanF1 1009/1.0). Para la tinción de núcleos, las plántulas fueron sumergidas en solución DAPI ( $2 \mu\text{g ml}^{-1}$  4',6-diamidino-2-phenylindole; Invitrogen, <http://www.invitrogen.com>). La excitación del fluoróforo se realizó con un 100-W *high-pressure mercury burner* (Olympus). La detección de la fluorescencia de DAPI se realizó con un cubo U-MNU (Olympus), y la detección de la fluorescencia de YFP con un cubo filtro YFP (Olympus). Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas con un microscopio de escaneo láser LSM5 Pascal (Zeiss, <http://www.zeiss.com>) con un lente objetivo de inmersión en agua (C-Apochromat 409/3; Zeiss). Para la visualización de cloroplastos, se utilizó un láser de He-Ne. Para la excitación y se detectó utilizando un filtro LP560. Para las proteínas de fusión COP1-YFP, YFP-HY5, GFP-HFR1 y RGA-GFP las sondas fueron excitadas con un láser de Argón y detectadas con un filtro BP 505-530. Se configuró un canal para tomar imágenes de transmisión. Los núcleos fluorescentes fueron definidos como regiones de interés (ROIs) y la intensidad de fluorescencia fue medida utilizando el programa IMAGEJ de *National Institutes of Health* (Abràmoff *et al.*, 2004). Se documentaron células representativas del parénquima del hipocotilo (primeras capas por debajo de la epidermis) fotografiándolas durante los primeros 15 min del análisis

microscópico. Todas las imágenes de microscopía fueron adquiridas con la inestimable colaboración de Martina Legris.

### **Crecimiento del hipocotilo**

El largo final de hipocotilo fue medido con una precisión de 0,1 mm con regla. Se calculó el largo promedio de las 10 plántulas más altas de cada caja (una réplica). Para calcular la tasa de crecimiento o el crecimiento acumulado, 15 plántulas por genotipo fueron fotografiadas utilizando una cámara digital (PowerShot; Canon, <http://www.canon.com>) y el largo de hipocotilo fue determinado con el software de procesamiento de imágenes y vectores GlobalMapper 10 (Blue Marble Geographics, <http://www.bluemarblegeo.com/>). La diferencia de largo fue dividida por el tiempo transcurrido.

### **RT-PCR cuantitativa**

Las plántulas fueron cosechadas en nitrógeno líquido. El RNA total fue extraído utilizando el *kit Spectrum Plant Total RNA* (Sigma-Aldrich) y sometido a tratamiento con RQ1 *RNase-Free DNase* (Promega, <http://www.promega.com>). El ADNc obtenido del RNA fue sintetizado utilizando la SuperScript III (Invitrogen) y *primer oligo-dT*. El ADNc fue amplificado con *FastStart Universal SYBR Green Master* (Roche, <http://www.roche.com>) utilizando el termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Los genes *Polyubiquitin 10 (UBQ-10)* y *UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 2 (UBC2)* fueron utilizados como control de normalización (Staneloni *et al.*, 2009; Czechowski *et al.*, 2005)

Los *primers* utilizados se detallan en la siguiente tabla:

<b>Locus</b>	<b>Nombre</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>
AT2G46970	<i>PIL1</i>	Sense	AAGACCACCTACGATGTTGCCAATG
AT2G46970	<i>PIL1</i>	Antisense	GTAGCCTGAGTCTGAGAAACACACG
AT4G14130	<i>XTR7</i>	Sense	CGTGGCGACTGTTCTTCTTG
AT4G14130	<i>XTR7</i>	Antisense	ATCTCGTCATGTGTTGCTCCTTG
AT4G16780	<i>ATHB2</i>	Sense	ATGAGCCCACCCACTACTTTGAC
AT4G16780	<i>ATHB2</i>	Antisense	CAGGAGCCCACGCATTGACC
AT3G15540	<i>IAA19</i>	Sense	GGCAGAGAAGATGATGAAGAAGAG
AT3G15540	<i>IAA19</i>	Antisense	TCAGCGTCACCACCAGATG
AT4G32280	<i>IAA29</i>	Sense	CGAGGGTGCTGCGTCTTGTTG
AT4G32280	<i>IAA29</i>	Antisense	CACGATGATGATACGGGCAATGATGG
AT4G28720	<i>YUC8</i>	Sense	GATTGTATTGCTTCTCTATGG
AT4G28720	<i>YUC8</i>	Antisense	CACACTCGTTGAACTTAGG
AT4G05320	<i>UBQ-10</i>	Sense	TCAATTCTCTCTACCGTGATCAAGATGCA
AT4G05320	<i>UBQ-10</i>	Antisense	GGTGTGAGAACTCTCCACCTCAAGAGTA
AT5G25760	<i>UBC</i>	Sense	AGAATGCTTGGAGTCCTGCTTG
AT5G25760	<i>UBC</i>	Antisense	ACATTTGTGCCATTGAATTGAACCC

### **Determinación de niveles de clorofila y antocianinas**

Se cosecharon 100 plántulas por réplica al final del día 5. Los niveles de clorofila y antocianinas relativos al peso fresco fueron medidos como se describe en Cagnola et al. (2012) y Maier et al. (2013).

### **Determinación de niveles Ácido indol-3-acético (IAA)**

Se cosecharon cuatro muestras biológicas por genotipo y tratamiento 2 h después del inicio del día 3 (1 h de tratamiento de sombra). El ácido indol-3-acético (IAA) fue cuantificado en el laboratorio del Dr. Scott Fynlaison por el método de dilución del isótopo estable en un espectrómetro 7890A/5975C XL GC-MS Agilent operado en modo de monitoreo de ion seleccionado, equipado con una columna 0,25 mm x 30 m DB-5MS (film 0,25 m) utilizando inyección pulsada sin fraccionamiento como se describe en Cagnola et al. (2012).

### **Tinción de $\beta$ -glucuronidasa (GUS)**

Plántulas que expresan  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) fueron cosechadas al final del día 3, incubadas durante la noche en solución de X-Gluc y transferidas por 1 d a etanol 70 %. Las plántulas fueron fotografiadas en un microscopio estereoscópico de campo amplio Luxeo 4D (Labomed, Los Angeles, CA, USA).

### **Análisis de la expresión génica por microarreglos**

Se cosecharon tres réplicas biológicas por genotipo y tratamiento en nitrógeno líquido 5 h después del inicio de día 3 (4 h de tratamiento de sombra), y se extrajo el ARN total con el *kit Spectrum Plant Total RNA* (Sigma-Aldrich). La síntesis e hibridación de ADNc y ARNc al ATH1 Affymetrix Arabidopsis Gene Chips se realizó de acuerdo a las instrucciones de Affymetrix. Los datos de expresión fueron normalizados, restringidos por criterio de presencia (Sellaro *et al.*, 2011), y se realizó un ANOVA para identificar los genes que mostraban efectos significativos de los tratamientos ( $P < 0,043$ ,  $q < 0,050$ ) (Storey and Tibshirani, 2003).

### **Blots de proteínas**

Se prepararon extractos proteicos de plántulas de Arabidopsis en buffer de extracción (50mM Tris/HCl pH 7,5, 100mM EDTA, 1mM 1,4-dithiothreitol, 0,1% TritonX100 y cocktail inhibidor de proteasas, Roche). Las proteínas totales fueron cuantificadas utilizando el Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) y se agregó  $\beta$ -mercaptoethanol antes de la siembra. Alícuotas con la misma cantidad total de proteínas fueron corridas por electroforesis en geles de poliacrilamida. La inmunodetección de HY5-myc y GFP-HFR1 se realizó utilizando los anticuerpos primarios anti-myc (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y anti-green fluorescent protein (Roche), respectivamente. Se utilizó como anticuerpo secundario Anti-mouse-HRP (Invitrogen) y el kit de detección Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Se utilizó la tinción con rojo Ponceau como control de uniformidad de carga.



## Análisis estadístico

En el capítulo 1, los datos fueron analizados por ANOVA de dos factores, o de un factor en la Fig. 12, y las diferencias entre las medias fueron evaluadas a posteriori por contrastes de Bonferroni. En el capítulo 2, se realizaron ajustes a la función exponencial (Figuras 16, 17 y 18) y lineal (Figura 19). En el capítulo 3, todos los outputs fisiológicos, niveles de proteína y datos de expresión de RT-PCR fueron analizados por regresión lineal simple. Se generó un modelo lineal básico utilizando regresión lineal por pasos (*stepwise*) empleando cuatro términos:

'Sombra' (Luz blanca = 0, Sombra = 1), '*COP1*' (mutantes *cop1* = 0, alelo *WT COP1* = 1), '*PIFq*' (cuádruple mutante *pifq* = 0, mutantes simples *pif3*, *pif4* y *pif5* = 0.75, doble mutante *pif4 pif5* = 0.5, alelos *WT PIFq* = 1) y la interacción '*Sombra\*COP1\*PIFq*' (producto de los valores de cada una de las tres variables). En las Fig. 21 y 24 se indicaron los términos del modelo que son estadísticamente significativos. Términos adicionales fueron incluidos para responder preguntas específicas. En la Fig. 23 se incluyó la interacción *Sombra\*cop1\*PIFq* (el mutante *cop1* en sombra = 1; *cop1 pif3*, *cop1 pif4* y *cop1 pif5* en sombra = 0.75; el resto de las condiciones = 0), para cuantificar el efecto de *PIF3*, *PIF4* y *PIF5* en el fondo genético *cop1* y compararlo con el fondo genético *WT COP1* (provisto por el término '*Sombra\*COP1\*PIFq*' del modelo básico). En la Fig. 27 solo el término "Sombra" fue incluido en el modelo porque ni *cop1* ni los mutantes *pif* fueron incluidos. En las figuras 29 y 31, los mutantes *pif* no fueron incluidos y por lo tanto los términos '*PIFq*' y '*Sombra\*COP1\*PIFq*' no fueron utilizados en el modelo, mientras que el término de interacción '*Sombra\*COP1\*hfr1*' (mutante *hfr1* en sombra = 1, resto de las condiciones = 0) y la interacción '*Sombra\*cop1\*hfr1*' (doble mutante *hfr1 cop1* en sombra = 1, resto de las condiciones = 0) fueron incluidos para comparar el efecto de la mutación *hfr1* en sombra en el fondo genético *COP1* vs *cop1*. En la Fig. 28 los términos "Tiempo" (en lugar de "Sombra") y la interacción "Tiempo\*COP1" fueron incluidos para representar los efectos de la sombra de diferente duración y su interacción con *COP1*. En la Fig. 30, los mutantes *cop1* no fueron incluidos y por lo tanto los términos "*COP1*" y '*Sombra\*COP1\*PIFq*' no se utilizaron en el modelo, mientras que los términos "*Sombra\*PIFq\*hfr1*" (mutante *hfr1* en sombra =1, triple mutante *pif4 pif5 hfr1* en sombra = 0.5, resto de las condiciones = 0) y "*Sombra\*pifq\*hfr1*" (*pif4 pif5 hfr1* en sombra = 0.5, resto de las condiciones = 0) fueron agregados para comparar los efectos de *hfr1* en los fondos genéticos *PIF4 PIF5* vs *pif4 pif5*. En la Fig. 6, solo el término "Sombra" fue incluido en el modelo. En la Fig. 32 los términos "Sombra", "*cop1*", "*hy5*" (mutante (*hy5* = 1, alelo *HY5 WT* = 0)), y la interacción "*Sombra\*cop1\*hy5*" (doble mutante *hy5 cop1* en sombra = 1, resto de las condiciones = 0) fueron agregados para comparar el efecto de la mutación *hy5* en sombra en los fondos genéticos *COP1* vs

*cop1*. La pendiente de cada término provee un valor para el efecto de las variables involucradas. Pendientes seleccionadas son representadas con propósitos comparativos en las Fig. 23, 30, 31 y 33. En el capítulo 4 los datos fueron analizados por prueba de t de Student (Fig. 35), comparando las condiciones luz y sombra.

# Resultados

---

---

Capítulo 1: *COP1* en la respuesta al sombreado,  
evidencias genéticas y localización subcelular

---

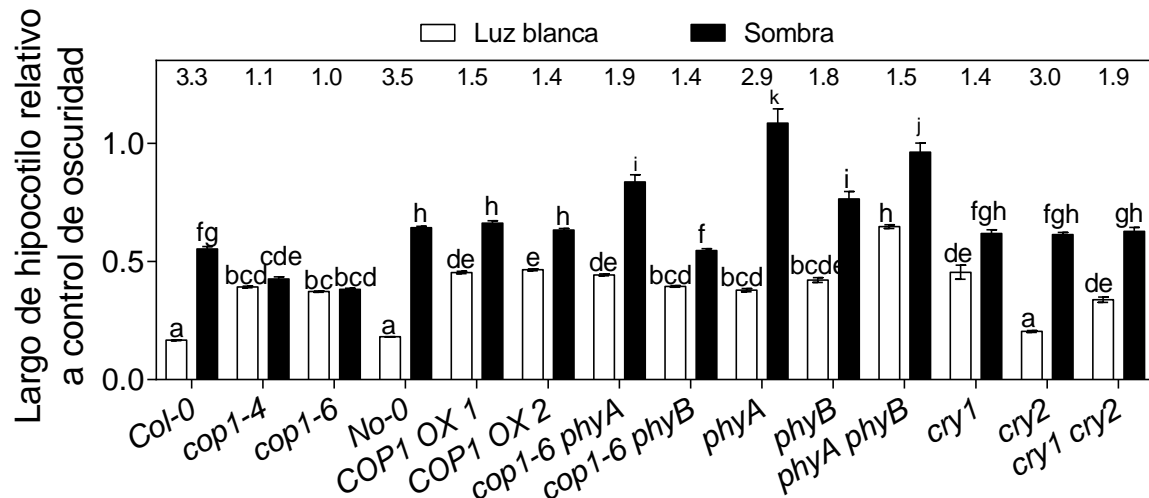
Los mutantes *cop1* y los mutantes múltiples *spa* fallan en la respuesta de crecimiento inducida por la baja actividad de phyB, causada por pulsos de luz rojo lejana antes de la noche o bajas relaciones R:RL durante el día, y la baja actividad de criptocromo y phyB, causada por la sombra (McNellis *et al.*, 1994; Crocco *et al.*, 2010; Rolaufts *et al.*, 2012; Casal, 2013). De hecho, los mutantes *cop1* presentan uno de los fenotipos más fuertes de pérdida de la respuesta a las señales de sombra. Sin embargo, el rol de COP1 en este contexto no es frecuentemente considerado. Esto podría deberse a que la pérdida de la respuesta puede interpretarse como una actividad específica de COP1, o bien como una consecuencia colateral de la mutación.

De acuerdo con la primera interpretación, la actividad de COP1 debería aumentar con la sombra, y ese aumento debería ser parte de la cadena de eventos que causan el aumento del crecimiento. Se ha asociado la actividad de COP1 a su acumulación en el núcleo, donde coincide con sus blancos nucleares.

El objetivo de este capítulo es investigar si existen evidencias genéticas y si se producen cambios en la localización nuclear de COP1, que justifiquen su rol activo en la respuesta al sombreado.

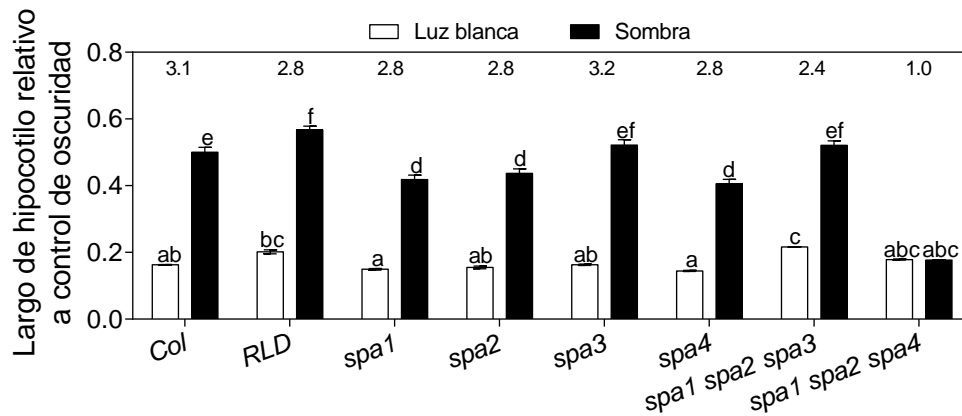
## COP1 y SPA son necesarios para la respuesta al sombreado

Plántulas de *Arabidopsis thaliana* fueron crecidas durante tres días en luz blanca o sombra simulada en condiciones controladas (fotoperiodo 10h). En el genotipo salvaje (*WT*) la sombra indujo una significativa promoción del crecimiento del hipocotilo comparado con el control en luz blanca (Fig. 2).



**Figura 2: COP1 es necesario para la respuesta al sombreado.** Largo de hipocotilo de plántulas de los genotipos *WT Col-0* y *No-0*, los mutantes *cop1-4*, *cop1-6*, *cop1-6 phyA*, *cop1-6 phyB*, *phyA*, *phyB*, *phyA phyB*, *cry1*, *cry2* y *cry1 cry2*, y las líneas sobreexpresantes *COP1OX1* y *COP1OX2* crecidas en luz blanca o sombra simulada. Se grafican medias y error estándar de 3-9 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ ). En la parte superior se indica la relación Sombra/Luz blanca para cada genotipo.

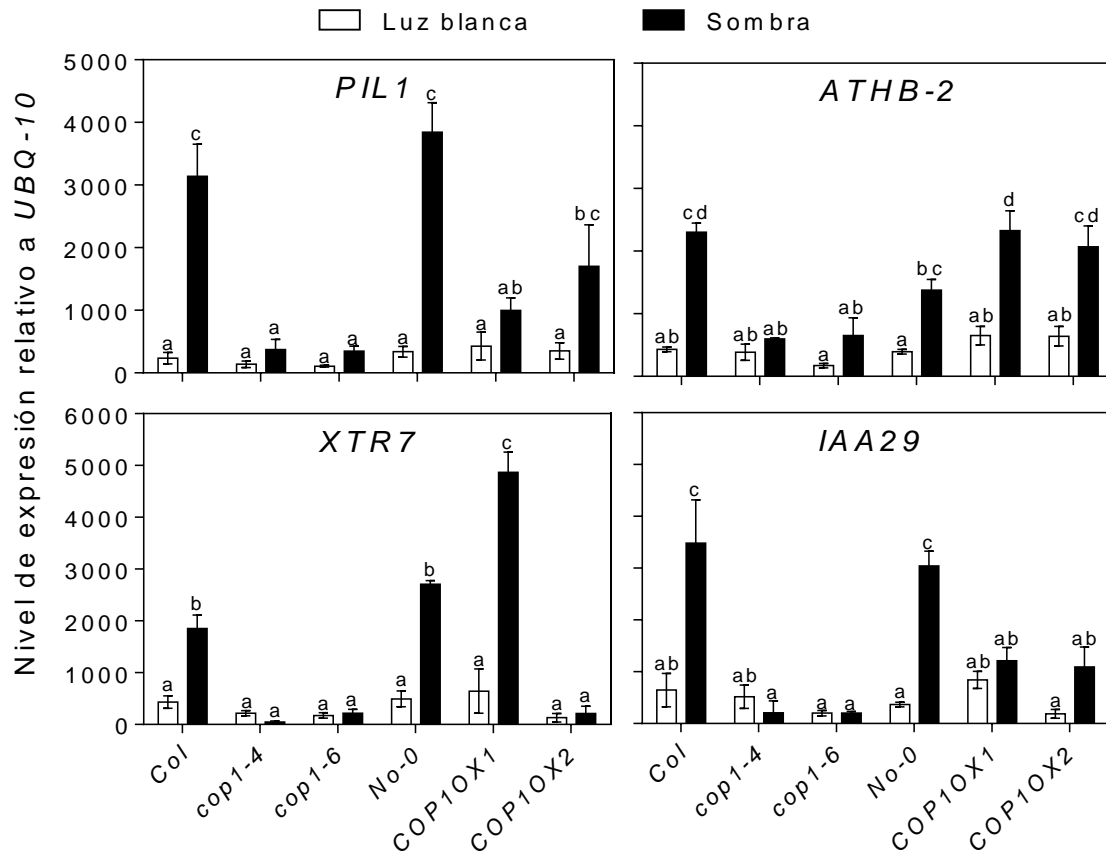
La reducida respuesta observada en los mutantes *phyB* y *cry1* evidencian la participación de los fitocromos y del criptocromo en la precepción de las señales de sombra (Fig. 2). El largo de hipocotilo relativo a oscuridad en los mutantes *cop1* resultó mayor que el genotipo salvaje, debido a que dichos mutantes muestran menor largo final de hipocotilo en oscuridad. Los mutantes *cop1-4* y *cop1-6* no mostraron un crecimiento significativo en respuesta a la sombra (Fig. 2). Este resultado confirma y extiende resultados previamente reportados que muestran que *cop1* es deficiente en su respuesta al tratamiento con pulsos de luz rojo lejana al final del día *end-of-day* o la suplementación con luz rojo lejana durante el día (McNellis *et al.*, 1994; Rolaufts *et al.*, 2012), que solo simulan las señales relacionadas a *phyB* generadas por el canopeo vegetal.



**Figura 3: Los genes SPA son necesarios para la respuesta al sombreado.** Largo de hipocotilo de plántulas de los genotipos WT Col-0 y RLD, y los mutantes *spa1-3*, *spa2-1*, *spa3-1*, *spa4-1*, *spa1-3 spa2-1 spa4-1* y *spa1-3 spa2-1 spa4-1*. Se grafican medias y error estándar de 9 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ ). En la parte superior se indica la relación Sombra/Luz blanca para cada genotipo.

Las líneas sobreexpresantes de *COP1* (*COP1OX1* y *COP1OX2* en fondo No-0) también mostraron una reducción significativa de la respuesta a la sombra. Notablemente, los dobles mutantes *cop1-6 phyA* y *cop1-6 phyB* recuperaron parcialmente su habilidad para responder a las señales de sombra.

*COP1* forma complejos con las proteínas SPA (Zhu *et al.*, 2008). La respuesta a la sombra se vio reducida en los simples mutantes *spa1*, *spa2* y *spa4*, y ausente en el triple mutante *spa1 spa2 spa4* (Fig. 3). Los mutantes *spa3* y *spa1 spa2 spa3* no mostraron diferencias significativas con respecto al WT (Fig. 3). Estos resultados confirman y extienden los obtenidos con luz blanca suplementada con luz rojo lejana (Rolauffs *et al.*, 2012), que indican que la respuesta se encuentra muy afectada en mutantes múltiples *spa*, en particular el triple mutante *spa1 spa2 spa4*.



**Figura 4: La promoción de la expresión de *PIL1*, *ATHB-2*, *XTR7* y *IAA29* por la sombra requiere *COP1*.** Expresión de *PIL1*, *ATHB-2*, *XTR7* e *IAA29* en plántulas WT Col-0 y No-0, mutantes *cop1-4* y *cop1-6*, y líneas sobreexpresantes *COP1OX1* y *COP1OX2* crecidas en luz blanca o sombra simulada. Las muestras fueron cosechadas a las 10 h del día 3. Se grafican medias y error estándar de 3-4 réplicas biológicas. Letras distintas denotan diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ ).

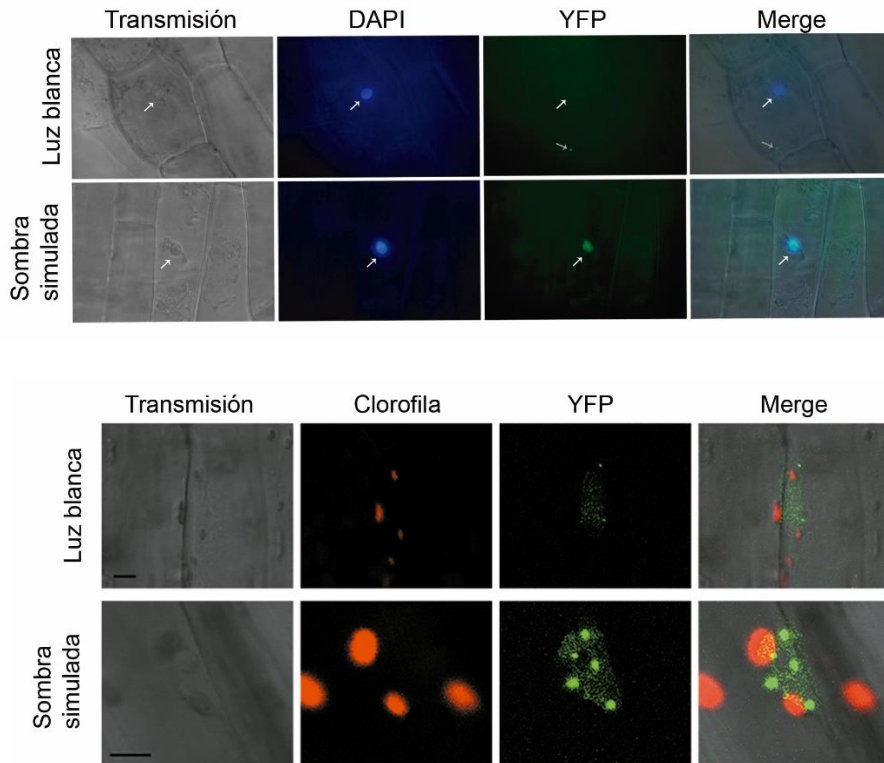
Los genes *PIL1*, *IAA29*, *XTR7* y *ATHB2* son blancos directos de los PIFs, y su expresión es promovida por la baja relación R:RL (Hornitschek *et al.*, 2012)

En condiciones de sombra simulada se observó un significativo aumento de la expresión en el *WT*, pero la respuesta se encontró ausente en los mutantes *cop1* (Fig. 4). La sobreexpresión de *COP1* no afectó la expresión de *PIL1*, *IAA29*, *XTR7* o *ATHB2* en luz blanca, pero afectó su expresión en sombra (aumentando o reduciendo la respuesta), indicando una dependencia más compleja de los niveles de *COP1* (Fig. 4).



## COP1 se acumula en el núcleo en sombra simulada y sombra natural

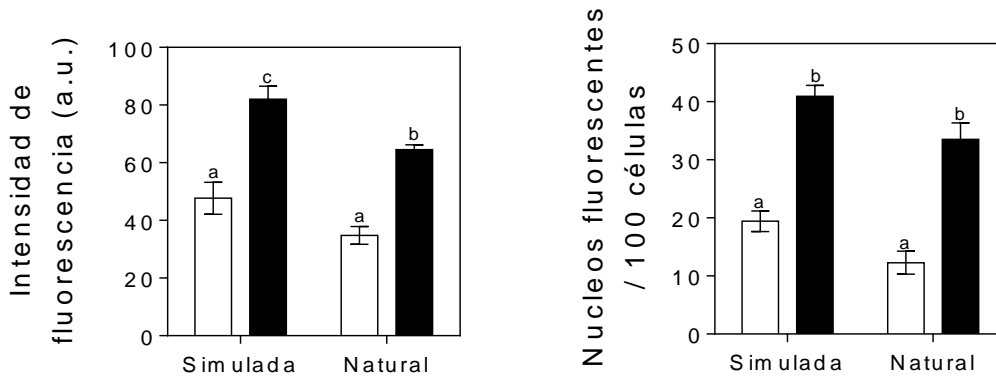
Como se ha reportado que la actividad de COP1 dependería de su localización nuclear, investigamos si las señales de sombra afectan la localización de COP1 utilizando la línea transgénica *cop1-4/Pro35S:YFP-COP1* (Oravec *et al.*, 2006). Imágenes de microscopía de fluorescencia de campo amplio revelaron que la proteína COP1 es reclutada al núcleo en sombra simulada, mientras que se observó una localización principalmente citoplasmática en luz blanca (Fig. 5).



**Figura 5: COP1 se acumula en el núcleo en sombra.** Imágenes de microscopía de fluorescencia de células representativas de plántulas *cop1-4/Pro35S:YFPCOP1* crecidas en luz blanca o sombra simulada (arriba). Se utilizó tinción con DAPI para confirmar la localización nuclear. Imágenes de microscopía confocal de núcleos representativos (abajo). Se incluyen imágenes de transmisión y fluorescencia de la clorofila. Barras de escala: 5  $\mu$ m.

La localización de COP1 fue estudiada en mayor detalle utilizando microscopía confocal. La proteína COP1 fue observada en *speckles* o cuerpos nucleares en sombra simulada, mientras que en condiciones de luz blanca la fluorescencia del núcleo fue significativamente

menor (Fig. 5). La formación de cuerpos nucleares podría constituir una capa más de regulación de la actividad de las proteínas que se agrupan en los mismos.



**Figura 6: COP1 se acumula en el núcleo en condiciones de sombra simulada y sombra natural.**

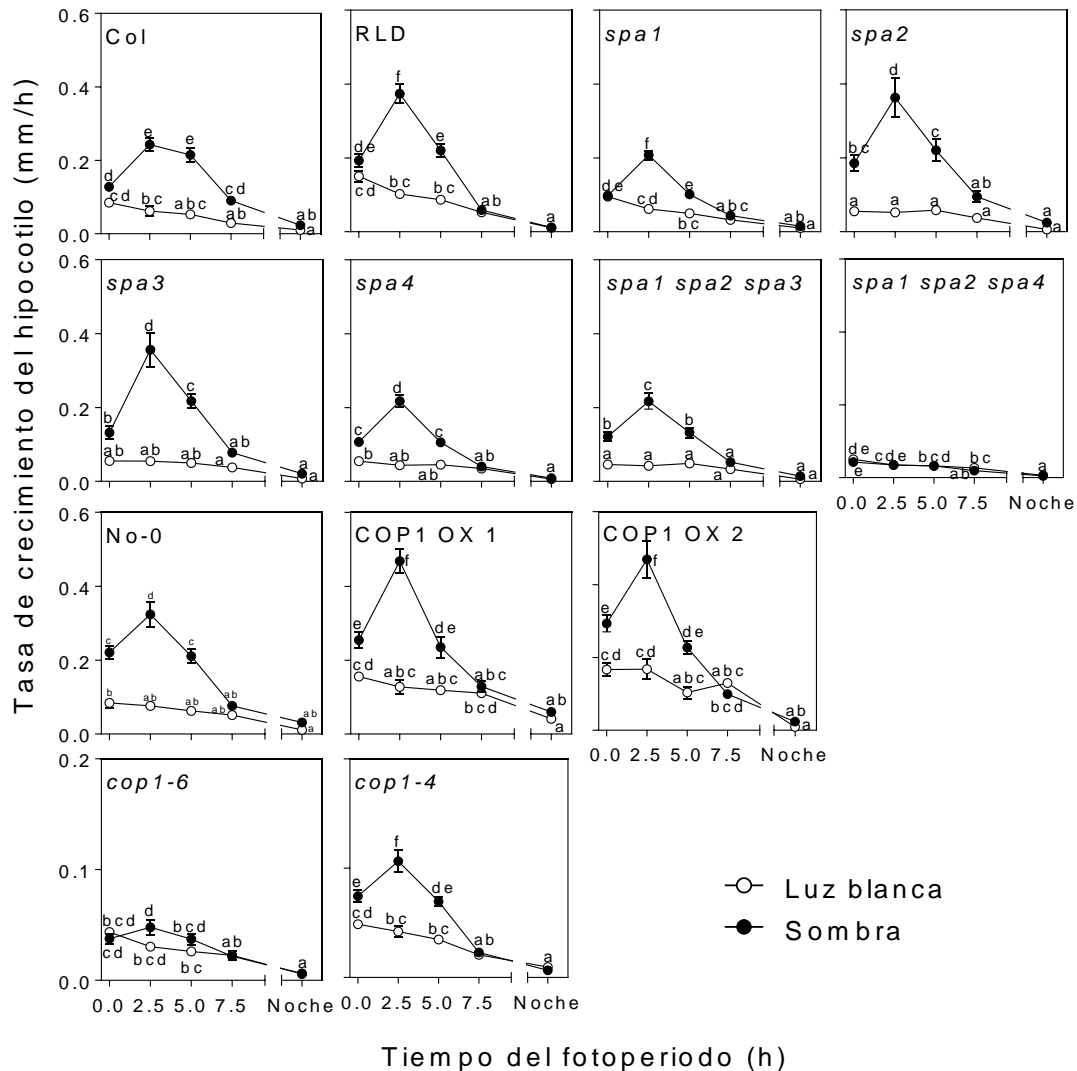
Número de núcleos fluorescentes (izquierda) e intensidad de fluorescencia (derecha) de plántulas que expresan YFP-COP1 crecidas en luz blanca y sombra simulada o luz solar plena y sombra natural. Se grafican medias y error estándar de 3-9 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ ). u.a.: unidades arbitrarias.

Tanto el número de núcleos como su intensidad fue notablemente mayor en plántulas crecidas en sombra simulada, respecto de aquellas crecidas en luz blanca (Fig. 6).

Bajo radiación natural, el canopy vegetal no solo reduce la luz azul y roja, sino también el UV-B, lo que conduce a una disminución de la actividad de los fitocromos, criptocromos y UVR8. Mientras el fitocromo y el criptocromo causan la exclusión de COP1 del núcleo (Osterlund and Deng, 1998), UVR8 promueve su acumulación (Oravec *et al.*, 2006). Para investigar el balance entre las actividades contrastantes de los fotorreceptores mencionados, evaluamos la localización de COP1 en luz solar plena y sombra natural (canopy vegetal). A pesar de la presencia de UV-B, los patrones observados fueron muy similares a aquellos observados en condiciones controladas.

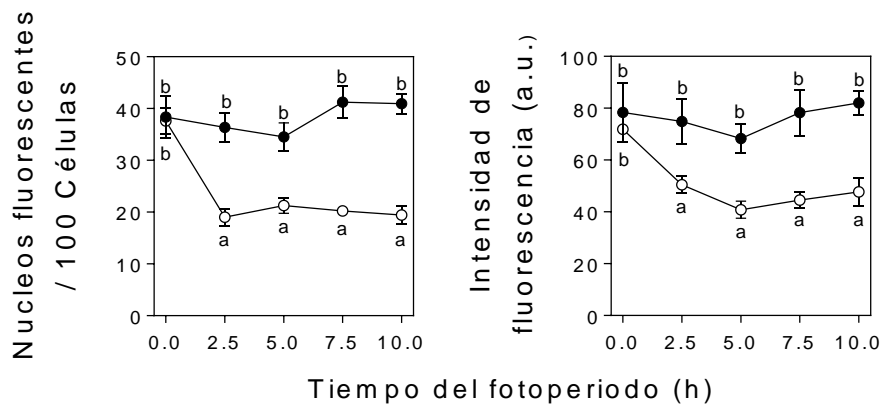
## Patrón diario de abundancia nuclear de COP1

Para investigar el grado de asociación entre el crecimiento y la abundancia nuclear de COP1, analizamos la cinética de ambas variables a lo largo del fotoperiodo del día 3 en luz blanca y sombra simulada.



**Figura 7: El patrón diario de crecimiento en luz blanca y sombra simulada.** Tasa de crecimiento de hipocotilo a lo largo del día 3 en plántulas de los genotipos WT Col-0, No-0 y RLD, mutantes *spa1-3*, *spa2-1*, *spa3-1*, *spa4-1*, *spa1-3 spa2-1 spa4-1*, *spa1-3 spa2-1 spa4-1*, *cop1-4* y *cop1-6*, y líneas sobreexpresantes *COP1OX1* y *COP1OX2* en luz blanca y sombra simulada. Se grafican medias y error estándar de ocho réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ ).

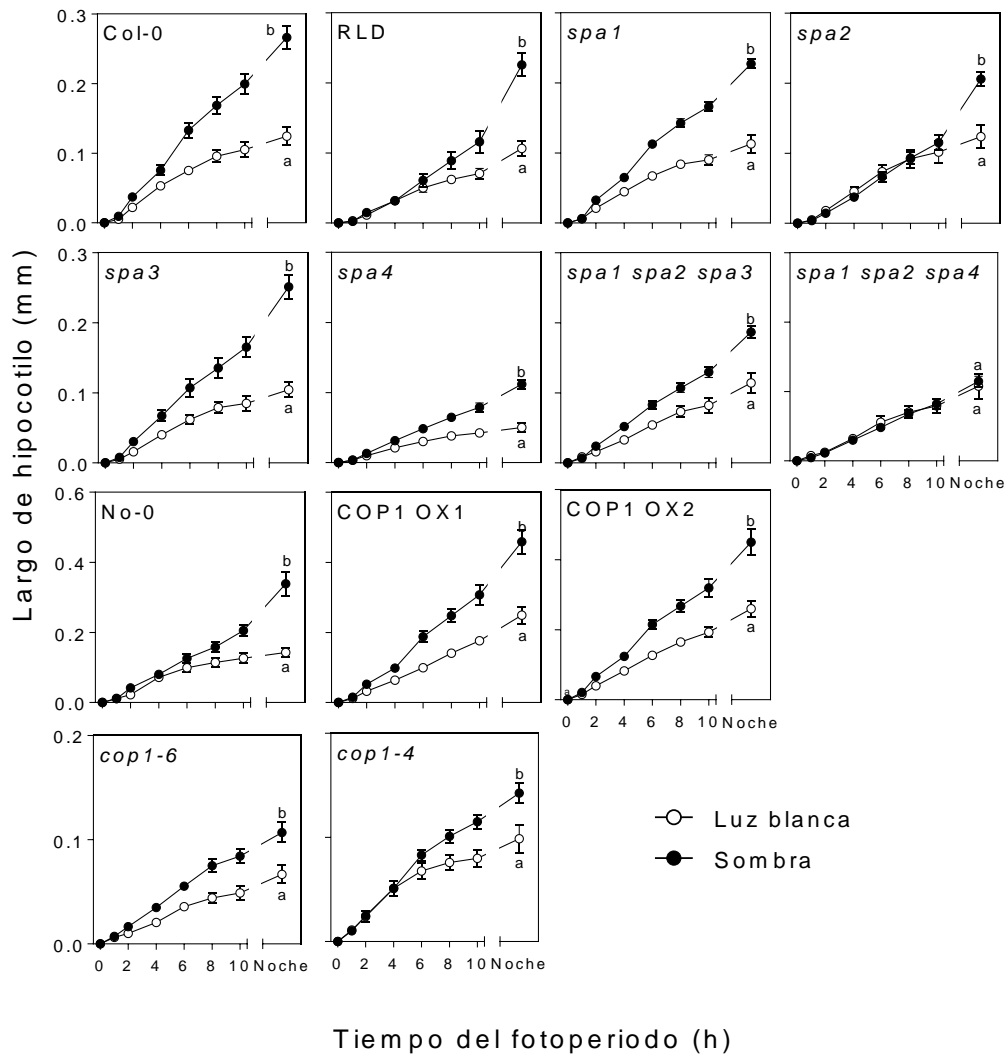
En condiciones de luz blanca la tasa de crecimiento de hipocotilo fue máxima al inicio del día (Fig. 7), confirmando observaciones previas (Nozue *et al.*, 2007; Michael *et al.*, 2008). En sombra simulada, la máxima tasa de crecimiento de hipocotilo fue mayor que en luz blanca desde el inicio del fotoperiodo (0,0–2,5 h), pero el pico máximo ocurrió a las 2,5–5,0 h (Fig. 7). La tasa de crecimiento declinó al final del fotoperiodo hasta los niveles observados en plántulas crecidas en luz blanca. Los mutantes *cop1* y *spa* mostraron diferencias en la tasa de crecimiento, pero no el patrón de crecimiento diario (Fig. 7). Un análisis más detallado indicó que el mutante *cop1-4* muestra una débil respuesta a la sombra, no observada en los mutantes *cop1-6* y *spa1 spa2 spa4* (Fig. 7).



**Figura 8: Patrón diario de abundancia nuclear de COP1.** Número de núcleos fluorescentes (izquierda) e intensidad de fluorescencia nuclear (derecha) a lo largo del día 3 en plántulas que expresan YFP-COP1 crecidas en luz blanca o sombra simulada. Se grafican medias y error estándar de 5-12 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ ).

En luz blanca, YFP-COP1 mostró un marcado patrón diario de acumulación nuclear. Al final de la noche el número de núcleos fluorescentes y su intensidad fue máximo. El número de núcleos fluorescentes cayó a la mitad después de 2,5 h de luz blanca, y se mantuvo en ese nivel hasta el final del fotoperiodo (Fig. 8). La intensidad nuclear de YFP-COP1 mostró un decaimiento más gradual (Fig. 8). Este resultado indica que COP1 puede ser rápidamente excluida del núcleo desde el inicio del día. Al final de la noche, los niveles de COP1 en el núcleo fueron similares en los tratamientos de luz blanca y sombra simulada, pero permanecieron altos a lo largo del fotoperiodo en sombra simulada.

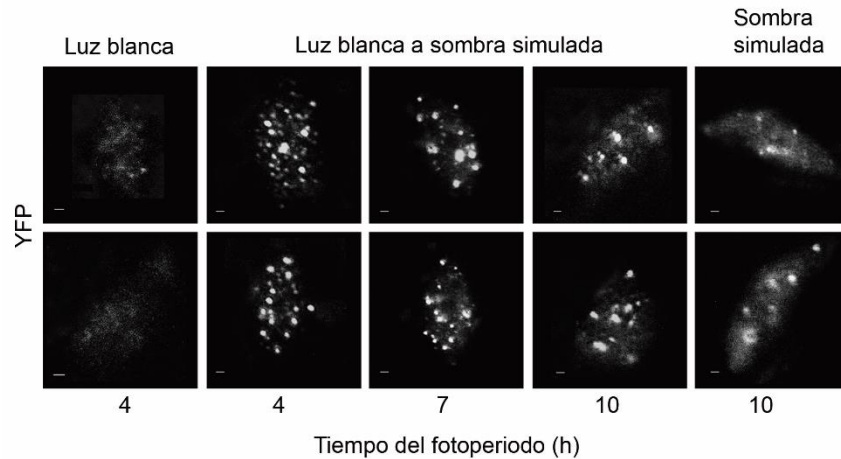
## Rápida re-acumulación de COP1 en el núcleo en respuesta a la sombra



**Figura 9:** Hay una rápida respuesta de crecimiento ante las señales de sombra. Crecimiento de hipocotilo acumulado durante el día 3 en plántulas de los genotipos WT Col-0, No-0 y RLD, mutantes *spa1-3*, *spa2-1*, *spa3-1*, *spa4-1*, *spa1-3 spa2-1 spa4-1*, *spa1-3 spa2-1 spa4-1*, *cop1-4* y *cop1-6*, y las líneas sobreexpresantes COP1OX1 y COP1OX2 crecidas en luz blanca, y mantenidas en esa condición o transferidas a sombra simulada 1 h después del inicio del fotoperiodo. Se grafican medias y error estándar de 6-8 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias en el punto final (Prueba de t,  $P < 0,05$ ).

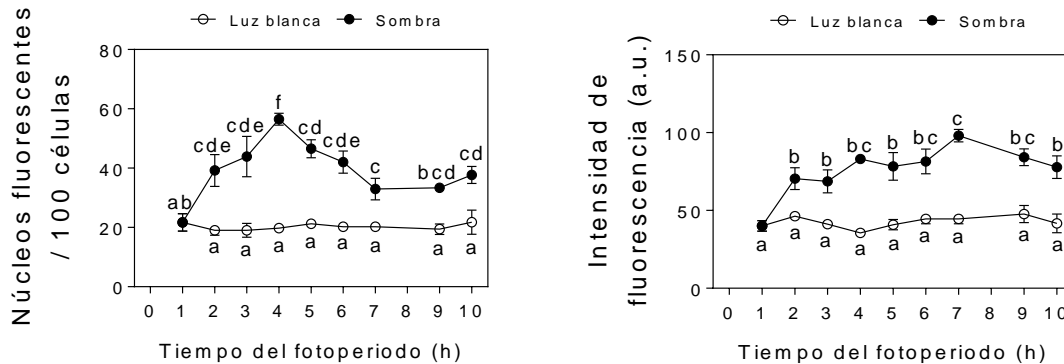
Para investigar la cinética de la respuesta al sombreado, plántulas de *Arabidopsis* fueron crecidas en luz blanca y luego transferidas a sombra simulada 1 h después del inicio del tercer día (los controles permanecieron en luz blanca). Se observó una rápida respuesta de crecimiento ante las señales de sombra en la mayoría de los genotipos (Fig. 9). La

respuesta fue reducida en los mutantes *spa2*, *spa4*, *cop1-4* y *cop1-6*, y estuvo ausente en el triple mutante *spa1 spa2 spa4* (Fig. 9).



**Figura 10: COP1 forma *speckles* nucleares ante las señales de sombra.** Núcleos representativos de plántulas que expresan YFP-COP1 crecidas en luz blanca y mantenidas en esa condición o transferidas a sombra simulada 1 h después del inicio del día 3. Se incluyó un control adicional crecido en sombra simulada durante los tres días de tratamiento. Barra de escala: 1 µm.

También se observó una rápida re-acumulación de COP1 en el núcleo en plántulas de la línea *cop1-4/Pro35S:YFP-COP1* transferidas de luz blanca a sombra simulada. La sombra simulada indujo la rápida formación de *speckles* nucleares bien definidos (Fig. 10). Se observó una fluorescencia más difusa en las horas sub-siguientes, en particular en las plántulas crecidas en sombra simulada durante 3 días.

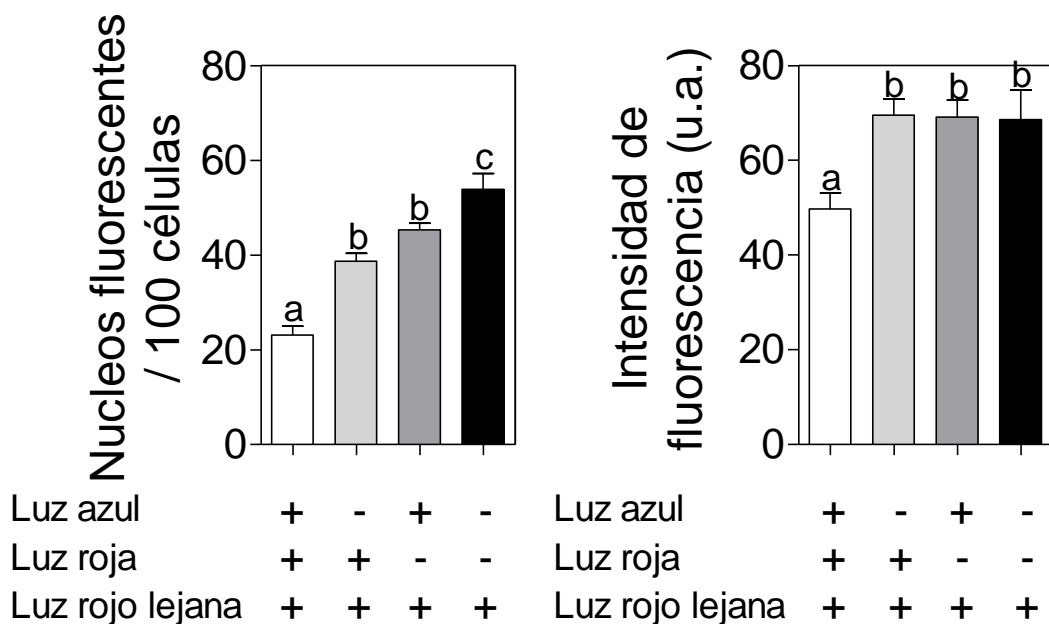


**Figura 11: Hay una rápida re-acumulación de COP1 en respuesta a las señales de sombra.** Número de núcleos fluorescentes (izquierda) e intensidad de fluorescencia nuclear (derecha) a lo largo del día 3 en plántulas que expresan YFP-COP1 crecidas en luz blanca y mantenidas en esa condición o transferidas a sombra simulada 1 h después del inicio del día 3. Se grafican medias y error estándar de 4-12 réplicas independientes. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias analizadas por ANOVA de dos factores y contrastes de Bonferroni ( $P < 0,05$ ).

El número de núcleos fluorescentes aumentó 1 h después del inicio del tratamiento de sombra, y mostró un pico a las 3 h de tratamiento (Fig. 11). La intensidad de fluorescencia de los núcleos mostró un aumento más suave entre 1 h y 6 h de tratamiento de sombra, y declinó levemente hacia el final del fotoperiodo (Fig. 11).

### La reducción tanto de la luz azul como la luz roja inducen la acumulación nuclear de COP1

La sombra natural involucra una mayor reducción de la luz roja y la luz azul con respecto a la luz rojo lejana, reduciendo así la relación R:RL. Para investigar la contribución de dichas señales al efecto general de la sombra, se estudió la acumulación de COP1 en el núcleo en plántulas de la línea *cop1-4/Pro35S:YFP-COP1* crecidas en luz azul, roja y rojo lejano (con una relación R:RL = 1,1), que fueron transferidas a condiciones que simulan las características de la sombra: luz azul reducida (sin cambios en la intensidad de rojo y rojo lejano), luz roja reducida (sin cambios en la intensidad de azul y rojo lejano, y relación R:RL = 0,3), o luz azul y luz roja reducida (sin cambios en la intensidad de rojo lejano), 1 h después del inicio del tercer día.



**Figura 12: La reducción tanto de la luz azul como la luz roja inducen la acumulación nuclear de COP1.** Número de núcleos fluorescentes (izquierda) e intensidad de fluorescencia nuclear (derecha) en plántulas que expresan YFP-COP1 crecidas en luz blanca (azul+rojo+rojo lejano) y transferidas a luz azul reducida, luz roja reducida, o luz azul y luz roja reducida 1 h después del inicio

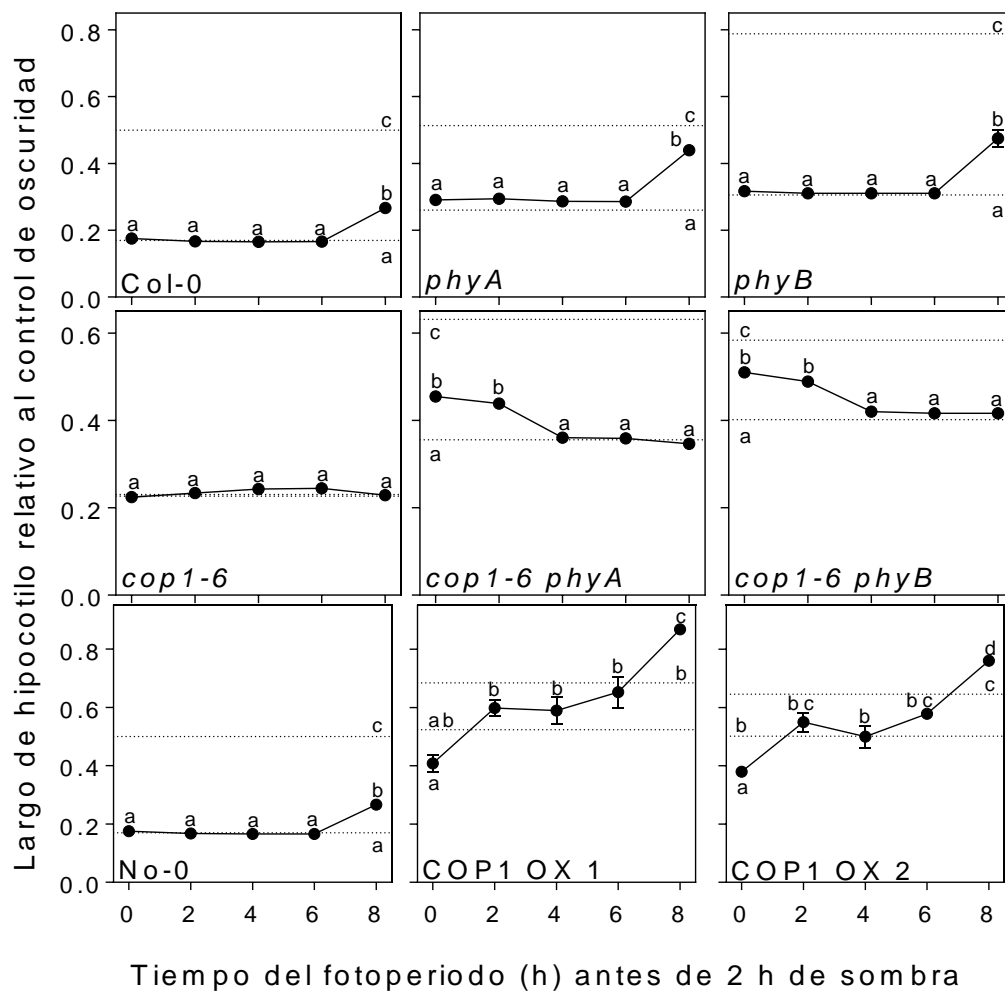
del fotoperiodo, o mantenidas en luz blanca como control. Las imágenes de microscopía confocal se tomaron a las 10 h del día 3. Se grafican medias y error estándar de 15-19 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ ).

Tanto la reducción de la luz azul como la reducción de la luz roja promovieron un aumento significativo del número de núcleos fluorescentes comparado con el control que permaneció con los niveles iniciales de azul, rojo y rojo lejano (Fig. 12). Los efectos fueron aditivos, y el mayor número de núcleos se observó en las plántulas transferidas al tratamiento de luz roja y luz azul reducida. La reducción de la luz azul, la luz roja y la luz roja y luz azul indujo un similar aumento de la fluorescencia nuclear (Fig. 12).

### **El patrón diario de sensibilidad a la sombra requiere niveles normales de COP1**

Cuando plántulas crecidas en luz solar plena son expuestas a la sombra por cortos periodos (2 h), la sombra de la tarde promueve el crecimiento del hipocotilo, mientras que la de la mañana no es efectiva para promover el crecimiento (Sellaró et al., 2012).





**Figura 13: Patrón diario de sensibilidad a la sombra.** Largo de hipocotilo de plántulas de los genotipos WT Col-0 y No-0, mutantes *phyA*, *phyB*, *cop1-6*, *cop1-6 phyA* y *cop1-6 phyB*, y líneas sobreexpresantes COP1OX1 y COP1OX2 crecidas durante 3 días en luz blanca interrumpida por eventos de sombreado de 2 h iniciados en los momentos indicados del fotoperiodo. Las líneas punteadas indican el largo de hipocotilo en plántulas crecidas durante todo el fotoperiodo en luz blanca (abajo) y sombra simulada (arriba). Se grafican medias y error estándar de tres réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ ).

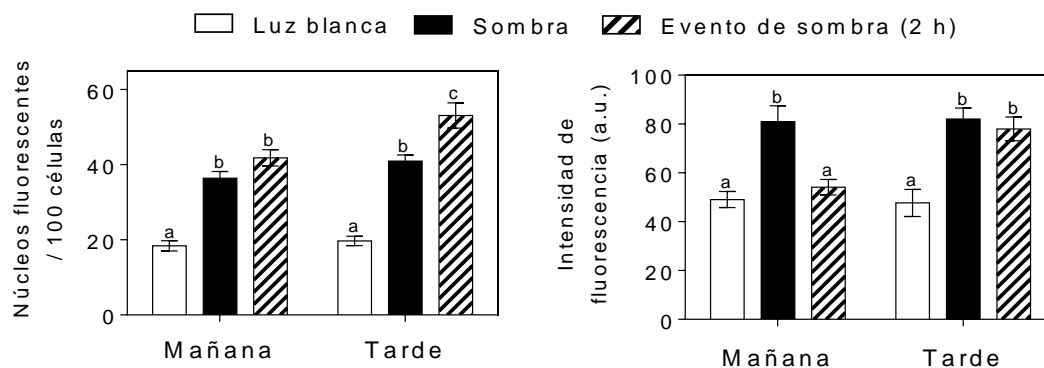
En condiciones controladas y sombra simulada se observó un patrón de sensibilidad similar (Fig. 13, Col-0). Las mutaciones *phyA* y *phyB* mantuvieron dicho patrón (Fig. 13, *phyA* y *phyB*). La pérdida de respuesta del mutante *cop1* (Fig. 13, *cop1-6*) es parcialmente recuperada en los dobles mutantes *cop1-6 phyA* y *cop1-6 phyB*, pero con un patrón de sensibilidad invertido (Fig. 13, *cop1-6 phyA* y *cop1-6 phyB*).

En síntesis, en los dobles mutantes *cop1-6 phyA* y *cop1-6 phyB* la sombra de la mañana fue más efectiva y la de la tarde no fue efectiva en la promoción del crecimiento del hipocotilo. Esto sugiere que *COP1* es necesario para reprimir la respuesta de la sombra de la mañana, y promover la respuesta a la sombra de la tarde. En concordancia con esta interpretación, en las líneas sobreexpresantes *COP1OX1* y *COP1OX2* la sombra de la mañana incluso redujo el crecimiento del tallo, y la sombra de la tarde causó una promoción aún mayor del crecimiento que el observado en el control de sombra (Fig. 13).

### Sensibilidad diaria de la acumulación de COP1 en respuesta a la sombra

Dado que los niveles alterados de COP1 afectan la sensibilidad normal a la sombra de la mañana en comparación con la de la tarde, investigamos la sensibilidad de la acumulación en el núcleo de COP1 en respuesta a la sombra de la mañana comparada con la de la tarde. Plántulas de la línea YFP-COP1 fueron expuestas diariamente a 2 h de sombra simulada al inicio y al final del fotoperiodo. Los controles crecieron en luz blanca o sombra simulada. En condiciones estables de luz blanca o sombra el número de núcleos fue similar a la mañana que a la tarde, sin embargo, la acumulación nuclear de COP1 fue significativamente más intensa en respuesta a la sombra de la tarde que a la de la mañana (Fig. 14).

Una mayor acumulación nuclear de COP1 en respuesta a la sombra de la tarde podría correlacionar con una mayor actividad de la proteína y una mayor promoción del crecimiento.

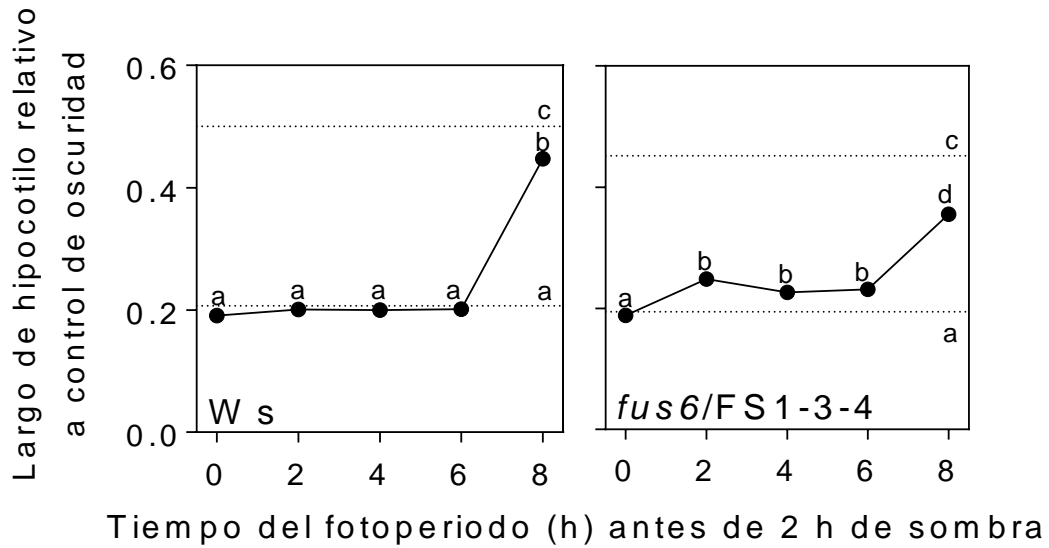


**Figura 14: Hay una mayor reaccumulación de COP1 en el núcleo en respuesta a la sombra de la tarde que de la mañana.** Número de núcleos fluorescentes (izquierda) e intensidad de fluorescencia nuclear (derecha) en plántulas que expresan YFP-COP1 crecidas durante 3 días en

luz blanca, interrumpida diariamente por eventos de 2 h de sombra a la mañana (iniciando a las 0 h) o a la tarde (iniciando a las 8 h del fotoperiodo). La fluorescencia fue analizada inmediatamente después del evento de sombreado correspondiente. Plántulas control fueron crecidas durante todo el fotoperiodo en luz blanca o sombra simulada ininterrumpida. Se grafican medias y error estándar de 9-19 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ ).

### **La sensibilidad diurna del crecimiento a la sombra requiere patrones normales de expresión de *CSN1/FUS6***

*CSN1/FUS6*, una subunidad del signalosoma COP9, es necesario para la localización nuclear de COP1 (Wang *et al.*, 2009). La expresión de *CSN1/FUS6* aumenta durante el fotoperiodo, alcanzando un nivel mayor durante la tarde que durante la mañana (Mockler *et al.*, 2007). Como el patrón de sensibilidad a la sombra requiere niveles normales de COP1, y esto correlaciona con una mayor acumulación de COP1 en respuesta a la sombra de la tarde, pensamos que alterando los patrones de expresión de *CSN1/FUS6* se podría afectar el patrón de sensibilidad a los eventos de sombra. Para poner a prueba esta predicción utilizamos la línea *fus6/FS1-3-4* que expresa la secuencia completa de *CSN1/FUS6* bajo un promotor constitutivo en el fondo genético *fus6* (Wang *et al.*, 2009).



**Figura 15: La sensibilidad diurna del crecimiento a la sombra requiere patrones normales de expresión de *CSN1/FUS6*.** Largo de hipocotilo de plántulas del genotipo WT Ws y de la línea transgénica *fus6/FS1-3-4* crecidas durante 3 días en luz blanca, interrumpida diariamente por eventos de 2 h de sombreado iniciadas en los momentos indicados del fotoperiodo. Las líneas punteadas indican el largo de hipocotilo en plántulas crecidas durante todo el fotoperiodo en luz blanca (abajo) y sombra simulada (arriba). Se grafican medias y error estándar de 3-6 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ ).

A diferencia del *WT*, *fus6/FS1-3-4* mostró una respuesta significativa a los eventos de sombra a las 2, 4 y 6 h, mientras que la respuesta al final del fotoperiodo (a las 8 h) se vio parcialmente reducida (Fig. 15).

---

## Capítulo 2: Cinética de localización sub-celular de COP1 durante la desetiología

---

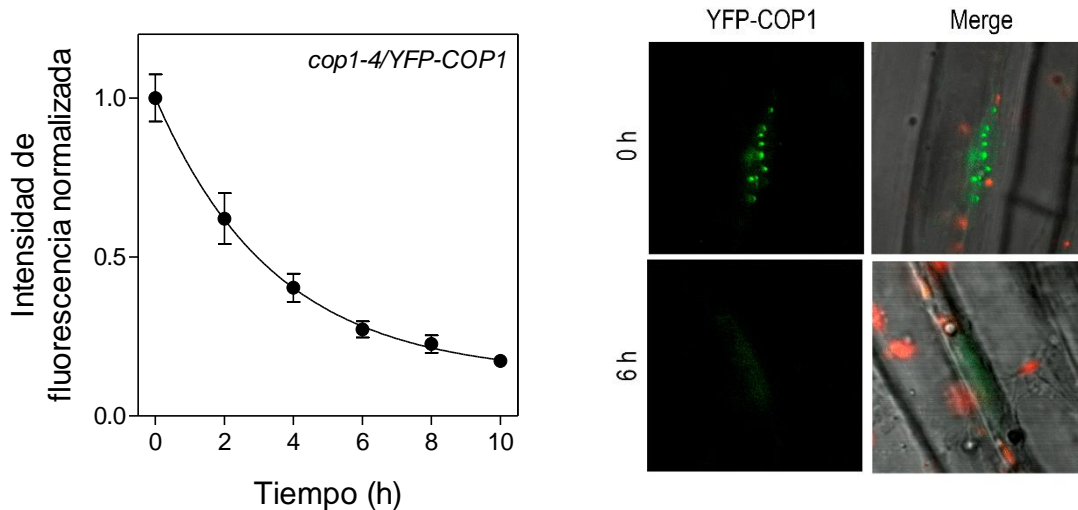
En oscuridad, COP1 forma speckles nucleares (von Arnim *et al.*, 1998). Una deficiente translocación al núcleo (Stacey *et al.*, 2000) o la formación de *speckles* nucleares (Nakagawa and Komeda, 2004) correlaciona con la falta de actividad biológica de las mutaciones de la proteína COP1, evidenciada por su fenotipo de crecimiento. Tanto fitocromos como criptocromos excluyen a COP1 del núcleo al citoplasma como indicó el análisis de proteínas de fusión COP1-GUS (Osterlund and Deng, 1998). Mutaciones que afectan motivos relacionados a la exclusión nuclear de COP1 indican que esta exclusión es importante para regular la actividad biológica y abundancia nuclear en luz (Subramanian *et al.*, 2004). La cinética de migración de COP1-GUS al citoplasma es muy lenta, y los cambios no son detectables durante las 12 h posteriores a la transición oscuridad-luz, sugiriendo que la relocalización es importante para mantener un destino direccionado hacia la fotomorfogénesis más que para causar ese cambio (von Arnim *et al.*, 1997). Esta idea ha persistido hasta el presente (Chen and Chory, 2011; Lau and Deng, 2012) y, por esta razón, la inactivación de COP1 por la luz ha sido recientemente modelada sin incorporar la migración de COP1 al citoplasma (Pokhilko *et al.*, 2011).

Una lenta cinética de removilización de COP1 ayudaría a direccionar a las plantas hacia la fotomorfogénesis amortiguando las fluctuaciones en las señales de luz percibidas en los ciclos día-noche (von Arnim *et al.*, 1997). Sin embargo, en los ciclos día-noche e incluso en respuesta a la sombra, YFP-COP1 muestra una rápida removilización de o hacia el núcleo (Fig. 8 y 11). El objetivo de este capítulo es reexaminar la cinética de COP1 en el núcleo durante la desetiación para dilucidar si la partición sub-celular de COP1 se vuelve más dinámica luego de la desetiación, o bien la depleción de COP1 nuclear durante la desetiación es más rápida que lo que revelaron los estudios que involucraron tinción de GUS.

Este es un aspecto central para el entendimiento de los mecanismos involucrados en la desetiación porque una rápida caída de COP1 nuclear enmarcaría este proceso en la ventana temporal en que COP1 es inactivada y sus proteínas blanco se reaccumulan.

## Rápida caída de YFP-COP1 nuclear inducida por luz

Plántulas de la línea *cop1-4/35S:YFP-COP1* (Oravec et al., 2006) fueron crecidas durante 3 d en oscuridad total y luego transferidas a luz blanca de intensidad  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una relación R:RL = 1,1.



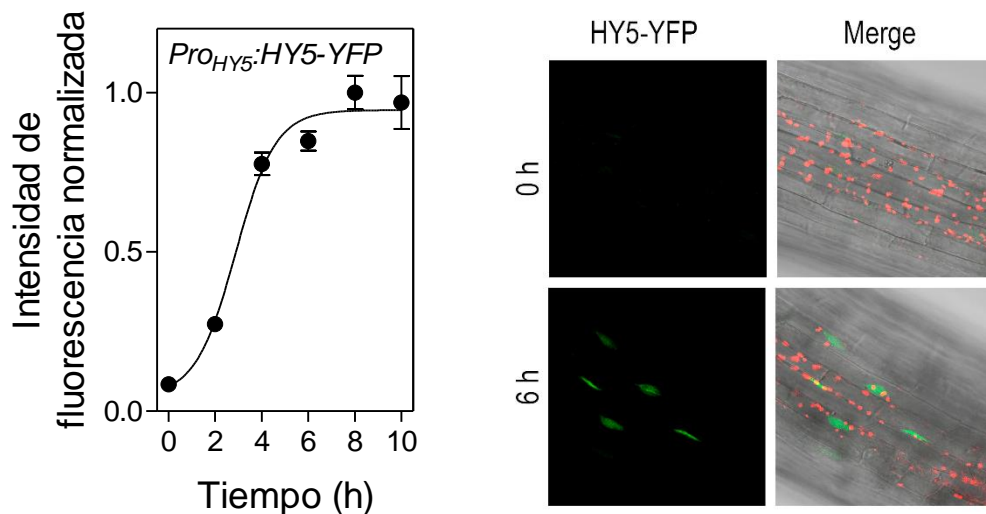
**Figura 16: Rápido decaimiento de la abundancia nuclear de COP1 en respuesta a la luz.**

Intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo (normalizada al máximo de cada experimento) de núcleos de células del hipocotilo, en plántulas que expresan YFP-COP1 crecidas en oscuridad y transferidas a luz blanca a las 0 h. Se grafican medias y error estándar de 8-11 réplicas. A la derecha se muestran imágenes representativas de microscopía confocal de hipocotilos de plántulas *cop1-4/35S:YFP-COP1* crecidas en oscuridad (0 h) o expuestas durante 6 h a la luz blanca (6 h). La fluorescencia de la clorofila se muestra en rojo y se incluye un canal de transmisión.

La señal de fluorescencia nuclear de YFP-COP1 observada por microscopía confocal siguió una caída exponencial con un tiempo de vida media de  $2,4 \pm 0,5$  h (media  $\pm$  error estándar)(Fig. 16). Concluimos que la removilización de YFP-COP1 es mucho más rápida que lo reportado anteriormente para COP1-GUS. Una posible explicación podría ser el mayor aumento de tamaño causado por la fusión de GUS en lugar de YFP, y la tendencia de GUS a formar tetrámeros que podrían interferir con la movilidad y translocación (von Arnim, 2007).

## Hay un retraso en la estabilización de HY5 inducida por luz

El decaimiento de COP1 inducido por luz es mucho más rápido de lo previamente considerado. Sin embargo, el significado biológico que podría atribuirse a este decaimiento depende de la cinética de estabilización observada para los blancos de COP1. Investigamos la cinética de acumulación del factor de transcripción del tipo cierre de leucinas HY5 (Oyama *et al.*, 1997), uno de los principales blancos de COP1 (Osterlund *et al.*, 2000), utilizando la línea transgénica *hy5-1/ProHY5:HY5-YFP* (Oravec *et al.*, 2006), en las mismas condiciones en las cuales se estudió la localización de COP1.

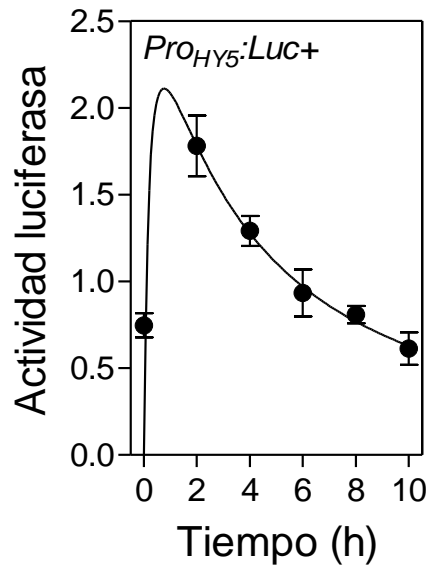


**Figura 17: Hay un retraso en la estabilización de HY5 inducida por luz.** Intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo (normalizada al máximo de cada experimento) de núcleos de células del hipocotilo, en plántulas que expresan HY5-YFP crecidas en oscuridad y transferidas a luz blanca a las 0 h. Se grafican medias y error estándar de 8-14 réplicas. A la derecha se muestran imágenes representativas de microscopía confocal de hipocotilos de plántulas *hy5-1 ProHY5:HY5-YFP* crecidas en oscuridad (0 h) o expuestas durante 6 h a la luz blanca (6 h). La fluorescencia de la clorofila se muestra en rojo y se incluye un canal de transmisión.

Mediante microscopía confocal observamos que con la exposición a la luz el *pool* nuclear de HY5-YFP experimenta un rápido aumento, con una vida media de  $2,9 \pm 0,2$  h (media  $\pm$  error estándar) (Fig. 17), y conduce a niveles elevados relativamente estables entre las 6 h y 10 h. Los resultados son consistentes con un reporte reciente que estudió la estabilidad de HY5 en *blots* de proteínas (Pokhilko *et al.*, 2011).



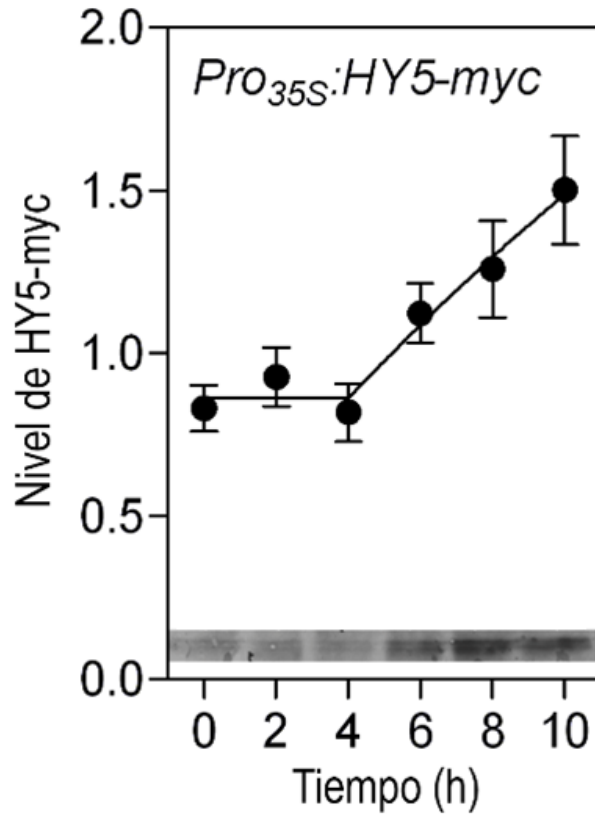
Uno de los componentes que justificarían la acumulación de HY5 es el aumento de la expresión del gen *HY5*. La actividad del promotor del gen *HY5* fue estudiada midiendo la actividad luciferasa de la línea transgénica *ProHY5:LUC+* (Ulm *et al.*, 2004) en las condiciones en que se realizaron los experimentos previamente descritos.



**Figura 18: Cinética de expresión de *HY5* en respuesta a la luz.** Actividad luciferasa controlada por el promotor de *HY5* a lo largo del tiempo (normalizada a la mediana de cada experimento). Se grafican medias y error estándar de 7 placas con plántulas.

La actividad del promotor *HY5* mostró un pico a las 2 h (o antes) de exposición a la luz, seguido por un decaimiento gradual (Fig. 18). Estos datos son consistentes con las cinéticas del mRNA de *HY5* previamente estudiadas (Tepperman *et al.*, 2001; Pokhilko *et al.*, 2011). El decaimiento de la actividad del promotor se inició cuando la tasa de acumulación de *HY5* iba en aumento, evidenciando una contribución de regulación post-transcripcional.

En oscuridad, COP1 ubiquitina *HY5*, que es dirigida a degradación (Osterlund *et al.*, 2000). Para investigar la cinética de la estabilidad de la proteína *HY5*, sin la interferencia de los cambios a nivel transcripcional inducidos por la luz, utilizamos la línea transgénica *hy5-211/Pro35S:HY5-MYC* (Shin *et al.*, 2007).



**Figura 19: Cinética de la estabilidad de HY5 en respuesta a la luz.** Abundancia de la proteína HY5 a lo largo del tiempo (normalizada a la mediana de cada experimento) en plántulas *hy5-211 Pro35S:HY5-MYC*. Se grafican medias y error estándar de 5 réplicas. En el interior del gráfico se muestra un Blot representativo y la cuantificación de las bandas.

La abundancia de la proteína HY5 permaneció estable durante las primeras 4 h de irradiación y luego aumentó con una tasa constante (Fig. 19). De esta forma, en el momento en el cual la estabilización de HY5 se hizo evidente, el pool nuclear de COP1 ya se había reducido al menos a la mitad de lo observado en oscuridad.

Estos resultados indican que la cinética de exclusión del núcleo de COP1 en la desetiación es mucho más rápida que lo reportado anteriormente, y puede ser considerada como un mecanismo de inactivación que permiten la acumulación de HY5 y otros blancos nucleares.

---

## Capítulo 3: Convergencia de las vías de señalización de COP1 y PIFs

---

La respuesta de crecimiento a las señales de sombra se encuentra severamente reducida tanto en el cuádruple mutante *pif1 pif3 pif4 pif5 (pifq)* como en el mutante *cop1*, indicando que las respuestas al sombreado requieren ambas vías de señalización. El objetivo de este capítulo es estudiarlas en forma comparativa, y considerar en qué puntos COP1 podría tener un rol regulatorio.

La vía de señalización de PIF ha sido ampliamente estudiada. La disminución de la irradiancia y R:RL propia del sombreado reduce los niveles de phyB fotoactivo, aumentando los niveles de PIF. Los PIF activan directamente la transcripción de genes de síntesis de auxinas, fitohormonas promotoras del crecimiento, activando la vía que conduce a las respuestas de escape al sombreado. La interacción de PIF con las proteínas DELLA vincula las vías de señalización de brasinoesteroides y giberelinas con la respuesta al sombreado (Jaillais and Vert, 2012; Zheng *et al.*, 2016).

Los factores de transcripción HY5 y HFR1, son blancos de COP1 en oscuridad que regulan negativamente de la señalización de los PIFs, y podrían constituir un posible punto de convergencia (Saijo *et al.* 2003; Osterlund *et al.* 2000; Seo *et al.* 2003; Yang *et al.* 2005).

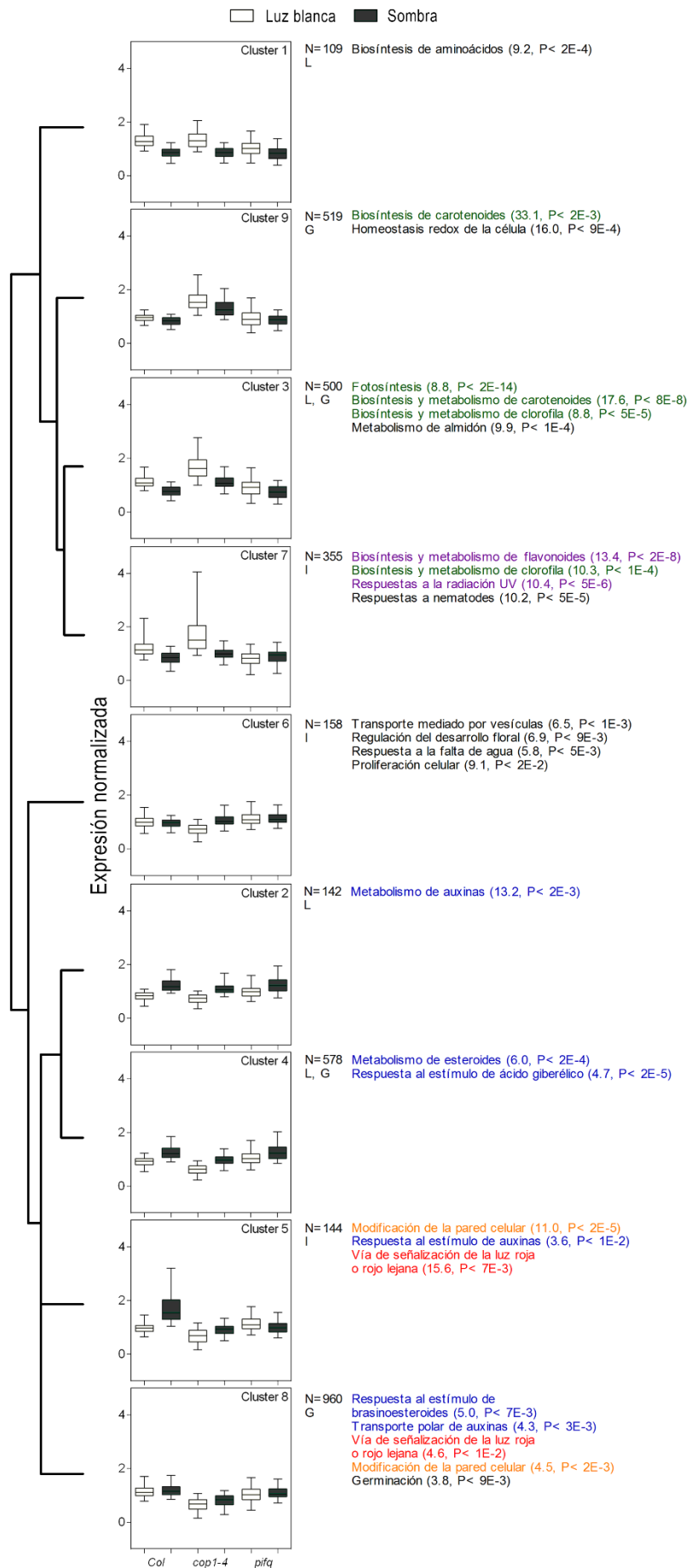
### **A pesar de su fenotipo severo para la respuesta al sombreado, *cop1-4* retiene un conjunto significativo de respuestas a nivel transcripcional**

Para profundizar la caracterización del fenotipo molecular del mutante *cop1-4* durante la respuesta al sombreado, realizamos un análisis del transcriptoma de plántulas *WT* y del mutante *cop1-4*. El cuádruple mutante *pifq* fue incluido para propósitos comparativos. Las plántulas fueron crecidas en luz blanca, y transferidas a sombra simulada 1 h después del inicio del día 3 (los controles permanecieron en luz blanca) y cosechadas a las 4 h de tratamiento.

Los 3465 genes que mostraron efectos significativos con los tratamientos ( $P < 0,043$ ,  $q < 0,050$ ) fueron agrupados de acuerdo a los efectos principales (sombra, genotipo) y su interacción. Se realizó un análisis de *clusters* para cada grupo estadístico dChip, (Li and Hung Wong, 2001). A pesar de las grandes diferencias a nivel experimental, hay una remarcable similitud entre los patrones previamente reportados en estudios que analizaron respuestas rápidas a nivel transcripcional a la disminución de la relación R:RL (Leivar, Monte, *et al.*, 2012) y sombra natural comparada con luz solar (Sellaro *et al.*, 2011)(Fig. S2). Esto último es también cierto para el impacto de la mutación *pifq* (Leivar *et al.* 2012) (Fig. S2). En resumen, las respuestas a las señales de sombra son robustas para los diferentes

grupos de genes, con excepción del *cluster* 6, que muestra menor respuesta en el WT que en los estudios anteriores (Fig. S2).

Cabe destacar, que a pesar de la severa disminución de la respuesta al sombreado de los mutantes *cop1* (McNellis et al. 1994; Crocco et al. 2010; Rolauffs et al. 2012; esta tesis), la mayor parte de los genes que muestran respuestas a la sombra en el WT (1828 genes) también respondieron en el mutante *cop1-4* (1648 genes, 92,1%, *clusters* 1, 2, 3, 4 y 7)(Fig. 20). En los *clusters* 1 y 2, la expresión disminuyó o aumentó (respectivamente) con el tratamiento de sombra simulada, sin efectos significativos de genotipo o interacción. Estos genes estarían relacionados a procesos de ajuste de la forma y función de la planta a las condiciones de sombra, independientemente de *COP1*.



**Figura 20: Un gran número de genes retiene respuestas a la sombra en el mutante *cop1-4*.** Los 3465 genes que mostraron efectos significativos de los tratamientos en el ANOVA ( $P < 0.043$ ,  $q < 0.050$ ) fueron agrupados de acuerdo a los efectos significativos (L, condición lumínica; G, genotipo) y su interacción (I). Los *Box-plots* muestran la mediana, en rango entre cuartiles 1–3 y el intervalo de confianza del 95% de los valores normalizados.

En los *clusters* 3 y 4, la expresión disminuyó o aumentó (respectivamente) con el tratamiento de sombra simulada, y fue afectada por la mutación *cop1-4* sin interacción significativa entre genotipo y condición de sombreado (por ejemplo la respuesta a la sombra no fue afectada por las mutaciones)(Fig. 20).

En el *cluster* 7, solo la mutación *pifq* falló en la respuesta a la sombra, y estos genes mostraron una interacción significativa entre genotipo y condición de sombreado (Fig. 20).

Los genes incluidos en los *clusters* 1, 3 y 7 mostraron reducciones en la expresión similares al *WT* en sombra en el mutante *cop1-4*. Los términos de ontología génica sobre-representados entre estos genes (Vandepoele et al., 2009) incluyen la biosíntesis de aminoácidos ( $P < 2E-4$ ) en el *cluster* 1, fotosíntesis ( $P < 2E-14$ ), biosíntesis y metabolismo de carotenoides ( $P < 8E-8$ ) y metabolismo de ( $P < 1E-4$ ) en el *cluster* 3, y biosíntesis y metabolismo de flavonoides ( $P < 2E-8$ ), respuestas a la radiación UV ( $P < 5E-6$ ) y respuestas a nematodos ( $P < 5E-5$ ) en el *cluster* 7. Biosíntesis y metabolismo de clorofila ( $P < 5E-8$ ) se encontraron sobre-representados en los *clusters* 3 y 7.

Los genes incluidos en los *clusters* 2 y 4, mostraron una promoción de la expresión similar al *WT* en el mutante *cop1-4*. Muchos genes relacionados a hormonas están presentes en estos *clusters*, incluyendo dos genes relacionados al metabolismo de auxinas en el *cluster* 2 ( $P < 2E-3$ )(*YDK1* y *RGLG1*), siete genes de metabolismo de esteroides ( $P < 2E-4$ ) y 10 de respuesta al estímulo de ácido giberélico ( $P < 2E-5$ )(incluyendo seis genes que codifican proteínas con dominios MYB, *GAI* y *EXPANSIN A3*) en el *cluster* 4.

### **Genes que fallaron en la respuesta a la sombra en el mutante *cop1-4***

La respuesta a la sombra fue completamente impedida por la mutación *cop1* solo para los genes del *cluster* 5 (144 genes, 4.2%), el cual mostró una interacción significativa entre la condición de sombreado y el genotipo, observándose promoción en el *WT* y no en los mutantes (Fig. 20). Estos genes son probablemente consecuencia de la mayor actividad

nuclear de COP1 en sombra. El *cluster* 5 incluye numerosos genes asociados a la modificación de la pared celular ( $P < 2E-5$ ), como *EXPANSIN-LIKE A2*, *EXPANSIN A8* y *EXPANSIN A11*. El *cluster* 5 también incluye genes de respuesta al estímulo de auxinas ( $P < 1E-2$ )(*SMALL AUXIN UP RNA 23*, *33* y *68*, e *IAA6* e *IAA19*), dos genes de señalización de luz roja/rojo lejano ( $P < 7E-3$ )(*PHYA* y *ATHB2*) y *HFR1*.

### **Genes afectados por la mutación *cop1-4* incluso en ausencia de sombra**

La mutación *cop1-4* afectó los niveles basales de expresión en ausencia de sombra de una significativa cantidad de genes (3070 genes, 88.6%, clusters 3, 4, 6, 7, 8, 9). Los *clusters* 3, 4 y 7 fueron descritos entre aquellos en los cuales el mutante *cop1* retiene respuestas a la sombra. En los *clusters* 8 y 9, la expresión génica fue aumentada o disminuida (respectivamente) por la mutación *cop1-4*, pero esos genes no respondieron significativamente a la sombra.

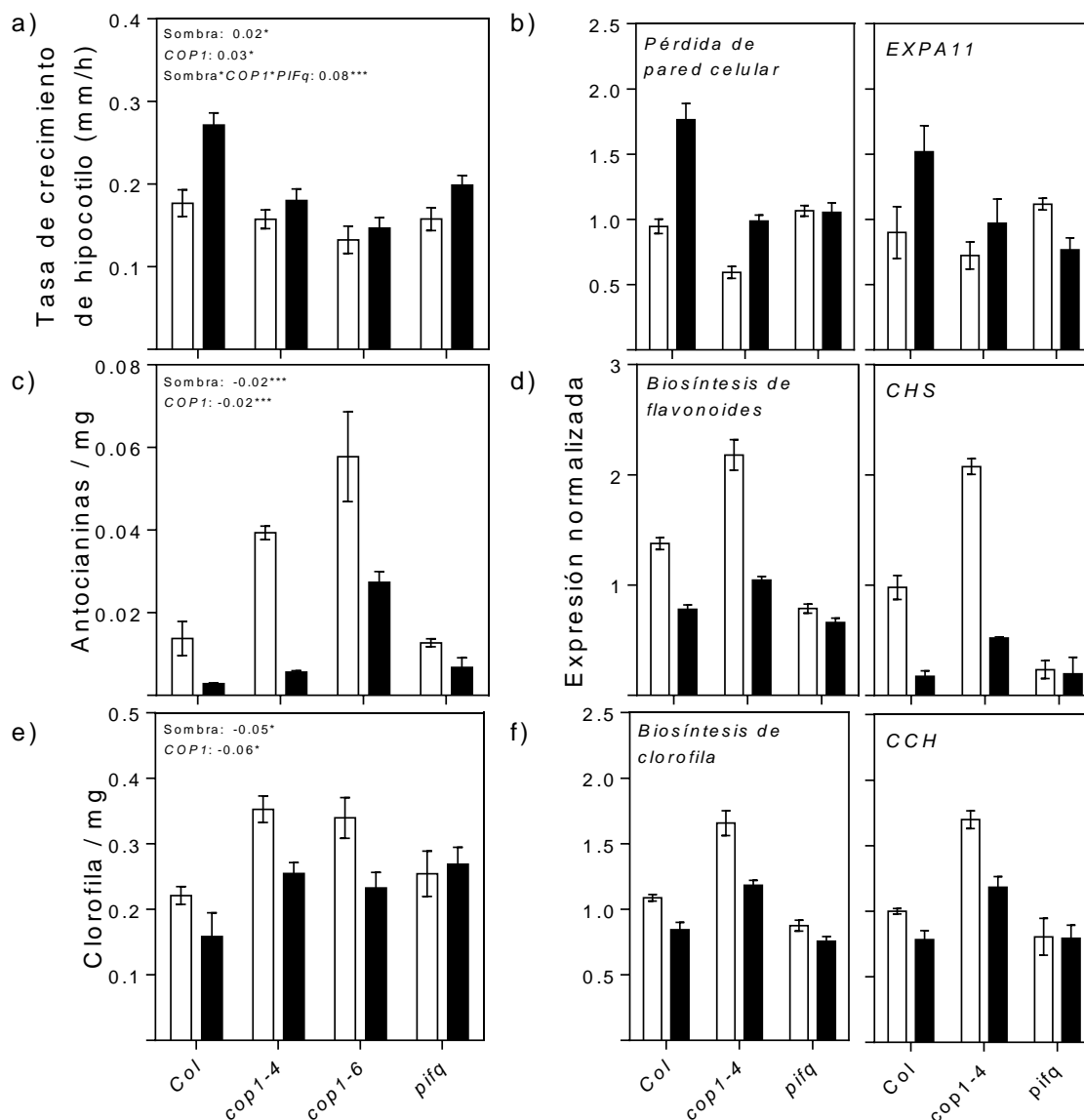
El *cluster* 8 se encuentra enriquecido en genes relacionados a hormonas, incluyendo cuatro genes de respuesta al estímulo de brasinoesteroides ( $P < 7E-3$ ), seis genes de transporte polar de auxinas ( $P < 3E-3$ )(incluyendo *PIN4* y *7*, y *PIN-LIKE 2* y *5*). Cuatro genes de señalización de luz roja/rojo lejano ( $P < 1E-2$ )(*PHYB*, *PROTEIN PHOSPHATASE 5*, *HY5* y *PIF3*), modificación de la pared celular ( $P < 2E-3$ ) y germinación ( $P < 9E-3$ ) también se encuentran presentes en el *cluster* 8. El *cluster* 9 se encuentra enriquecido en la biosíntesis de carotenoides ( $P < 2E-3$ ) y homeostasis redox de la célula ( $P < 9E-4$ ). El *cluster* 6, en el cual la expresión solo disminuye solo en el mutante *cop1* en ausencia de sombra, se encuentra enriquecido en genes de transporte mediado por vesículas ( $P < 1E-3$ ), regulación del desarrollo floral ( $P < 9E-3$ ), respuesta a la falta de agua ( $P < 5E-3$ ) y proliferación celular ( $P < 2E-2$ ).

Los *clusters* 4, 8 y 6, cuya expresión se encuentra reducida en el mutante *cop1* en ausencia de sombra, contienen genes asociados a términos GO relacionados con el crecimiento (por ejemplo genes relacionados a hormonas que promueven el crecimiento). Buscamos la información funcional disponible en la literatura para todos los genes presentes en esas categorías, para investigar si su reducida expresión podía justificar el reducido crecimiento del hipocotilo de *cop1*. Algunos de dichos genes promueven el crecimiento (*EER1*, *APM1i*, *SAV1/DWF4*, *GPA1*, *MYB30*, *HMG1*, *CPD/CBB3/DWF3*) pero otros lo inhiben (por ejemplo *PILS5*, *MIF1*, *GAI*, *GASA1*, *CYP72C1*, *WES1/GH24*).



## Los mutantes *cop1-4* y *cop1-6* retienen respuestas fisiológicas a la sombra

El análisis del transcriptoma sugiere que el mutante *cop1* podría retener algunas respuestas fisiológicas a la sombra. Los términos GO sobre-representados entre los *clusters* donde el mutante mostró una fuerte respuesta de expresión génica a la sombra, incluyendo biosíntesis y metabolismo de flavonoides, y biosíntesis de clorofila.



**Figura 21: A pesar de su fenotipo severo de respuesta al sombreado, los mutantes *cop1-4* y *cop1-6* retienen respuestas a la sombra en la acumulación de pigmentos.** Tasa de crecimiento del hipocotilo (a), contenido de antocianinas relativo al peso fresco (c) y contenido de clorofila relativo al peso fresco (e). Se grafican medias y error estándar. Para cada respuesta fisiológica se indican

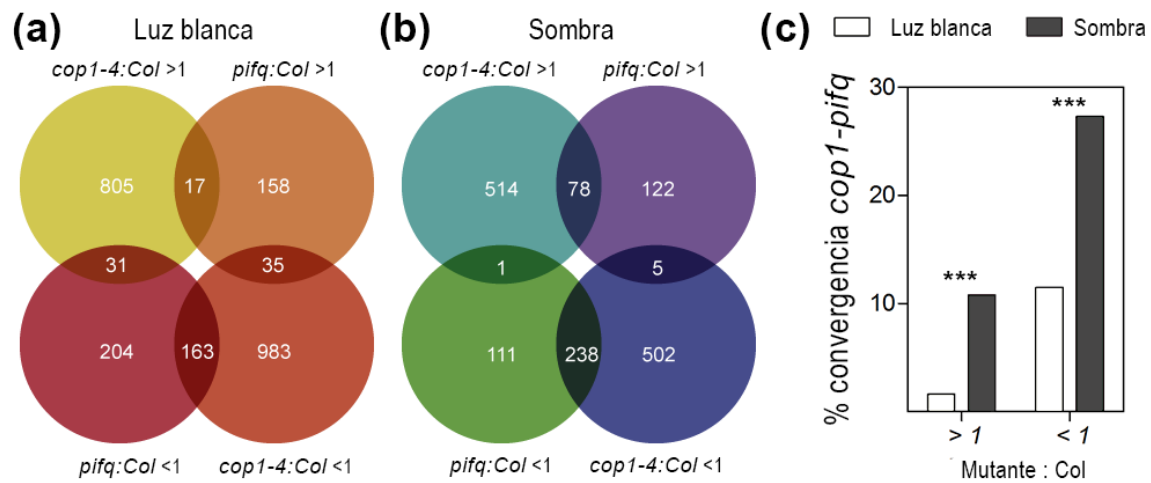
las diferencias significativas (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.0001$ ). (b, d, f), Expresión normalizada de todos los genes que mostraron efectos significativos de los tratamientos en cada término de ontología génica (GO) relacionado al proceso fisiológico (izquierda) y expresión normalizada de un gen representativo de cada grupo (derecha): (b) Pérdida de pared celular (5 genes), (d) biosíntesis de flavonoides (32 genes), (f) biosíntesis de clorofila (32 genes).

La expresión normalizada de los genes de estas dos categorías que mostraron efectos significativos de los tratamientos fueron promediados para ver la tendencia conjunta, y comparados con las respuestas de antocianinas y clorofila (Fig. 21). Con propósitos comparativos, también incluimos la respuesta de crecimiento del hipocotilo y los genes de pérdida de pared celular que mostraron efectos significativos de los tratamientos.

Como se esperaba, la respuesta de escape al sombreado relacionada con el crecimiento del hipocotilo se vio severamente inhibida en los mutantes *cop1* (Fig. 21). Este patrón coincidió con la expresión media de los genes de pérdida de pared celular y por la respuesta individual de genes como *EXPANSIN A11* (Fig. 21). Por el contrario, la reducción inducida por sombra de los niveles antocianinas y clorofila fue al menos tan intensa como en los mutantes *cop1* (Fig. 21). Nuevamente, los patrones promedio de expresión de genes de biosíntesis de flavonoides y clorofila, así como los patrones de expresión de genes individuales dentro de dichos grupos como *CHALCONE SYNTHASE (CHS)* y *CONDITIONAL CHLORINA (CCH)*, copiaron la respuesta (Fig. 21). Se ha demostrado que el complejo COP1/SPA controla la estabilidad de los factores PAP1 y PAP2, involucrados en la acumulación de antocianinas (Maier *et al.*, 2013).

### **La sombra aumenta la convergencia entre las respuestas transcripcionales de *cop1* y *pifq***

Para investigar el grado de convergencia entre los fenotipos de los mutantes *cop1-4* y *pifq*, sus diferencias de expresión génica con el *WT* fueron evaluadas por el test de t de Student. El análisis se restringió a aquellos genes que muestran efectos significativos en los tratamientos del ANOVA.



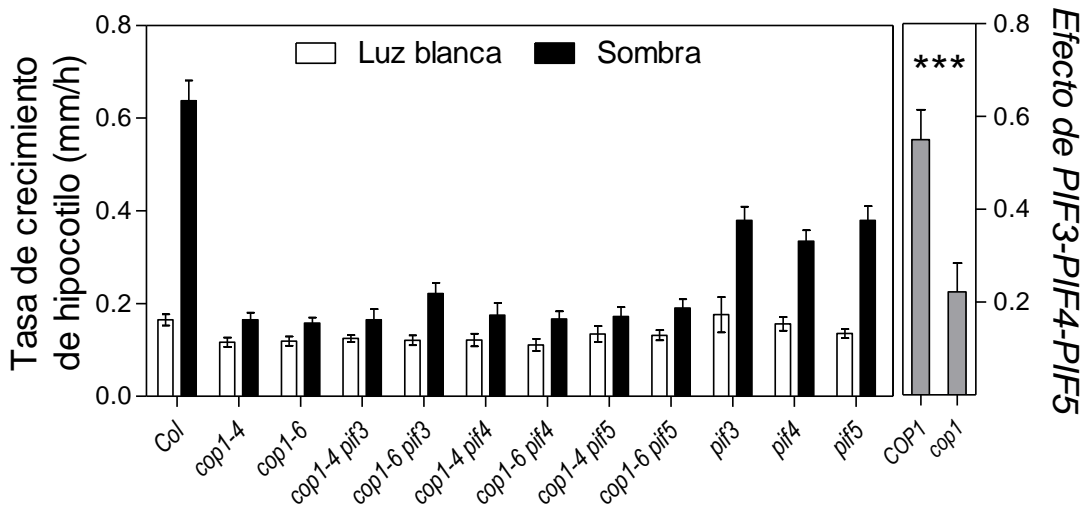
**Figura 22: La sombra aumenta la convergencia del fenotipo transcripcional de *cop1* y *pifq* en *Arabidopsis*.** Diagrama de Venn de los genes cuya expresión aumentó o disminuyó significativamente en los mutantes *cop1-4* y/o *pifq* comparado con el WT (t-test), en condiciones de luz blanca (a) o sombra (b), y la convergencia *cop1-pifq* en cada condición (c). Los porcentajes se calculan como la relación entre el número de genes coincidentes (superposición de los círculos) relativo al total de genes afectados individualmente o por ambas mutaciones en el mismo sentido (Luz blanca >1: 17/1046; Luz blanca <1: 163/1350; Sombra >1: 78/714; Sombra <1: 238/851). Se realizaron pruebas de contingencia mediante el test exacto de Fisher y se indica la significancia ( $P < 0,0001$ ).

Encontramos 2514 genes con cambios significativos de expresión en el mutante *cop1-4* y 1076 en el mutante *pifq*. La proporción de genes con expresión reducida o aumentada tanto por la mutación *cop1-4* como *pifq* (es decir, la convergencia), aumentaron significativamente en sombra la comparación con la condición de luz blanca (Fig. 22). El enriquecimiento en la convergencia *cop1-4-pifq* fue también significativamente mayor para los genes que aumentaron su expresión que para aquellos que la redujeron como resultado de las mutaciones (Fig. 22,  $P < 0,0001$ ).

El grupo de genes que disminuyó su expresión comparado con el *WT* en ambos mutantes en luz blanca se encuentra enriquecido en genes de biosíntesis de flavonoides (13,1-veces de enriquecimiento,  $P < 3E-4$ ). El grupo de genes que disminuyó su expresión en ambos mutantes en sombra se encuentra enriquecido en genes de modificación de la pared celular (14,9-veces de enriquecimiento,  $P < 2E-5$ ) y la vía de señalización de la luz roja/rojo lejano (13,8-veces de enriquecimiento,  $P < 2E-3$ ).

## Los fenotipos de escape al sombreado de *cop1* y *pifq* no son aditivos

Dado que los datos de expresión génica muestran que la convergencia *cop1-4-pifq* aumenta con la sombra, especialmente para genes relacionados a la respuesta al sombreado, se estudió la respuesta de crecimiento del hipocotilo en los dobles mutantes *cop1-4 pif3*, *cop1-6 pif3*, *cop1-4 pif4* y *cop1-6 pif4*.

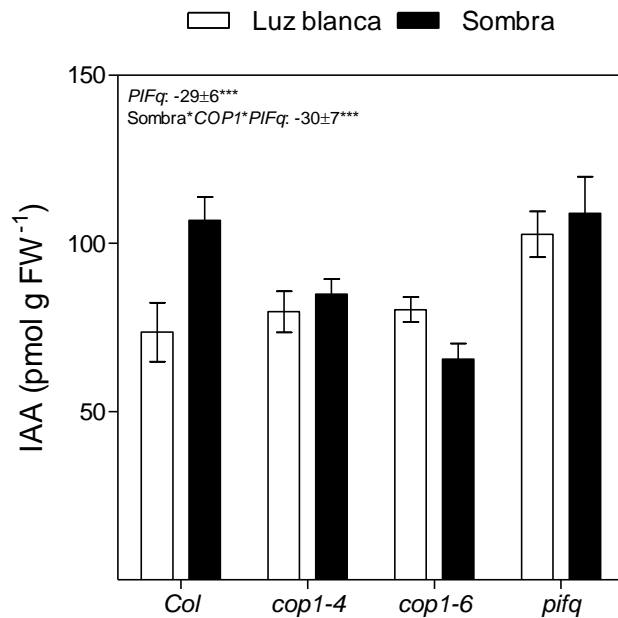


**Figura 23: COP1 aumenta el efecto de *PIF3*, *PIF4* y *PIF5* en la respuesta al sombreado.** Tasa de crecimiento del hipocotilo. Se grafican medias y error estándar de 4-12 réplicas. El efecto de *PIF3*, *PIF4* y *PIF5* en sombra, en el fondo genético *COP1* comparado al mutante *cop1*, su error estándar y la significancia estadística en prueba de t se muestran a la derecha (\*\*\*,  $P < 0,0001$ ).

Como se esperaba, las respuestas de escape al sombreado se encontraron reducidas en ambos alelos *cop1* (McNellis et al. 1994; Crocco et al. 2010; Rolaufts et al. 2012), *pif3* (Leivar, Monte, et al., 2012; Leivar, Tepperman, et al., 2012; Sellaro et al., 2012) *pif4* y *pif5* (Lorrain et al., 2008; Leivar et al., 2008; Sellaro et al., 2012) (Fig. 23). Sin embargo, los efectos de las mutaciones *cop1* y *pif3*, *pif4* o *pif5* no fueron aditivos; es decir que la acción de los PIFs en sombra es mayormente dependiente de *COP1* (Fig. 23). Este resultado difiere del caso descrito en plántulas etioladas, donde los dobles mutantes *pif1 cop1* son más bajos que los mutantes simples (Xu et al., 2014), y sugiere que los PIFs y *COP1* podrían compartir una vía de señalización común en la respuesta al sombreado.

## Los niveles de auxinas no aumentan en *cop1* ni *pifq* en respuesta a la sombra

Las respuestas de escape al sombreado han sido asociadas a niveles aumentados de auxinas activas (IAA) (Tao *et al.*, 2008), una respuesta que involucra la promoción mediada por PIF de la expresión de genes *YUCCA* de síntesis de auxinas (Hornitschek *et al.*, 2012). Dada la convergencia de los fenotipos de los mutantes *cop1* y *pifq* en términos de patrones de expresión de genes relacionados a la respuesta al sombreado y el crecimiento del tallo, examinamos los niveles de IAA en el WT y en los mutantes *cop1-4*, *cop1-6* y *pifq*.



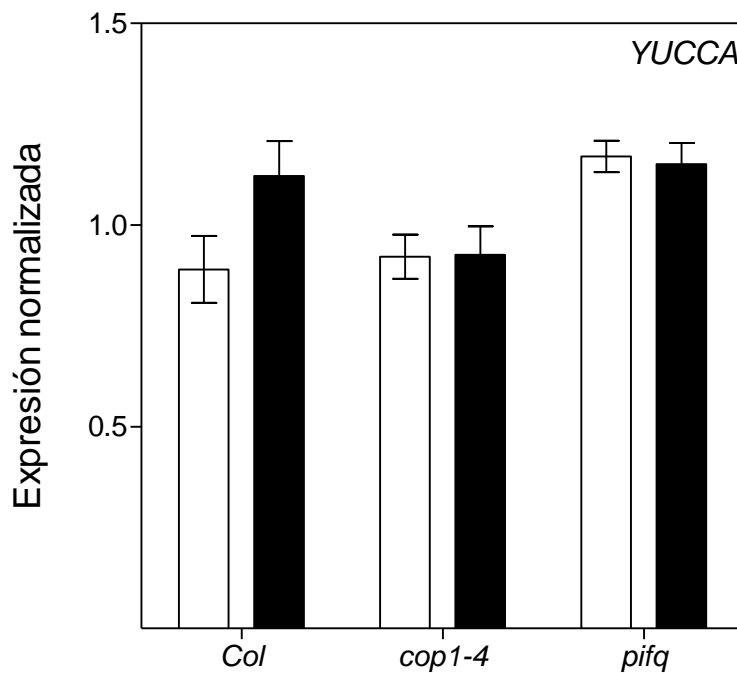
**Figura 24: COP1 y PIFq son necesarios para la acumulación de auxinas en respuesta a la sombra.**

Contenido de ácido indol-acético (IAA) relativo al peso fresco. Se grafican medias y error estándar de cuatro réplicas. Se indican los términos estadísticamente significativos (\*\*\*,  $P < 0,001$ ).

Los resultados confirmaron el incremento de los niveles de IAA en la respuesta a la sombra en el *WT* y que la respuesta requiere a los *PIFs*. Adicionalmente, mostramos que el mutante *cop1* carece también de la capacidad de aumentar los niveles de IAA en respuesta a la sombra (Fig. 24).

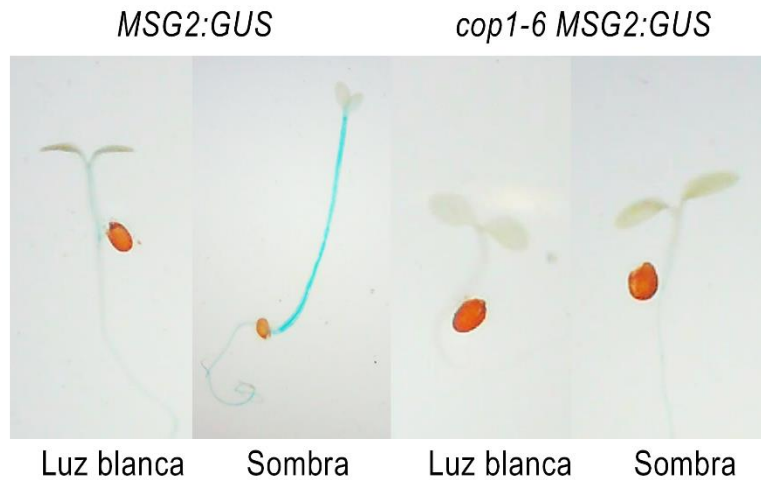
Notablemente, el mutante *pifq* muestra un alto nivel basal de IAA en ambas condiciones (comparable al *WT* en sombra). Esto podría reflejar múltiples acciones regulatorias de los

PIFs como sugiere la observación de que tanto la mutación como la sobreexpresión de los genes PIF pueden reducir los niveles de IAA (Hornitschek *et al.*, 2012). Los niveles de IAA correlacionaron con la expresión normalizada de los genes *YUCCA* de mayor expresión, que son promovidos por la sombra (Fig. 25, Stepanova *et al.* 2011; Won *et al.* 2011).



**Figura 25: La expresión de genes *YUCCA* correlaciona con los niveles de auxinas.** Expresión normalizada de los genes *YUCCA* 2, 3, 5, 7, 8 y 9 (datos obtenidos en microarreglos).

La línea *ProMSG2::GUS* fue utilizada como reportero para analizar la señalización de auxinas (Kami *et al.*, 2014), en los fondos genéticos *WT* y *cop1-6*. *MSG2* es una versión sintética del promotor de *IAA19*. Se observó un alto grado de tinción en el hipocotilo del *WT* en sombra, pero no en el control de luz blanca ni en el fondo mutante *cop1* en ambas condiciones (Fig. 26). Estas observaciones indican que *COP1* es necesario para la acumulación de IAA en respuesta a la sombra.

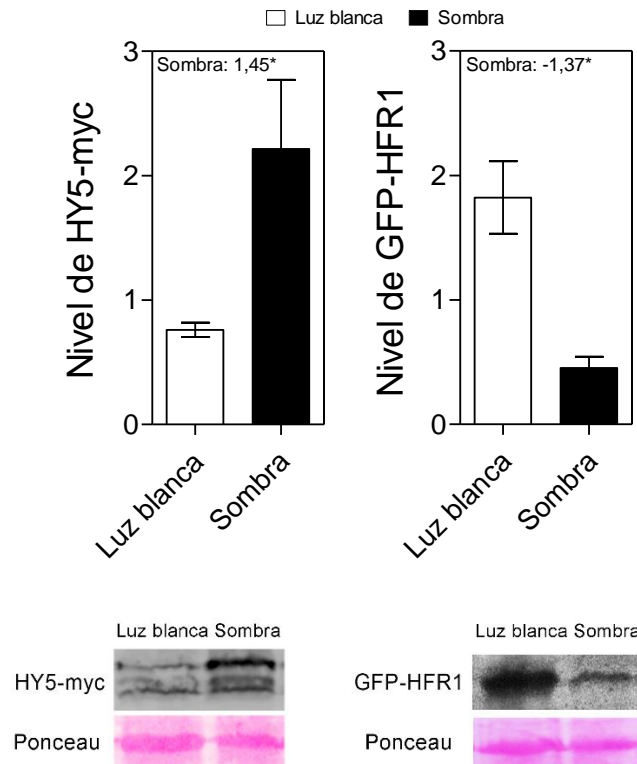


**Figura 26: Las señales de sombra no inducen la acumulación de auxinas en el mutante *cop1*.** Imágenes representativas de plántulas *ProMSG2::GUS* y *cop1-6/ProMSG2::GUS*. Luego de tinción con  $\beta$ -glucuronidasa (GUS).

### **COP1 promueve la degradación de HFR1 en sombra, pero no de HY5**

La expresión génica y los datos genéticos son consistentes con una convergencia en la señalización de COP1 y los PIFs. Esta convergencia podría ocurrir en múltiples niveles. Nos enfocamos en el análisis de dos proteínas que son capaces de interactuar con COP1 y como resultado de dicha interacción ser blancos de degradación en el proteasoma en plántulas crecidas en oscuridad: HY5 and HFR1 (Hardtke Deng, X.W., 2000; Saijo *et al.*, 2003; Duek *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005). Al menos bajo ciertas condiciones, estas proteínas pueden interferir con la señalización de los PIFs (Hornitschek *et al.*, 2009; Toledo-Ortiz *et al.*, 2014), y podrían de esta manera dar lugar a la convergencia propuesta. La hipótesis es que la mayor abundancia nuclear de COP1 en sombra favorece la degradación de HY5 y/o HFR1 y de esta forma facilita la actividad de los PIFs.

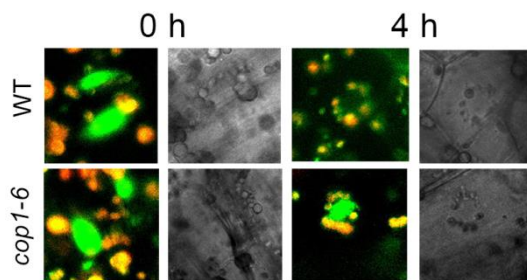
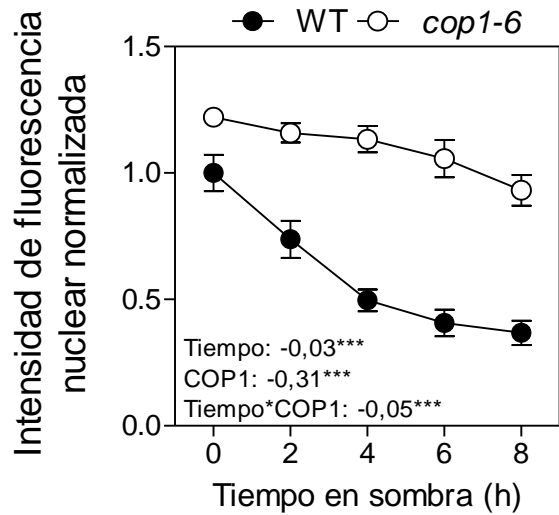
Esta hipótesis tiene tres predicciones: HY5 y/o HFR1 deberían reducir su abundancia en sombra comparado con la condición de luz blanca, esta reducción debería ser dependiente de *COP1*, y las mutaciones *hy5* y/o *hfr1* deberían, al menos parcialmente, rescatar el fenotipo de respuesta al sombreado de *cop1*.



**Figura 27: La sombra aumenta la estabilidad de HY5 y reduce la estabilidad de HFR1.** Plántulas crecidas en luz blanca o sombra y cosechadas al mediodía del día 3. Se grafican medias y error estándar de tres réplicas independientes. Se indican los términos estadísticamente significativos del modelo de regresión lineal (\*,  $P < 0.05$ ). En la parte inferior se muestran *blots* de proteínas representativos.

Para comprobar la primera predicción, evaluamos los niveles de HY5-myc y GFP-HFR1 expresados bajo promotor constitutivo. Las plántulas fueron crecidas durante 3 días en luz blanca o sombra simulada. La figura 27 muestra que la sombra no reduce la estabilidad de HY5, sino que incluso la aumenta. Por lo tanto, HY5 no cumple con la primera predicción de la hipótesis. Por el contrario, la sombra reduce los niveles de HFR1.

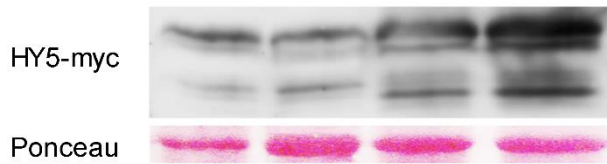
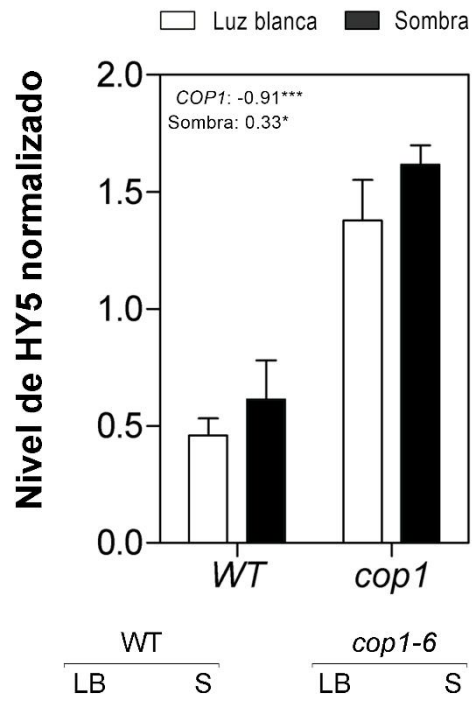




**Figura 28: La sombra reduce la abundancia nuclear de HFR1 de manera dependiente de *COP1*.**

Intensidad de fluorescencia nuclear en plántulas que expresan *Pro35S:GFP-HFR1* en el fondo genético *WT* y mutante *cop1-6*, en función de las horas de tratamiento de sombra (cosechadas a las 10 h del día 3). Se grafican medias y error estándar de 10-12 réplicas. Se indican los términos estadísticamente significativos (\*\*\*,  $P < 0.0001$ ). En la parte inferior se muestran núcleos representativos a las 0 h y 4 h de tratamiento de sombra.

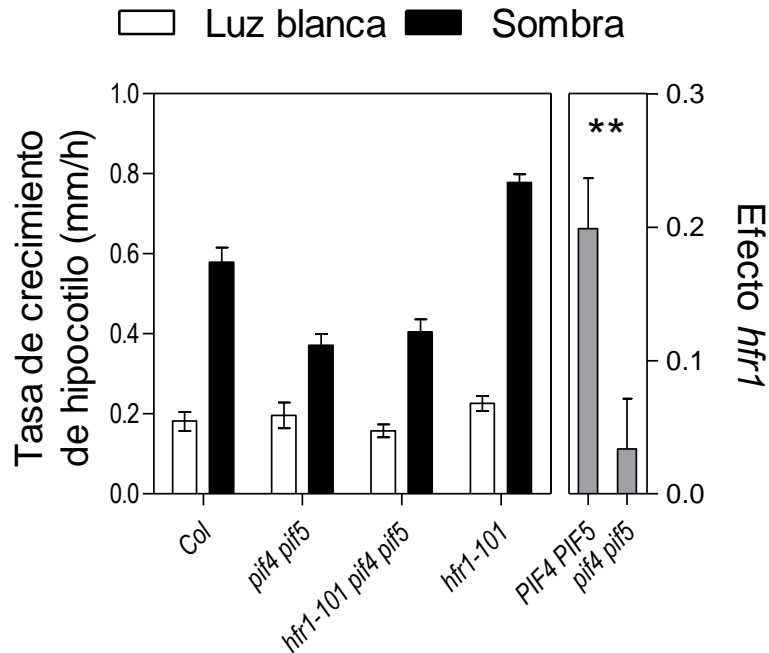
En experimentos más detallados de microscopía confocal, observamos que la transferencia de luz blanca a condiciones de sombra causó un decaimiento exponencial de los niveles nucleares de GFP-HFR1, mientras que en el fondo mutante *cop1* los niveles de GFP-HFR1 solo se redujeron ligeramente en sombra (Fig. 28). La interacción significativa entre el tiempo de sombreado y la presencia o ausencia de *COP1* indica que el decaimiento inducido por la sombra de los niveles HFR1 nuclear depende de *COP1*. La ligera reducción de HFR1 en sombra en el fondo *cop1* podría deberse a una actividad residual de *COP1* o a la acción de otros mecanismos de degradación.



**Figura 29: El aumento de la abundancia de HY5 es observado incluso en el fondo mutante *cop1*.** Niveles de HY5-myc en fondo genético WT y mutante *cop1* en condiciones de luz blanca y sombra. Se grafican medias y error estándar de cinco réplicas biológicas. Se indican los términos estadísticamente significativos del modelo de regresión lineal (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.0001$ ). LB, luz blanca; S, sombra.

El aumento de la abundancia de HY5 en sombra fue observada incluso en el fondo mutante *cop1* (Fig. 29). El mutante *cop1* retuvo mayores niveles de HY5 que el WT independientemente de la sombra, sugiriendo que los niveles de actividad de COP1 en luz blanca podrían ser suficientes para controlar la abundancia de HY5 (Fig. 29).

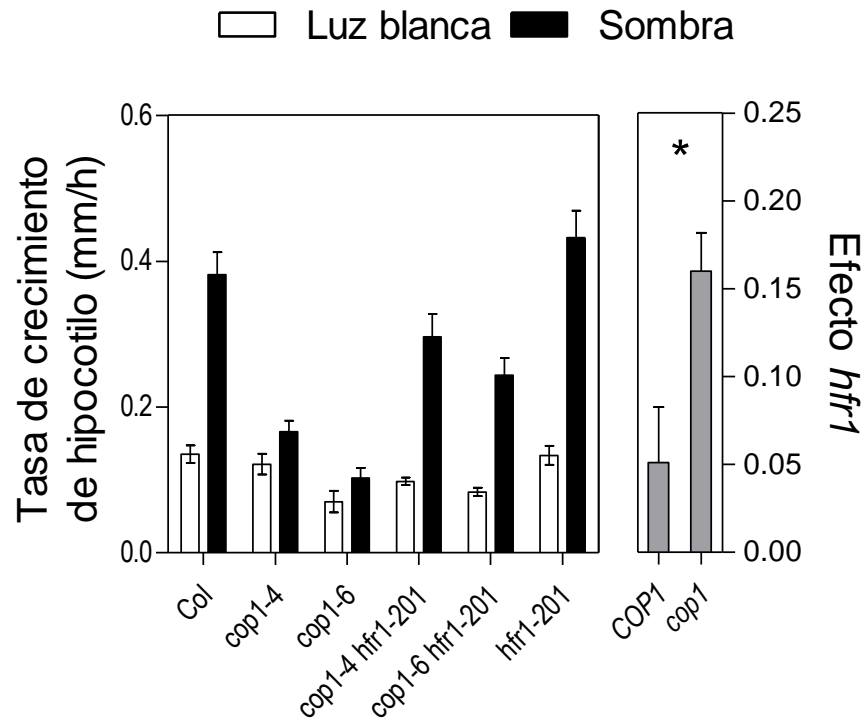
## La mutación *hfr1* rescata las respuestas al sombreado de *cop1*



**Figura 30:** El efecto de la mutación *hfr1* es reducido por la mutación *pif4 pif5*. Tasa de crecimiento de hipocotilo en el genotipo *WT*, mutantes *pif4 pif5*, *hfr1* y triple mutante *hfr1pif4 pif5* en condiciones de luz blanca y sombra simulada. Se grafican medias y error estándar de 4 réplicas. A la derecha se grafica el efecto de la mutación *hfr1* en el fondo genético *PIF4 PIF5* y mutante *pif4 pif5*. Se indican las diferencias significativas en prueba de t (\*\*,  $P < 0,01$ ).

Como se ha mencionado, HFR1 inhibe a los PIF mediante la formación de heterodímeros que evitan su pegado al ADN (Hornitschek *et al.*, 2009). En las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, se comprobó que la promoción del crecimiento del hipocotilo inducida por la sombra simulada en el *WT* fue más reducida en el doble mutante *pif4 pif5* (Lorrain *et al.*, 2008) y mayor en el simple mutante *hfr1* (Hornitschek *et al.*, 2009)(Fig. 30). El efecto de la mutación *hfr1* en sombra fue significativamente mayor en el fondo genético *PIF4 PIF5* que en *pif4 pif5* (Fig. 30). Este efecto fue calculado mediante un modelo lineal de regresión lineal por pasos que incluye los términos “Sombra”, “*PIFq*”, “*hfr1*”, y las interacciones “Sombra\**PIFq*\**hfr1*” y “Sombra\**pifq*\**hfr1*”.

Para poner a prueba la tercera predicción de la hipótesis en el caso de HFR1, evaluamos el fenotipo de respuesta al sombreado en *cop1*, *hfr1* y dobles mutantes *cop1 hfr1*.



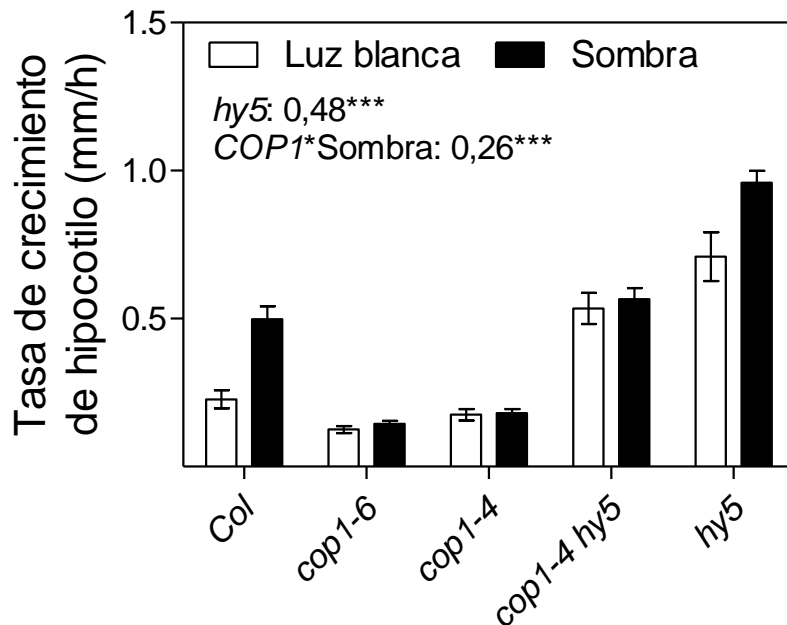
**Figura 31: El efecto de la mutación *hfr1* es aumentado por la mutación *cop1*.** Tasa de crecimiento de hipocotilo en el genotipo *WT*, mutantes *cop1*, *hfr1* y dobles mutantes *cop1 hfr1* en condiciones de luz blanca y sombra simulada. Se grafican medias y error estándar de 12 réplicas. A la derecha se grafica el efecto de la mutación *hfr1* en el fondo genético *COP1* y mutante *cop1*. Se indican las diferencias significativas en prueba de t (\*,  $P < 0,05$ ).

La falta de respuesta de crecimiento observada en los mutantes *cop1* fue recuperada en los dobles mutantes *cop1 hfr1* (Fig. 31). El análisis estadístico indica que el efecto de la mutación *hfr1* en sombra fue significativamente mayor en el fondo genético en el mutante *cop1* que en el fondo genético *COP1* (Fig. 31). Este efecto fue calculado mediante un modelo lineal de regresión lineal por pasos que incluye los términos “Sombra”, “*COP1*”, “*hfr1*”, y las interacciones “Sombra\**COP1*\**hfr1*” y “Sombra\**cop1*\**hfr1*”.

Esta observación es consistente con reportes previos que muestran que la mutación *hfr1* recupera la respuesta a la baja relación R:RL en el triple mutante *spa1 spa3 spa4* (Rolauffs *et al.*, 2012) y el crecimiento del hipocotilo en plántulas *cop1* etioladas (Kim *et al.*, 2002).

Para poner a prueba la tercera predicción para HY5, evaluamos el fenotipo de respuesta al sombreado de *cop1*, *hy5* y el doble mutante *cop1 hy5*. La falta de respuesta observada en

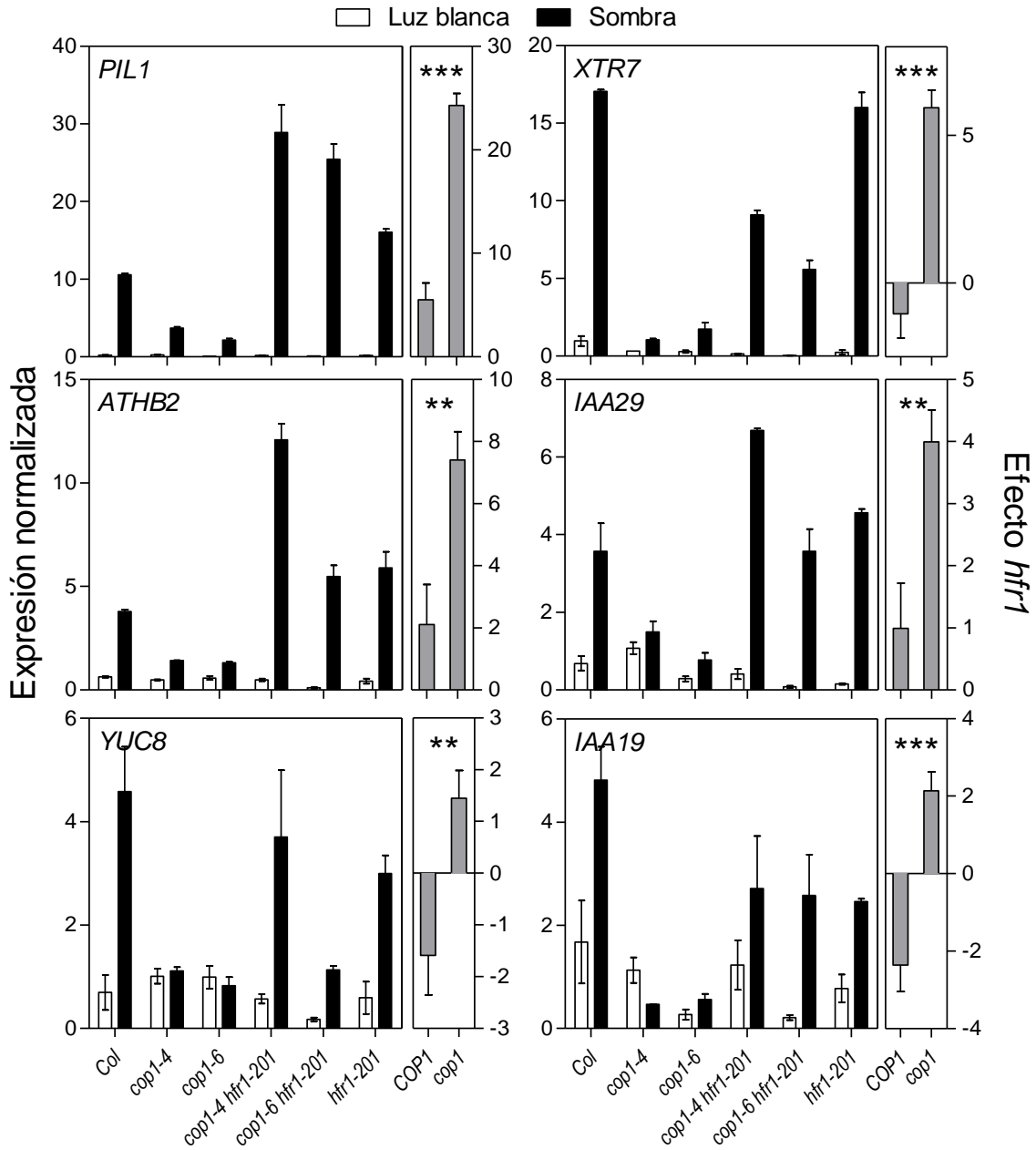
los mutantes *cop1* no fue rescatada en el doble mutante *cop1 hy5* (Fig. 32 Rolauffs et al. 2012).



**Figura 32: La mutación *hy5* no rescata la respuesta de crecimiento a la sombra del mutante *cop1*.** Tasa de crecimiento de hipocotilo en el genotipo *WT*, mutantes *cop1*, *hy5* y dobles mutantes *cop1 hy5* en condiciones de luz blanca y sombra simulada. Se grafican medias y error estándar de 8 réplicas. Se indican los términos estadísticamente significativos (\*\*\*,  $P < 0,001$ ).

Cabe destacar que *hfr1* rescató la respuesta al sombreado de *cop1* sin aumentar el crecimiento del hipocotilo en luz blanca, mientras que *hy5* aumentó el crecimiento del hipocotilo en luz blanca pero falló en rescatar la respuesta al sombreado. No se ha observado mayor crecimiento en *hy5* en reportes previos (Rolauffs *et al.*, 2012), probablemente porque fueron realizados en condiciones de luz continua, donde otros componentes de la señalización de la luz podrían compensar la ausencia de HY5.

Para investigar si la convergencia COP1-PIF es mediada por HFR1, analizamos la expresión de cuatro blancos tempranos de PIFs en la respuesta al sombreado (Hornitschek *et al.*, 2009) en los mutantes *cop1*, *hfr1* y *cop1 hfr1*.



**Figura 33: La mutación *hfr1* rescata significativamente la expresión génica en respuesta a la sombra del mutante *cop1*.** Expresión normalizada de *PIL1*, *XTR7*, *ATHB2*, *IAA29*, *YUC8* e *IAA19*. Se grafican medias y error estándar de tres réplicas. A la derecha de cada gen se grafica el efecto de la mutación *hfr1* en sombra en el fondo genético *COP1* y mutante *cop1*. Se indican las diferencias significativas en prueba de t: \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.0001.

La expresión de *XTR7*, *PIL1*, *ATHB2* e *IAA29* resultó severamente reducida en los mutantes *cop1* en sombra (Fig. 33). Comparado con el *WT*, la mutación *hfr1* causó a lo sumo un débil incremento de la expresión. Sin embargo, en los cuatro genes, la mutación *hfr1* rescató

significativamente (y en algunos casos completamente) la respuesta de expresión de dichos blancos transcripcionales de PIF en el fondo genético mutante *cop1* (Fig. 33). La respuesta de expresión de los genes *YUC8* e *IAA19* en sombra simulada también se encontró impedida en los mutantes *cop1* y fue recuperada en el doble mutante *cop1 hfr1* (Fig. 33; Rolaufts et al. 2012). Para todos los genes investigados, el impacto de la mutación *hfr1* fue significativamente mayor en el fondo genético *cop1* que en *COP1*.

---

Capítulo 4: *COP1* regula la estabilidad de las  
proteínas DELLA

---

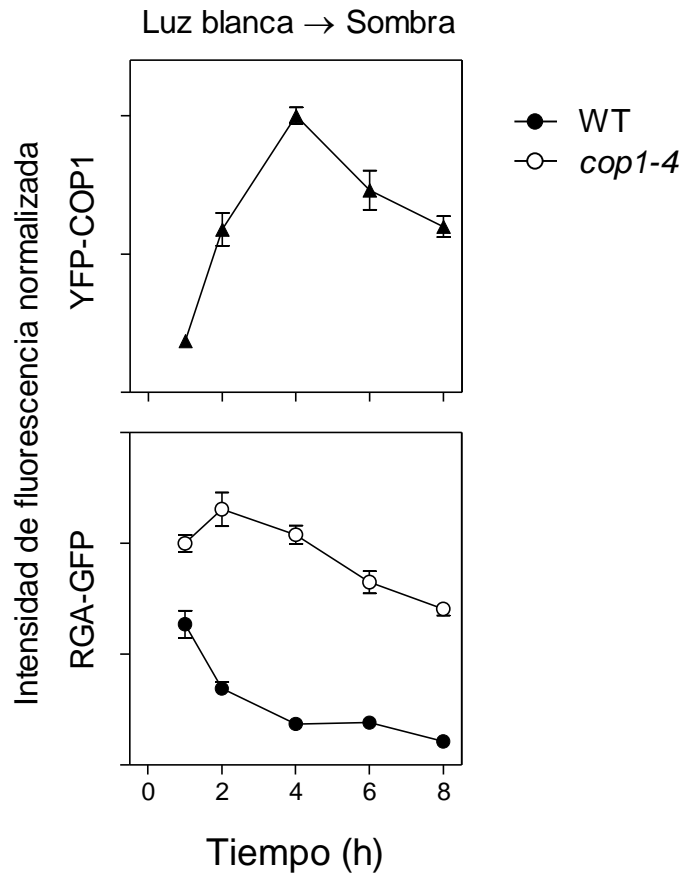


Las proteínas DELLA son reguladores negativos de la señalización de giberelinas, que mediante un mecanismo similar al descrito para HFR1, secuestran a los PIF e inhiben su actividad (de Lucas *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008). Incluso se ha reportado que las DELLAs podrían regular negativamente la estabilidad de los PIF (Zheng *et al.*, 2016).

Resultados no publicados obtenidos en experimentos de doble híbrido, realizados en el laboratorio de Señalización de Hormonas y Plasticidad de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia, sugieren la posible interacción entre COP1 y las proteínas DELLA. Estos resultados nos permitieron incluir a las DELLAs en la búsqueda de potenciales blancos de COP1 en sombra. En este capítulo se puso a prueba la hipótesis según la cuál las DELLAs serían blancos de degradación de COP1 en sombra,.

### **COP1 regula negativamente los niveles de RGA en la desetiología y la respuesta al sombreado**

Estudiamos la posible correlación entre los niveles de YFP-COP1 y RGA-GFP, durante las primeras horas al exponer a sombra simulada plántulas crecidas en luz blanca. Con el propósito de evidenciar la posible regulación de los niveles de RGA por parte de COP1 también se evaluó la intensidad de fluorescencia en la línea *cop1-4/Pro35S:RGA-GFP*.

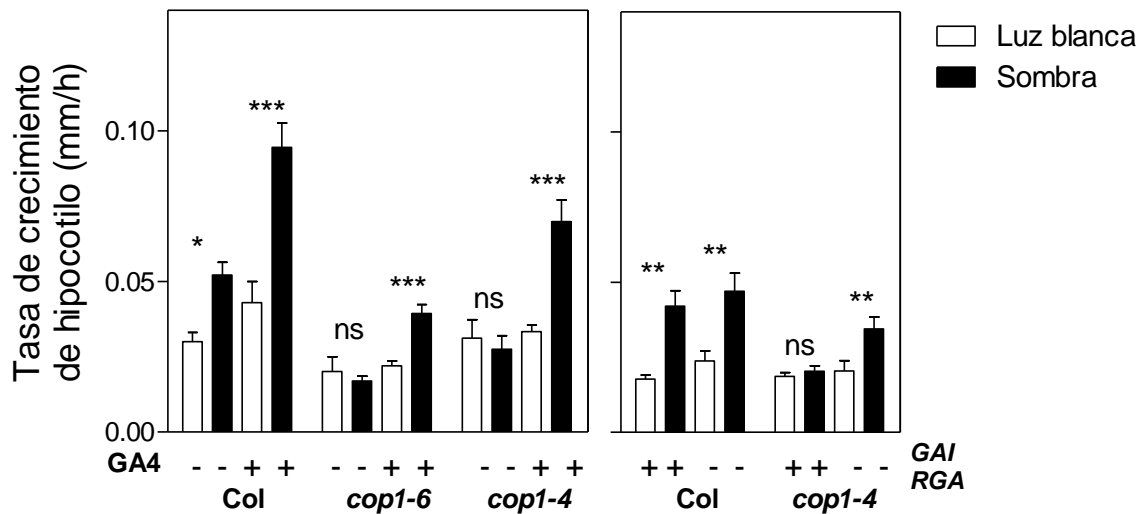


**Figura 34: Los niveles de RGA en el núcleo muestran una correlación negativa con los niveles de COP1.** Intensidad de fluorescencia normalizada de YFP-COP1 (parte superior) y RGA-GFP (parte inferior) en fondo genético *WT* (círculos llenos) o mutante *cop1-4* (círculos vacíos) en plántulas crecidas en luz blanca y transferidas a sombra. Se grafican medias y error estándar de 4-11 réplicas.

Los resultados mostraron una correlación negativa entre los niveles de RGA y COP1. En el fondo mutante *cop1-4* los niveles de RGA-GFP fueron significativamente más elevados que en *WT*, indicando que COP1 es necesario para la regulación de los niveles de RGA en respuesta a las señales de sombra (Fig. 34). Estos resultados indican que COP1 tendría un rol importante en la regulación de los niveles de DELLAs, y sugieren que el fenotipo de respuesta al sombreado del mutante *cop1* podría deberse en parte a la excesiva acumulación de proteínas DELLA.

## La reducción de los niveles de DELLAs revierte parcialmente el fenotipo de *cop1* en la respuesta al sombreado

Para poner a prueba la hipótesis propuesta, se estudió el efecto de la reducción de los niveles de DELLA. Para ello se evaluó la tasa de crecimiento de hipocotilo en el genotipo WT y en mutantes *cop1* reduciendo los niveles de DELLA mediante tratamiento con GA4 o mediante cruzamiento con el doble mutante *gai rga*.



**Figura 35: La reducción de los niveles de DELLAs rescata parcialmente la respuesta al sombreado del mutante *cop1*.** Tasa de crecimiento de hipocotilo de plántulas del fondo genético WT, *cop1-6* y *cop1-4* crecidas en luz blanca y en sombra. Se aplicó GA4 exógena (izquierda) o se utilizaron mutantes múltiples *gai rga* (derecha) para reducir los niveles de DELLAs. Se grafican medias y error estándar de 8 réplicas. Se indican las diferencias estadísticamente significativas (ns, no significativo; \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.0001).

En el genotipo WT se observó un aumento de la tasa de crecimiento tanto en luz blanca como en sombra al disminuir los niveles de DELLA (Fig. 35). Llamativamente, tanto la adición de GA4 como las mutaciones *gai rga* rescataron parcialmente la respuesta a la sombra ausente en los mutantes *cop1* (Fig. 35).

Estos resultados aportan evidencias sobre la posible regulación por parte de COP1, directa o indirecta, de los niveles de DELLAs en el contexto de la respuesta al sombreado. Este sería otro importante punto de convergencia de la vía de señalización de COP1 con los PIFs y las giberelinas.

# Discusión

---

## COP1 en la respuesta al sombreado

Los mutantes *cop1* se encuentran entre los que presentan el fenotipo más severo de respuesta al sombreado (McNellis *et al.*, 1994; Crocco *et al.*, 2010; Rolauffs *et al.*, 2012; Casal, 2013). De hecho, *cop1* es probablemente el mutante simple más severo en términos de pérdida de respuestas al sombreado tanto en sombra simulada como sombra natural. Además, el triple mutante *spa1 spa2 spa4*, deficiente en proteínas que forman un complejo con COP1, carece de respuesta a la sombra (Rolauffs *et al.* 2012 y este reporte). Sin embargo, COP1 no es usualmente considerado dentro de los mecanismos de la respuesta al sombreado. En el capítulo 1 de esta tesis se estudiaron distintas evidencias genéticas que abonan a la hipótesis de que COP1 es un regulador central de la respuesta al sombreado. Además, se caracterizaron los cambios en su localización subcelular inducidos por las señales de sombra, que correlacionarían con su actividad. Como algunos de sus blancos moleculares son nucleares (Lau and Deng, 2012; Rolauffs *et al.*, 2012), la abundancia nuclear de COP1 sería importante para su actividad.

Las plántulas que fueron crecidas bajo sombra simulada (disminución de la luz azul, la luz roja y la relación R:RL) mostraron un mayor número de núcleos con YFP-COP1 y un aumento de su fluorescencia nuclear (Fig. 6). Durante la desetiación (por ejemplo, cuando las plántulas son expuestas a la luz por primera vez), la luz azul, roja y rojo lejano actúan a través de *cry1*, *phyB* y *phyA* e inducen la migración de COP1 del núcleo al citosol (Osterlund and Deng, 1998). El traspaso de luz blanca a sombra simulada causó una rápida acumulación de COP1 en el núcleo (Fig.11), indicando que la migración de COP1 al citosol es un proceso reversible. La reducción selectiva de la luz azul o la luz roja (y por lo tanto de la relación R:R) fue efectiva para aumentar la señal de COP1 nuclear (Fig. 12). Estas observaciones sugieren que la actividad continua de *cry1* y *phyB* sería necesaria para mantener a COP1 fuera del núcleo, pero la activación de *phyA* por la luz rojo lejano no sería suficiente. En condiciones de radiación natural, el nivel de COP1 nuclear aumentó bajo canopeo vegetal comparado con luz solar plena (Fig.6). Esto es importante porque la sombra natural reduce no solo los niveles de luz azul y roja (que reduce la abundancia nuclear de COP1), pero también el UV-B (que es percibida por UVR8, y en consecuencia aumenta la abundancia nuclear de COP1). Los resultados similares obtenidos en sombra natural y simulada sugieren que la caída de UV-B en sombra natural no crea una señal conflictiva fuerte. En plántulas crecidas en luz blanca COP1 se reacumuló rápidamente en respuesta a la sombra (Fig. 11). Esta rápida respuesta resultó sorprendente porque los reportes previos señalaban que la exclusión del núcleo de COP1 en la desetiación era

lenta (von Arnim *et al.*, 1997; Yi Deng, X.W., 2005; Lau and Deng, 2012). Estas cinéticas son consistentes con la rápida respuesta de crecimiento del hipocotilo en sombra (Fig. 7). En los ciclos día-noche también se observó una rápida reducción de los niveles de COP1 durante las primeras horas del fotoperiodo (Fig. 8).

Estudios previos han concluido que la sensibilidad a la sombra se encuentra bajo control circadiano en condiciones de luz continua (Salter *et al.*, 2003), y bajo el control del reloj circadiano y señales derivadas de la luz en ciclos día-noche (Sellaro *et al.*, 2012). Los eventos diarios de sombra natural son más efectivos para promover el crecimiento del hipocotilo cuando estos ocurren por la tarde comparado con la mañana (Sellaro *et al.*, 2012). Se obtuvieron evidencias a favor de un rol significativo de COP1 en el establecimiento del patrón de sensibilidad diario a la sombra. En primer lugar, un patrón normal de sensibilidad a la sombra requiere niveles normales de *COP1*. Los alelos mutantes débiles de *cop1* retuvieron parte de la respuesta a la sombra, particularmente en los fondos mutantes *phyA* y *phyB*. Sin embargo, en estos mutantes el patrón fue invertido, mostrando una mayor sensibilidad al inicio del fotoperiodo que al final (Fig. 13). Contrariamente, las líneas sobreexpresantes de COP1 mostraron una sensibilidad exacerbada a la sombra de la tarde, y una inhibición (en lugar de promoción) del crecimiento al inicio del fotoperiodo (Fig. 13). En síntesis, COP1 promueve la sensibilidad a los eventos a la tarde y la reduce a la mañana. En segundo lugar, la acumulación nuclear de COP1 es también más sensible a los eventos de sombra de la tarde que a los de la mañana (Fig. 14). En tercer lugar, *CSN1/FUS6* es un componente del signalosoma COP9 que interacciona físicamente con COP1 y regula su localización (Wang *et al.*, 2009). En el fotoperiodo los ciclos de expresión de *CSN1/FUS6* muestra un ritmo diario alcanzando un nivel máximo hacia la tarde (Mockler *et al.*, 2007). El mutante *csn1/fus6* complementado con el gen *CSN1/FUS6*, bajo control de un promotor constitutivo, mostró un patrón de sensibilidad a la sombra distorsionado (Fig. 15), a pesar de tener una morfología normal.

### **Mecanismos de inactivación de COP1 inducida por luz**

En el capítulo 2 se reevaluó la cinética de exclusión de COP1 del núcleo durante la desetiología. A partir de los presentes resultados, proponemos que, contra la idea establecida, la translocación de COP1 fuera del núcleo es suficientemente rápida para regular la actividad de COP1 sobre sus blancos moleculares en el núcleo y contribuir a la estabilización temprana de HY5. De hecho, en la transición oscuridad-luz, la fluorescencia

nuclear siguió un decaimiento exponencial con una vida media de solo 2,4 h (Fig. 16), mientras que la estabilización de su blanco HY5 mostró un retraso de 4 h (Fig. 17).

Es interesante mencionar que la proteína COP1 de mamíferos también migra entre núcleo y citoplasma y este proceso es importante para la regulación de sus proteínas blanco (Su *et al.*, 2010). Cabe destacar, que la combinación de la inducción por luz de la expresión génica de HY5 y su estabilización generaron un *switch* entre los bajos niveles de HY5 nuclear observados en oscuridad y los niveles relativamente estables y elevados observados a las 6 h (Fig. 17-19). La ocurrencia de un rápido decaimiento de los niveles nucleares no puede excluirse como uno de los mecanismos de inactivación de COP1. En efecto, comparado con los controles de oscuridad, la interacción entre COP1 y SPA1 se reduce un 15 % y 33 % luego de 2 y 4 h de luz azul ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ) respectivamente (Lian *et al.*, 2011), indicando que esta vía de inactivación de COP1 no sería sustancialmente más rápida o intensa que la que involucra la removilización de COP1 del núcleo. Los tiempos comparables sugieren que la disociación de SPA1 podría contribuir a la removilización de COP1. Alternativamente, si la disociación de SPA1 afectara solo la actividad bioquímica de COP1, la removilización de COP1 contribuiría simultáneamente con la reducción de la actividad intrínseca para generar una activación más abrupta de COP1 sobre sus blancos nucleares más que ambos mecanismos por separado. Los resultados obtenidos en los capítulos 1 y 2 son coherentes con la idea de que la partición núcleocitoplasmática de COP1 muy dinámica.

### **COP1 en la vía de señalización de los PIFs**

En el capítulo 3 se realizó un estudio comparativo de la vía de señalización de los PIF, que ha sido extensamente estudiada en el contexto de la respuesta al sombreado y otras respuestas fisiológicas, y la vía de COP1.

A pesar de su fenotipo severo, la mayoría de los genes que mostraron respuestas significativas a la sombra en el WT, también lo hicieron en el mutante *cop1-4* (Fig. 20). Los genes mencionados incluyen muchos genes involucrados en la biosíntesis y metabolismo de clorofila, carotenoides y flavonoides (Fig. 20). Los patrones de expresión de dichos genes correlacionaron con el contenido de clorofila y antocianinas observados en los distintos genotipos y las condiciones luz/sombra (Fig. 21). Para minimizar efectos no relacionados, se utilizaron alelos débiles de la mutación *cop1*. Por lo tanto, no puede excluirse la posibilidad de que la acumulación de pigmentos y la respuesta de expresión

asociada estén mediadas por la actividad residual de COP1 en los alelos débiles. Sin embargo, queda claro que esas respuestas asociadas a los pigmentos requieren un umbral de actividad de COP1 menor a la respuesta de crecimiento inducido por sombra.

En las condiciones ensayadas, la mutación de *hy5* promovió el crecimiento del hipocotilo en el fondo genético *cop1*, sin rescatar la respuesta al sombreado (Fig. 32), indicando que la ausencia de respuesta al sombreado de *cop1* no es simplemente el resultado de una restricción general del crecimiento. Más aún, la mutación de *cop1* afectó la expresión de varios genes en ausencia de sombra.

Los niveles de auxinas no fueron afectados por *cop1* en ausencia de sombra (Fig. 24). Estas observaciones proveen argumentos en contra de la idea de que COP1 afecta a las respuestas a la sombra en forma indirecta, tan solo proveyendo las condiciones moleculares necesarias para que se produzcan estas respuestas. Por el contrario, se favorece una interpretación alternativa; esta es, que COP1 está intrínsecamente involucrada en los mecanismos de respuesta al sombreado.

Tanto la mutación *cop1* como *pifq* afectaron la expresión de muchos genes en ausencia de sombra, pero el grado de coincidencia fue relativamente pobre (13%, Fig. 22). La sombra incrementó la convergencia de sus efectos tres veces (38%, Fig. 22), en forma consistente con un aumento de la actividad de los PIFs (Lorrain *et al.*, 2008; Leivar, Monte, *et al.*, 2012; Leivar, Tepperman, *et al.*, 2012; Y., Li *et al.*, 2011) y COP1 (mayor acumulación en el núcleo) en respuesta a la sombra. Solo un *cluster* de genes (*Cluster 5*) mostró la pérdida de la respuesta a la sombra en *cop1*; y este *cluster* resultó enriquecido en marcadores de respuesta al sombreado. La mutación *pifq* afectó de forma similar el patrón de expresión de dichos genes (Fig 20). Tanto *cop1* como *pifq* impidieron el aumento de los niveles de auxinas causado por las señales de sombra (Fig. 24), en coincidencia con lo reportado para los mutantes *pif4 pif5* (Hornitschek *et al.*, 2012) y *pif7* (Li *et al.*, 2012). Las mutaciones *pif3*, *pif4* y *pif5* no tuvieron efectos significativos sobre el crecimiento del hipocotilo en el fondo genético mutante *cop1* (Fig. 23), lo cual contrasta con lo observado en plántulas crecidas en oscuridad (Xu *et al.*, 2014). Estas observaciones son consistentes con la ocurrencia de una convergencia en la señalización de COP1 y PIFs en la respuesta al sombreado.

En el capítulo 3 además se demostró que la sombra promueve la degradación de HFR1 de manera dependiente de COP1 (Fig. 28). HFR1 es un blanco directo de COP1 en oscuridad (Duek *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005). Dado que HFR1 regula negativamente las respuestas al sombreado mediante la formación de dímeros con los PIFs que evitan su pegado a sus promotores blanco (Hornitschek *et al.*, 2009), la convergencia entre la señalización de COP1 y PIFs en las respuestas al sombreado podría ocurrir a través



de un aumento de la actividad de PIFs causada por la degradación dependiente de COP1 de HFR1. De acuerdo con esta interpretación, *hfr1* rescató la respuesta de crecimiento y la expresión de los genes blanco de PIF del mutante *cop1* en condiciones de sombra, sin mayor efecto en el fondo genético *COP1* (Fig. 31). En este sentido, el efecto de los PIFs en la respuesta de crecimiento depende de la presencia de COP1 (Fig. 31) y el impacto de la mutación *hfr1* fue mayor en presencia de PIF4 y PIF5 (Fig. 30). En plántulas crecidas en oscuridad, PIF1 promueve la actividad E3 ligasa de COP1 (Xu *et al.*, 2014) y COP1 favorece la acumulación de PIF3 (Bauer *et al.*, 2004). Estos puntos de interacción sinérgica entre la señalización de COP1 y PIF podrían también ser importantes en la respuesta al sombreado. En plántulas crecidas en oscuridad, COP1 marca para degradación a HY5 y HFR1 (entre otras proteínas) mediante interacción física directa (Hardtke *et al.*, 2000; Saijo *et al.*, 2003; Duek *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2005). Cuando las plántulas crecidas en oscuridad son expuestas a la luz, la actividad de COP1 decrece, conduciendo a un aumento de la abundancia de HY5 y HFR1. Sin embargo, los destinos de HY5 y HFR1 divergen cuando las plántulas crecidas en luz blanca son transferidas a la sombra. De hecho, la sombra redujo la abundancia de HFR1 pero aumentó la de HY5 (Fig. 27). Esto indica que no todos los targets nucleares de COP1 en oscuridad son desestabilizados por un aumento de la abundancia nuclear de COP1 en sombra. En conclusión, puede proponerse que COP1 se encuentra intrínsecamente involucrada en los mecanismos de respuesta al sombreado. La abundancia nuclear de COP1 aumenta en sombra como resultado de la reducción de la luz roja percibida por phyB y la luz azul percibida por los criptocromos, y así promueve la degradación de HFR1 (Fig. 28), el cual es un blanco de COP1 de localización nuclear (Duek *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005). Sucesivamente, los niveles reducidos de HFR1 aumentarían la actividad de PIFs, y por lo tanto la intensidad de la respuesta al sombreado (Figs. 31 y 33). Por lo tanto, la respuesta al sombreado opera por dos vías de señalización convergentes que involucran la acción de fitocromos y criptocromos sobre los PIFs (Lorrain *et al.*, 2008; Pedmale *et al.*, 2016) y COP1.

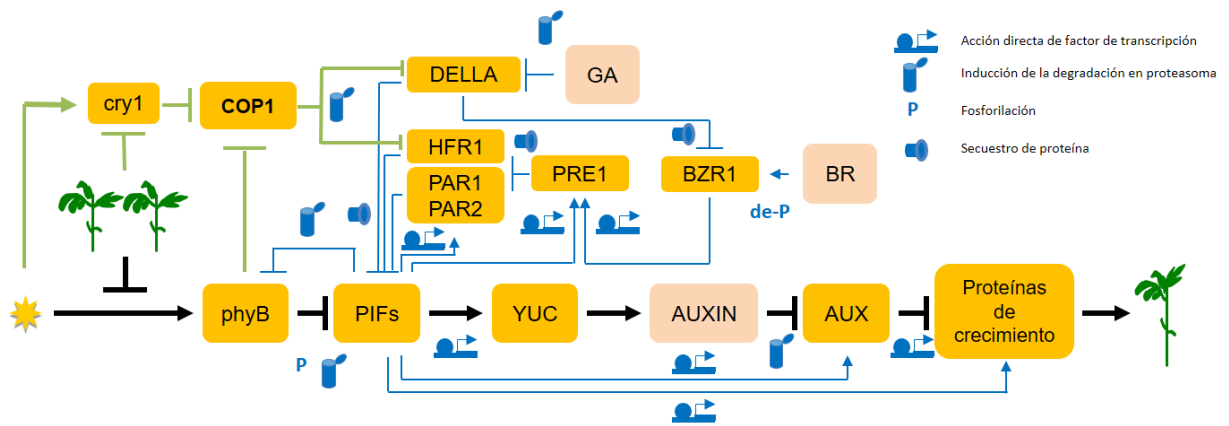
## **COP1 en la regulación de los niveles de DELLAs**

Las proteínas DELLA, cuya degradación es promovida por las giberelinas (Peng *et al.*, 1997; Silverstone *et al.*, 1998; Dill and Sun, 2001), regulan negativamente el crecimiento del hipocotilo en parte impidiendo el pegado de PIF4 y PIF3 al ADN (de Lucas *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008)) o regulando negativamente la estabilidad de los PIF (Zheng *et al.*, 2016).

En el capítulo 4 se demostró que COP1 es necesario para la degradación de RGA en condiciones de sombra (Fig. 34), sugiriendo que RGA y otras proteínas DELLA podrían ser sus blancos de degradación. Más aún, la reducción de los niveles de DELLAs rescató la respuesta al sombreado de los mutantes *cop1*, mientras que tuvo escaso efecto en el fondo genético WT (Fig. 36). COP1 podría ser un importante regulador de los niveles de DELLAs en el contexto de la respuesta al sombreado, reforzando la señalización de PIFs de manera similar a la propuesta para HFR1 en el capítulo 3. Los resultados presentados sugieren que COP1 estaría involucrado en la regulación de las principales hormonas asociadas a la respuesta al sombreado, ya que es necesario para que se produzca una acumulación de auxinas y una reducción de los niveles de RGA en respuesta a las señales de sombra. Además, se han reportado resultados que vinculan a COP1 con la vía de los brasinoesteroides (Luo *et al.*, 2010). Este conjunto de evidencias permite suponer que COP1 podría ser un regulador central de las vías hormonales en la respuesta al sombreado.

## **Conclusión**

Los resultados presentados en esta tesis proveen evidencias favorables a un rol activo de COP1 en la promoción y regulación de la respuesta al sombreado. En base a dichas evidencias, se propone que las señales de sombra promoverían la re-acumulación nuclear tanto de COP1 como de los PIFs, mediante la reducción de la actividad de phyB y cry1 (Fig. 36). Una mayor acumulación de COP1 en el núcleo significaría un aumento de su actividad, conduciendo a la degradación de algunos de sus blancos moleculares, como HFR1 y las proteínas DELLA (Fig. 36). La disminución de los niveles de HFR1 y DELLAs reforzaría la activación de los PIFs, y en consecuencia la promoción de la síntesis de auxinas (a través de los genes *YUCCA*) y el crecimiento (Fig. 36).



**Figura 36: COP1 en la respuesta al sombreado.** Esquema modificado de Casal 2013, incluyendo los puntos en los que COP1 intervendría en la regulación de la respuesta al sombreado. GA: giberelinas; BR: brasinoesteroides; AUXIN: auxinas; YUC: genes *YUCCA*.

## Bibliografía

- Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J. and Ram, S.J.** (2004) Image processing with imageJ. *Biophotonics Int.*, **11**, 36–41. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33744981623%7B&%7DpartnerID=40%7B&%7Dmd5=ab460e41db48fdb139be742971ee6de7>.
- Arnim, A. von** (2007) Subcellular localization of GUS-and GFP-tagged proteins in onion epidermal cells. *Cold Spring Harb. Protoc.*, **2007**, pdb--prot4689.
- Arnim, A.G. von and Deng, X.-W.** (1994) Light inactivation of arabidopsis photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. *Cell*, **79**, 1035–1045.
- Arnim, A.G. von, Osterlund, M.T., Kwok, S.F. and Deng, X.W.** (1997) Genetic and developmental control of nuclear accumulation of COP1, a repressor of photomorphogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **114**, 779–788.
- Arnim, a. . von, Deng, X.-W. and Stacey, M.** (1998) Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene*, **221**, 35–43. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111998004338>.
- Ballaré, C.L., Casal, J.J. and Kendrick, R.E.** (1991) Responses of light-grown wild-type and long-hypocotyl mutant cucumber seedlings to natural and simulated shade light. *Photochem. Photobiol.*, **54**, 819--826.
- Banerjee, R., Schleicher, E., Meier, S., Viana, R.M., Pokorny, R., Ahmad, M., Bittl, R. and Batschauer, A.** (2007) The signaling state of Arabidopsis cryptochrome 2 contains flavin semiquinone. *J. Biol. Chem.*, **282**, 14916–14922. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34447525658%7B&%7DpartnerID=40>.
- Bauer, D., Viczián, A., Kircher, S., et al.** (2004) Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, **16**, 1433–1445.
- Boccalandro, H.E., Rossi, M.C., Saijo, Y., Deng, X.-W. and Casal, J.J.** (2004)

Promotion of photomorphogenesis by COP1. *Plant Mol. Biol.*, **56**, 905–915.

- Bou-Torrent, J., Galstyan, A., Gallemí, M., et al.** (2014) Plant proximity perception dynamically modulates hormone levels and sensitivity in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.*, **65**, 2937–2947.
- Bouly, J.-P., Schleicher, E., Dionisio-Sese, M., et al.** (2007) Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. *J. Biol. Chem.*, **282**, 9383–9391.
- Briggs, W.R. and Christie, J.M.** (2002) Phototropins 1 and 2: Versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.*, **7**, 204–210.
- Cagnola, J.I., Ploschuk, E., Benech-Arnold, T., Finlayson, S.A. and Casal, J.J.** (2012) Stem transcriptome reveals mechanisms to reduce the energetic cost of shade-avoidance responses in tomato. *Plant Physiol.*, **160**, 1110–1119.
- Carabelli, M., Sessa, G., Baima, S., Morelli, G. and Ruberti, I.** (1993) The Arabidopsis Athb-2 and -4 genes are strongly induced by far-red-rich light. *Plant J.*, **4**, 469–479. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0027661899%7B&%7DpartnerID=40%7B&%7Dmd5=ff0df09173892094c5f3260df06b2c08>.
- Casal, J.J.** (2013) Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **64**, 403–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23373700>.
- Casal, J.J., Luccioni, L.G., Oliverio, K.A. and Boccalandro, H.E.** (2003) Light, phytochrome signalling and photomorphogenesis in Arabidopsis Dedicated to Professor Silvia Braslavsky, to mark her great contribution to photochemistry and photobiology particularly in the field of photothermal methods. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2**, 625.
- Catalá, R., Medina, J. and Salinas, J.** (2011) Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 16475–16480. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80053623640%7B&%7DpartnerID=40%7B&%7Dmd5=1d2643f6169f3084ad318afed b9a7cbe>.
- Chen, M. and Chory, J.** (2011) Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends Cell Biol.*, **21**, 664–671. Available at:

<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80755129056%7B%7DpartnerID=40%7B%7Dmd5=f4e6b40ecd0fc821387190e945604c8b>.

**Crocco, C.D., Holm, M., Yanovsky, M.J. and Botto, J.F.** (2010) AtBBX21 and COP1 genetically interact in the regulation of shade avoidance. *Plant J.*, **64**, 551–562. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-78449236450%7B%7DpartnerID=40%7B%7Dmd5=9739a914b9705e139ef6b353beb9caa6>.

**Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K. and Scheible, W.-R.** (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **139**, 5–17.

**Deng, X.-W., Matsui, M., Wei, N., Wagner, D., Chu, A.M., Feldmann, K.A. and Quail, P.H.** (1992) COP1, an *Arabidopsis* regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G $\beta$  homologous domain. *Cell*, **71**, 791–801.

**Devlin, P.F., Yanovsky, M.J. and Kay, S. a** (2003) A genomic analysis of the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **133**, 1617–29. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=300718&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

**Dill, A. and Sun, T.** (2001) Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **159**, 777–785.

**Djakovic-Petrovic, T., Wit, M.D., Voesenek, L.A.C.J. and Pierik, R.** (2007) DELLA protein function in growth responses to canopy signals. *Plant J.*, **51**, 117–126. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34250902902%7B%7DpartnerID=40%7B%7Dmd5=d3955948a8198551ef152eca69bb6002>.

**Duek, P.D., Elmer, M. V, Oosten, V.R. van and Fankhauser, C.** (2004) The degradation of HFR1, a putative bHLH class transcription factor involved in light signaling, is regulated by phosphorylation and requires COP1. *Curr. Biol.*, **14**, 2296–301. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15620659>.

**Dyachok, J., Zhu, L., Liao, F., He, J., Huq, E. and Blancaflor, E.B.** (2011) SCAR Mediates Light-Induced Root Elongation in *Arabidopsis* through Photoreceptors and Proteasomes. *Plant Cell*, **23**, 3610–3626.

**Elich, T.D. and Chory, J.** (1997) Phytochrome: if it looks and smells like a histidine

kinase, is it a histidine kinase? *Cell*, **91**, 713–716.

**Fankhauser, C. and Ulm, R.** (2011) Light-regulated interactions with spa proteins underlie cryptochrome-mediated gene expression. *Genes Dev.*, **25**, 1004–1009. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79956305206%7B%7DpartnerID=40%7B%7Dmd5=989b18bad7f3259c827db67436bf5084>.

**Favory, J.-J., Stec, A., Gruber, H., et al.** (2009) Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in Arabidopsis. *EMBO J.*, **28**, 591–601.

**Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., et al.** (2008) Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. *Nature*, **451**, 475–479. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-38549142539%7B%7DpartnerID=40%7B%7Dmd5=58de054d249ef4f494bb04607a068c6e>.

**Franklin, K. a** (2008) Shade avoidance. *New Phytol.*, **179**, 930–44.

**Friml, J., Wisniewska, J., Benková, E., Mendgen, K. and Palme, K.** (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature*, **415**, 806–809. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037075024%7B%7DpartnerID=40%7B%7Dmd5=91e44d84220a146b0e08e9d762041335>.

**Galstyan, A., Cifuentes-Esquivel, N., Bou-Torrent, J. and Martinez-Garcia, J.F.** (2011) The shade avoidance syndrome in Arabidopsis: A fundamental role for atypical basic helix-loop-helix proteins as transcriptional cofactors. *Plant J.*, **66**, 258–267. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79955005679%7B%7DpartnerID=40%7B%7Dmd5=485faf4aed4f109141fb8d48f62ad158>.

**Guo, H., Duong, H., Ma, N. and Lin, C.** (1999) The Arabidopsis blue-light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue-light dependent post-transcriptional mechanism. *Plant J.*, **19**, 279–289.

**Hardtke, C.S., Gohda, K., Osterlund, M.T., Oyama, T., Okada, K. and Deng, X.W.** (2000) HY5 stability and activity in Arabidopsis is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. , **19**, 4997–5006.

**Hardtke Deng, X.W., C.S.** (2000) The cell biology of COP/DET/FUS proteins. Regulating

proteolysis in photomorphogenesis and beyond? *Plant Physiol.*, **124**, 1548–1557.

**Heijde, M. and Ulm, R.** (2012) UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends Plant Sci.*, **17**, 230–237. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22326562>.

**Hennig, L., Poppe, C., Sweere, U., Martin, A. and Schäfer, E.** (2001) Negative interference of endogenous phytochrome B with phytochrome A function in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **125**, 1036–1044.

**Hoecker, U., Xu, Y. and Quail, P.H.** (1998) SPA1: a new genetic locus involved in phytochrome A-specific signal transduction. *Plant Cell*, **10**, 19–33.

**Holmes, M.G. and Smith, H.** (1977) The function of phytochrome in the natural environment. I. Characterization of daylight for studies in photomorphogenesis and photoperiodism. *Photochem. Photobiol.*, **25**, 533–538.

**Hornitschek, P., Kohnen, M. V., Lorrain, S., et al.** (2012) Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. *Plant J.*, **71**, 699–711.

**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**, 3893–902. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2797054&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 28, 2014].

**Jaillais, Y. and Vert, G.** (2012) Brassinosteroids, gibberellins and light-mediated signalling are the three-way controls of plant sprouting. *Nat Cell Biol*, **14**, 788–790. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2551>.

**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**, 2370–83. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2929111&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 12, 2014].

**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.

**Jeong, J.H., Song, H.R., Ko, J.H., Jeong, Y.M., Kwon, Y.E., Seol, J.H., Amasino, R.M.,**



- Noh, B. and Noh, Y.S.** (2009) Repression of FLOWERING LOCUS T chromatin by functionally redundant histone H3 lysine 4 demethylases in Arabidopsis. *PLoS One*, **4**. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-71049163028%7B&%7DpartnerID=40%7B&%7Dmd5=744f400d05e917b7d5067b5ac5ba36e2>.
- Jiao Yang, H., Ma, L., Sun, N., Yu, H., Liu, T., Gao, Y., Gu, H., Chen, Z., Wada, M., Gerstein, M., Qu, L.-J., Deng, X. W., Y.** (2003) A Genome-Wide analysis of blue-light regulation of Arabidopsis transcription factor gene expression during seedling development. *Plant Physiol.*, **133**, (in press).
- Jung, J.-H., Domijan, M., Klose, C., et al.** (2016) Phytochromes function as thermosensors in Arabidopsis. *Science (80-. )*, **354**, 886–889.
- Kami, C., Allenbach, L., Zourelidou, M., et al.** (2014) Reduced phototropism in pks mutants may be due to altered auxin-regulated gene expression or reduced lateral auxin transport. *Plant J.*, **77**, 393–403. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24286493> [Accessed October 27, 2014].
- Kang, C., Lian, H., Wang, F., Huang, J. and Yang, H.** (2009) Cryptochromes , Phytochromes , and COP1 Regulate Light-Controlled Stomatal Development in Arabidopsis. , **21**, 2624–2641.
- Kepinski, S. and Leyser, O.** (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**, 446–451. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-19544386804%7B&%7DpartnerID=40%7B&%7Dmd5=b8a5ad579ec4c530828465adc0b04011>.
- Keuskamp, D.H., Pollmann, S., Voesenek, L.A.C.J., Peeters, A.J.M. and 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. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3012496&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 9, 2014].
- Keuskamp, D.H., Sasidharan, R., Vos, I., Peeters, A.J.M., Voesenek, L.A.C.J. and Pierik, R.** (2011) Blue-light-mediated shade avoidance requires combined auxin and brassinosteroid action in Arabidopsis seedlings. *Plant J.*, **67**, 208–217. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79960232161%7B&%7DpartnerID=40%7B&%7Dmd5=530563cf7f69e0eccf87bf00e1978517>.

- Kim, Y.M., Woo, J.C., Song, P.S. and Soh, M.S.** (2002) HFR1, a phytochrome A-signalling component, acts in a separate pathway from HY5, downstream of COP1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **30**, 711–719.
- Lau, O.S. and Deng, X.W.** (2012) The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends Plant Sci.*, **17**, 584–593.
- Laubinger, S., Fittinghoff, K. and Hoecker, U., S.** (2004) The SPA quartet: A family of WD-repeat proteins with a central role in suppression of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 2293–2306.
- Lee, J., He, K., Stolc, V., et al.** (2007) Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *Plant Cell*, **19**, 731–49. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1867377&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 27, 2014].
- Legris, M., Klose, C., Costigliolo, C., et al.** (2016) Phytochrome B integrates light and temperature signals in *Arabidopsis*. *Science (80-. )*, **354**, 897–900.
- Leivar, P., Monte, E., Cohn, M.M. and Quail, P.H.** (2012) Phytochrome signaling in green *Arabidopsis* seedlings: Impact assessment of a mutually negative phyB–PIF feedback loop. *Mol. Plant*, **5**, 208–223. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3355348%7B%7Dtool=pmcentrez%7B%7Drendertype=abstract>.
- Leivar, P., Monte, E., Oka, Y., Liu, T., Carle, C., Castillon, A., Quail, P.H. and Huq, E.** (2008) Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Curr. Biol.*, **18**, 1815–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2651225&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 6, 2014].
- Leivar, P. and Quail, P.H.** (2011) PIFs: Pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends Plant Sci.*, **16**, 19–28.
- Leivar, P., Tepperman, J.M., Cohn, M.M., Monte, E., Al-Sady, B., Erickson, E. and Quail, P.H.** (2012) Dynamic antagonism between phytochromes and PIF family basic helix-loop-helix factors induces selective reciprocal responses to light and shade in a rapidly responsive transcriptional network in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **24**, 1398–1419. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3398554%7B%7Dtool=p>

mcentrez%7B&%7Drendertype=abstract.

**Li, C. and Hung Wong, W.** (2001) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol.*, **2**, RESEARCH0032.

**Li, J., Li, G., Gao, S., et al.** (2010) Arabidopsis transcription factor ELONGATED HYPOCOTYL5 plays a role in the feedback regulation of Phytochrome a signaling. *Plant Cell*, **22**, 3634–3649. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3015127%7B&%7Dtool=p mcentrez%7B&%7Drendertype=abstract>.

**Li, J., Lib, G., Wang, H., Deng, X.-W., Li, G. and Wang Deng, X.** (2011) Phytochrome signaling mechanisms. *Arab. B.*, **9**, e0148. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3268501%7B&%7Dtool=p mcentrez%7B&%7Drendertype=abstract>.

**Li, L., Ljung, K., Breton, G., et al.** (2012) Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture. *Genes Dev.*, **26**, 785–790.

**Li, Y., Swaminathan, K. and Hudson, M.E.** (2011) Rapid, organ-specific transcriptional responses to light regulate photomorphogenic development in dicot seedlings. *Plant Physiol.*, **156**, 2124–2140. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3149948%7B&%7Dtool=p mcentrez%7B&%7Drendertype=abstract>.

**Lian, H.-L.L., He, S.-B.B., Zhang, Y.-C.C., Zhu, D.-M.M., Zhang, J.-Y.Y., Jia, K.-P.P., Sun, S.-X.X., Li, L. and Yang, H.-Q.Q.** (2011) Blue-light-dependent interaction of cryptochrome 1 with SPA1 defines a dynamic signaling mechanism. *Genes Dev.*, **25**, 1023–1028. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3093117%7B&%7Dtool=p mcentrez%7B&%7Drendertype=abstract>.

**Liu, B., Liu, H., Zhong, D. and Lin, C.** (2010) Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **13**, 578–586. Available at:  
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-78049313173%7B&%7DpartnerID=40%7B&%7Dmd5=a3475b33e65415f0e6e2cccd5a71f7ad>.

**Liu, B., Zuo, Z., Liu, H., Liu, X. and Lin, C.** (2011) Arabidopsis cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light. *Genes Dev.*, **25**,

- Liu, H., Liu, B., Zhao, C., Pepper, M. and Lin, C.** (2011) The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends Plant Sci.*, **16**, 684–91.
- Liu, L.-J., Zhang, Y.-C., Li, Q.-H., Sang, Y., Mao, J., Lian, H.-L., Wang, L. and Yang, H.-Q.** (2008) COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in Arabidopsis. *Plant Cell*, **20**, 292–306.
- Lorrain, S., Allen, T., Duek, P.D., Whitelam, G.C. and Fankhauser, C.** (2008) Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *Plant J.*, **53**, 312–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18047474> [Accessed October 9, 2014].
- Lucas, M. de, Davière, J.-M., Rodríguez-Falcón, M., et al.** (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature*, **451**, 480–484.
- Luo, Q., Lian, H.-L., He, S.-B., Li, L., Jia, K.-P. and Yang, H.-Q.** (2014) COP1 and phyB Physically Interact with PIL1 to Regulate Its Stability and Photomorphogenic Development in Arabidopsis. *Plant Cell*, 1–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24951480> [Accessed July 10, 2014].
- Luo, X.M., Lin, W.H., Zhu, S., et al.** (2010) Integration of Light- and Brassinosteroid-Signaling Pathways by a GATA Transcription Factor in Arabidopsis. *Dev. Cell*, **19**, 872–883. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.023>.
- Maier, A., Schrader, A., Kokkelink, L., et al.** (2013) Light and the E3 ubiquitin ligase COP1/SPA control the protein stability of the MYB transcription factors PAP1 and PAP2 involved in anthocyanin accumulation in Arabidopsis. *Plant J.*, **74**, 638–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23425305> [Accessed September 27, 2014].
- Mao, J., Zhang, Y.-C., Sang, Y., Li, Q.-H. and Yang, H.-Q.** (2005) From The Cover: A role for Arabidopsis cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 12270–5.
- Martínez-García, J.F.J.F., Galstyan, A., Salla-Martret, M., Cifuentes-Esquivel, N., Gallemí, M. and Bou-Torrent, J.** (2010) Regulatory components of shade avoidance syndrome. *Adv. Bot. Res.*, **53**, 65–116. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065229610530039>.
- McNellis, T.W., Arnim, A.G. von, Araki, T., Komeda, Y., Misera, S. and Deng, X.-W.**

(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.

**Michael, T.P., Breton, G., Hazen, S.P., Priest, H., Mockler, T.C., Kay, S.A. and Chory, J.** (2008) A morning-specific phytohormone gene expression program underlying rhythmic plant growth. *PLoS Biol.*, **6**, 1887–1898. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-54749087162%7B%7DpartnerID=40%7B%7Dmd5=b6494a3efb799cd999e1833533698a1c>.

**Mockler, T.C., Michael, T.P., Priest, H.D., Shen, R., Sullivan, C.M., Givan, S.A., McEntee, C., Kay, S.A. and Chory, J.** (2007) The diurnal project: Diurnal and circadian expression profiling, model-based pattern matching, and promoter analysis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **72**, 353–363. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-40149093631%7B%7DpartnerID=40%7B%7Dmd5=d45eb78045d1e0eba388527d94aa8023>.

**Monte, E., Tepperman, J.M., Al-Sady, B., et al.** (2004) The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proceedings Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 16091–16098. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-9244261581%7B%7DpartnerID=40%7B%7Dmd5=24d589138052d055404ed05607c469a8>.

**Nakagawa, M. and Komeda, Y.** (2004) Flowering of *Arabidopsis* cop1 mutants in darkness. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 398–406. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111714>.

**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**, 358–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17589502> [Accessed July 14, 2014].

**Oravec, A., Baumann, A., Máté, Z., et al.** (2006) CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 is required for the UV-B response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **18**, 1975–1990.

**Osterlund, M.T. and Deng, X.W.** (1998) Multiple photoreceptors mediate the light-induced reduction of GUS-COP1 from *Arabidopsis* hypocotyl nuclei. *Plant J.*, **16**, 201–208.

- Osterlund, M.T., Hardtke, N.W. and Deng, X.W.** (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature*, **405**, 462–466.
- Oyama, T., Shimura, Y. and Okada, K.** (1997) The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes & Dev.*, **11**, 2983–2995.
- Pedmale, U. V., Huang, S.C., Zander, M., et al.** (2016) Cryptochromes interact directly with PIFs to control plant growth in limiting blue light. *Cell*, **164**, 233–245. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415016426>.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P. and Harberd, N.P.** (1997) The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.*, **11**, 3194–3205.
- Pokhilko, A., Ramos, J.A., Holtan, H., Maszle, D.R., Khanna, R. and Millar, A.J.** (2011) Ubiquitin ligase switch in plant photomorphogenesis: A hypothesis. *J. Theor. Biol.*, **270**, 31–41. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-78549248179%7B%7DpartnerID=40%7B%7Dmd5=dd0535b759d02cff1e8eb5b291d991a0>.
- Reed, J.W., Foster, K.R., Morgan, P.W. and Chory, J.** (1996) Phytochrome B affects responsiveness to gibberellins in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **112**, 337–342.
- Reed, J.W., Nagatani, A., Elich, T.D., Fagan, M. and Chory, J.** (1994) Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in Arabidopsis development. *Plant Physiol.*, **104**, 1139–1149.
- Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., Furuya, M. and Chory, J.** (1993) Mutations in the gene for the red / far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development. *Plant Cell*, **5**, 147–157.
- Rizzini, L., Favory, J.J., Cloix, C., et al.** (2011) Perception of UV-B by the arabidopsis UVR8 protein. *Science (80-. )*, **332**, 103–106. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79953272725%7B%7DpartnerID=40%7B%7Dmd5=55b7f2d715d0827ca81e57f009f70d1c>.
- Roig-Villanova, I., Bou, J., Sorin, C., Devlin, P.F. and Martinez-García, 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. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0->

33745436506%7B&%7DpartnerID=40%7B&%7Dmd5=0183f9a561c9f3d131b0e0aa45eea14a.

- Rolauffs, S., Fackendahl, P., Sahn, J., Fiene, G. and Hoecker, U.** (2012) Arabidopsis COP1 and SPA genes are essential for plant elongation but not for acceleration of flowering time in response to a low red light to far-red light ratio. *Plant Physiol.*, **160**, 2015–27. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3510128&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 6, 2014].
- Saijo, Y., Sullivan, J.A., Wang, H., Yang, J., Shen, Y., Rubio, V., Ma, L., Hoecker, U. and Deng, X.W.** (2003) The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes Dev.*, **17**, 2642–2647.
- Salter, M.G., Franklin, K.A. and Whitelam, G.C.** (2003) Gating of the rapid shade-avoidance response by the circadian clock in plants. *Nature*, **426**, 680–683.
- Sellaro, R., Crepy, M., Trupkin, S.A., Karayekov, E., Buchovsky, A.S., Rossi, C. and Casal, J.J.** (2010) Cryptochrome as a sensor of the blue/green ratio of natural radiation in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **154**, 401–409. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77956706416%7B&%7DpartnerID=40%7B&%7Dmd5=ce218eb51fd1da8ff1e069d4b55f083d>.
- Sellaro, R., Pacín, M. and Casal, J.J.** (2012) Diurnal dependence of growth responses to shade in Arabidopsis: role of hormone, clock, and light signaling. *Mol. Plant*, **5**, 619–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22311777> [Accessed July 23, 2014].
- Sellaro, R., Yanovsky, M.J. and Casal, J.J.** (2011) Repression of shade-avoidance reactions by sunfleck induction of HY5 expression in Arabidopsis. *Plant J.*, **68**, 919–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21848684> [Accessed August 4, 2014].
- 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**, 617–22.
- Seo, H.S., Yang, J.-Y., Ishikawa, M., Bolle, C., Ballesteros, M.L. and Chua, N.-H.** (2003) LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature*, **423**, 995–999.

- Shalitin, D., Yang, H., Mockler, T.C., Maymon, M., Guo, H., Whitelam, G.C. and Lin, C.** (2002) Regulation of Arabidopsis cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature*, **417**, 763–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12066190>.
- Shin, J., Park, E. and Choi, G.** (2007) PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in Arabidopsis. *Plant J.*, **49**, 981–994.
- Sieberer, T., Seifert, G.J., Hauser, M.T., Grisafi, P., Fink, G.R. and Luschnig, C.** (2000) Post-transcriptional control of the Arabidopsis auxin efflux carrier EIR1 requires AXR1. *Curr. Biol.*, **10**, 1595–1598. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034649542%7B&%7DpartnerID=40%7B&%7Dmd5=5fa1518176a975c6427646e7daf32227>.
- Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N. and Sun, T.** (1998) The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell*, **10**, 155–169.
- Smith, H., Casal, J.J. and Jackson, G.M.** (1990) Reflection signals and the perception by phytochrome of the proximity of neighbouring vegetation. *Plant, Cell Environ.*, **13**, 73–78.
- Sorin, C., Salla-Martret, M., Bou-Torrent, J., Roig-Villanova, I. and Martínez-García, J.F.** (2009) ATHB4, a regulator of shade avoidance, modulates hormone response in Arabidopsis seedlings. *Plant J.*, **59**, 266–277. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-67649752345%7B&%7DpartnerID=40%7B&%7Dmd5=540f1e551d9309f784925de213f2cfb6>.
- Stacey, M.G., Kopp, O.R., Kim, T.H. and Arnim, a G. von** (2000) Modular domain structure of Arabidopsis COP1. Reconstitution of activity by fragment complementation and mutational analysis of a nuclear localization signal in planta. *Plant Physiol.*, **124**, 979–990. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=59198&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Staneloni, R.J., Rodriguez-Batiller, M.J., Legisa, D., Scarpin, M.R., Agalou, A., Cerdán, P.D., Meijer, A.H., Ouwkerk, P.B.F. and Casal, J.J.** (2009) Bell-like



homeodomain selectively regulates the high-irradiance response of phytochrome A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 13624–13629. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-69449105576%7B%7DpartnerID=40%7B%7Dmd5=8649b5e2690a78d4c61c88ef10eae336>.

**Stepanova, A.N., Yun, J., Robles, L.M., Novak, O., He, W., Guo, H., Ljung, K. and Alonso, J.M.** (2011) The Arabidopsis YUCCA1 Flavin Monooxygenase Functions in the Indole-3-Pyruvic Acid Branch of Auxin Biosynthesis. *Plant Cell*, **23**, 3961–3973.

**Storey, J.D. and Tibshirani, R.** (2003) Statistical significance for genomewide studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 9440–9445.

**Su, C.H., Zhao, R., Velazquez-Torres, G., Chen, J., Gully, C., Yeung, S.C.J. and Lee, M.** (2010) Nuclear export regulation of COP1 by 14-3-3 $\sigma$  in response to DNA damage. *Mol. Cancer*, **9**, 243. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77956534974%7B%7DpartnerID=40%7B%7Dmd5=db2ac0b37f76279ba23ef00dff a3ced5>.

**Subramanian, C., Kim, B.-H., Lyssenko, N.N., Xu, X., Johnson, C.H. and Arnim, A.G. von** (2004) The Arabidopsis repressor of light signaling, COP1, is regulated by nuclear exclusion: mutational analysis by bioluminescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 6798–6802. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=404125%7B%7Dtool=pmcentrez%7B%7Drendertype=abstract>.

**Sun, T.** (2008) Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in Arabidopsis. *Arab. B.*, 0:e0103. doi:10.1199/tab.0103.

**Tao, Y., Ferrer, J.L., Ljung, K., et al.** (2008) Rapid Synthesis of Auxin via a New Tryptophan-Dependent Pathway Is Required for Shade Avoidance in Plants. *Cell*, **133**, 164–176.

**Tepperman, J.M., Hudson, M.E., Khanna, R., Zhu, T., Chang, S.H., Wang, X. and Quail, P.H.** (2004) Expression profiling of phyB mutant demonstrates substantial contribution of other phytochromes to red light regulated gene expression during seedling de-etiolation. *Plant J.*, **38**, 725–739.

**Tepperman, J.M., Zhu, T., Chang, H.-S., Wang, X. and Quail, P.H.** (2001) Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proceedings*

*Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9437–9442.

- Toledo-Ortiz, G., Johansson, H., Lee, K.P., Bou-Torrent, J., Stewart, K., Steel, G., Rodríguez-Concepción, M. and Halliday, K.J.** (2014) The HY5-PIF regulatory module coordinates light and temperature control of photosynthetic gene transcription. *PLoS Genet.*, **10**, e1004416. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4055456%7B%7Dtool=pmcentrez%7B%7Drendertype=abstract>.
- Ulm, R., Baumann, A., Oravecz, A., Maté, Z., Adám, E., Oakeley, E.J., Schäfer, E. and Nagy, F.** (2004) Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of Arabidopsis. *Proceedings Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 1397–1402.
- Vert, G., Walcher, C.L., Chory, J. and Nemhauser, J.L.** (2008) Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 9829–9834. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-47749136250%7B%7DpartnerID=40%7B%7Dmd5=d7c05086f3c980dc5a55000c61d2045a>.
- Vierstra, R.D. and Zhang, J.** (2011) Phytochrome signaling: Solving the Gordian knot with microbial relatives. *Trends Plant Sci.*, **16**, 417–426.
- Wang, X., Li, W., Piqueras, R., Cao, K., Deng, X.W. and Wei, N.** (2009) Regulation of COP1 nuclear localization by the COP9 signalosome via direct interaction with CSN1. *Plant J.*, **58**, 655–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19175768> [Accessed September 25, 2014].
- Wang, Z.Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S. and Chory, J.** (2001) BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature*, **410**, 380–383. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035869056%7B%7DpartnerID=40%7B%7Dmd5=a94641249a915fdac0455de379f897ba>.
- Won, C., Shen, X., Mashiguchi, K., et al.** (2011) Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **108**, 18518–18523.
- Xu, X., Paik, I., Zhu, L., Bu, Q., Huang, X., Deng, X.W. and Huq, E.** (2014) PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR1 Enhances the E3 Ligase Activity of

CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1 to Synergistically Repress  
Photomorphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell*, **26**, 1992–2006. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24858936> [Accessed July 17, 2014].

**Yang, H.-Q., Tang, R.-H. and Cashmore, A.R.** (2001) The Signaling Mechanism of Arabidopsis CRY1 Involves Direct Interaction with COP1. *Plant Cell*, **13**, 2573–2587.

**Yang, J., Lin, R., Sullivan, J., Hoecker, U., Liu, B., Xu, L., Deng, X.W. and Wang, H.** (2005) Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, **17**, 804–21. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1069700&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

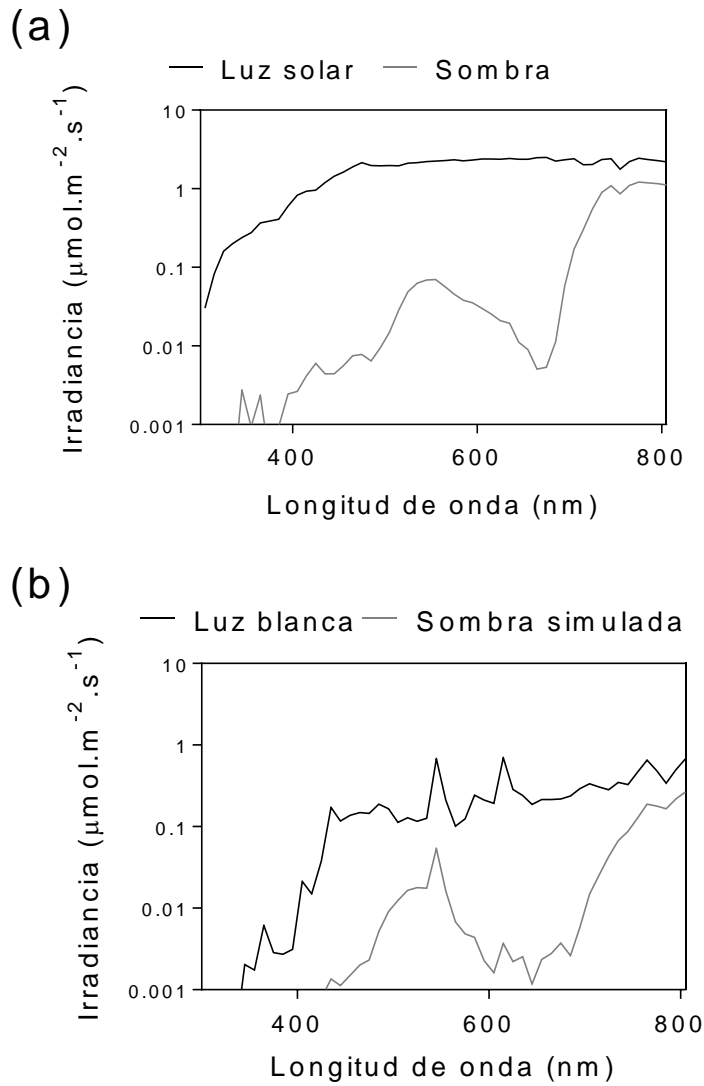
**Yi Deng, X.W., C.** (2005) COP1 - From plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis . *Trends Cell Biol.*, **15**, 618–625.

**Yu, J.W., Rubio, V., Lee, N.Y., et al.** (2008) COP1 and ELF3 control circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability. *Mol. Cell*, **32**, 617–630. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-56849102536%7B&%7DpartnerID=40%7B&%7Dmd5=0769ce85c17c4c6ee105d9f5a073b684>.

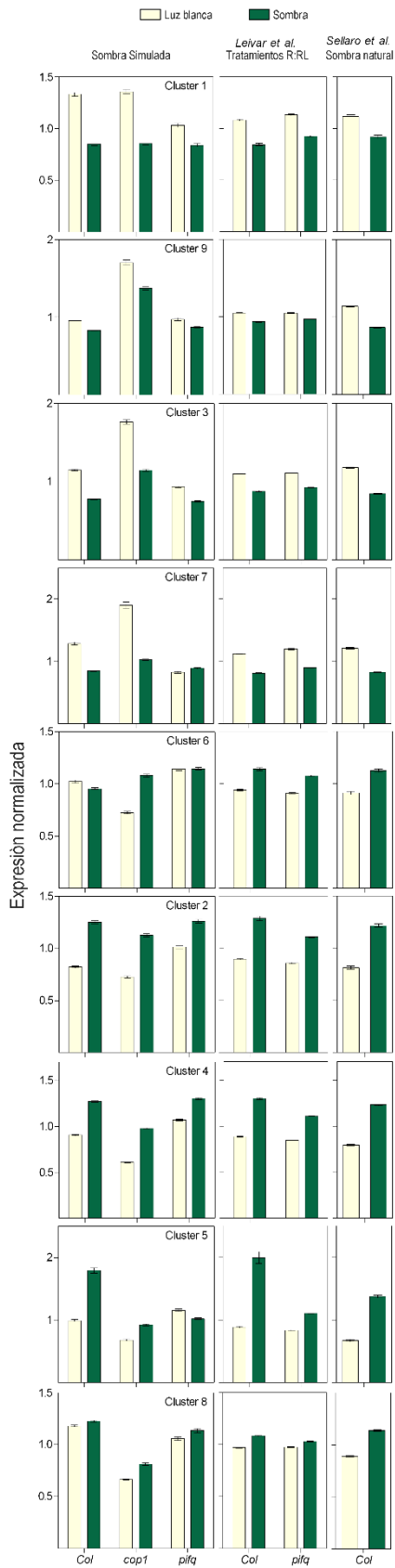
**Yu, X., Liu, H., Klejnot, J. and Lin, C.** (2010) The cryptochrome blue light receptors. *Arab. B.*, **8**, e0135.

**Zheng, Y., Gao, Z. and Zhu, Z.** (2016) DELLA–PIF Modules: Old Dogs Learn New Tricks. *Trends Plant Sci.*, **21**, 813–815. Available at:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138516301169>.

**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 PHOTOMORPHOGENIC1 and SUPPRESSOR OF PHYA proteins in light control of plant development. *Plant Cell*, **20**, 2307–23. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2570740&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 6, 2014].



**Figura S1:** Irradiancia (escala logarítmica) en función de la longitud de onda en condiciones de a) luz solar plena y sombra de canopeo vegetal, b) luz blanca y sombra simulada.



**Figura S2:** Expresión normalizada de los genes de los *clusters* 1 a 9 comparada con estudios previos realizados por Sellaro et al., 2011 y Leivar et al., 2012.