



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Control de las vías de señalización de brasinoesteroides por las condiciones de luz y temperatura percibidas por las plantas.

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

Lic. Maria Cecilia Costigliolo Rojas

Director de tesis: Dr. Jorge J. Casal

Director Asistente: Dr. Santiago Mora-García

Consejero de Estudios: Dr. Pablo Cerdán

Lugares de trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires (IIBBA-CONICET), Fundación Instituto Leloir.

Buenos Aires, 2018

Fecha de defensa: 28 de Febrero 2019

Control de las vías de señalización de brasinoesteroides por las condiciones de luz y temperatura percibidas por las plantas.

RESUMEN

El crecimiento de los diferentes órganos de la planta está controlado por señales hormonales endógenas, que pueden verse afectadas por señales ambientales. Entre estas señales, las condiciones de luz y temperatura juegan un papel clave. La sombra causada por plantas vecinas y la temperatura incrementa los niveles de auxina y por lo tanto promueve el crecimiento del tallo.

Los brasinoesteroides (BR) son potentes promotores del crecimiento, y los mutantes insensibles o deficientes en BR apenas responden a las señales de sombra. BZR1 y BES1 son reguladores positivos de la vía de señalización de BR que pueden interactuar con factores de transcripción que median la evitación de la sombra, como los PIFs (*PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS*), que regulan sinérgicamente la expresión de los genes promotores del crecimiento.

En esta tesis investigamos si las señales de sombra y temperatura afectan la señalización por brasinoesteroides a nivel de BES1. En plántulas de *Arabidopsis thaliana*, la promoción del crecimiento del tallo es inducida por condiciones de sombra y temperaturas cálidas en mutantes de ganancia de función *bes1-1D*, en comparación con el genotipo salvaje. Medimos los niveles de fluorescencia nuclear mediante microscopía confocal, en plantas transgénicas *pBES1:BES1:GFP*. Las plantas expuestas a altas temperaturas o a sombra mostraron un aumento de fluorescencia nuclear en hipocótilos y una disminución en los cotiledones. Al introducir estas plantas transgénicas en fondos mutantes como *cop1* y *pif4*, observamos cambios diferenciales en la abundancia nuclear de BES1, por lo tanto COP1 y PIF4 interaccionan de manera diferencial en hipocótilo y cotiledón para regular a BES1 en tratamiento de sombra o temperaturas cálidas. Además medimos la expresión de *BES1*, mediante qRT-PCR, de manera independiente en ambos órganos y observamos una reducción en los niveles de expresión en respuesta a los tratamientos, particularmente en cotiledones. Los resultados expuestos en este trabajo muestran que un balance diferencial del control transcripcional y postranscripcional de BES1 por temperatura y sombra conduce a respuestas opuestas en el hipocótilo y los cotiledones, que a su vez se correlacionan con la respuesta de crecimiento.

Palabras claves: *Arabidopsis thaliana*, sombra, temperatura, brasinoesteroides, BES1.

Control of signaling pathways of brassinosteroids by the light and temperature conditions perceived by the plants.

ABSTRACT

The growth of the different organs of the plant is controlled by endogenous hormonal signals, which can be affected by environmental cues. Among these signals, light and temperature conditions play a key role. Both, shade caused by neighboring plants and warm temperatures increment auxin levels and thereby promote stem growth.

Brassinosteroids (BR) are potent promoters of growth, and BR-deficient or insensitive mutants barely respond to shade signals. BZR1 and BES1 are positive regulators of the BR signaling pathway that can interact with transcription factors that mediate shade avoidance like PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS, synergistically regulating the expression of growth-promoting genes.

In this thesis we investigate whether shade and temperature cues affect BR signaling at the BES1 level. In *Arabidopsis thaliana* seedlings, the promotion of hypocotyl growth induced by shade or warm temperature conditions is enhanced in the *bes1-1D* gain-of-function mutant, compared to the wild type. We measured nuclear fluorescence levels by confocal microscopy, using transgenic plants bearing *pBES1: BES1: GFP*. The plants exposed to high temperatures or shade showed increased nuclear fluorescence in the hypocotyl and decreased nuclear fluorescence in the cotyledons. The analysis of the aforementioned transgene in the *cop1* and *pif4* mutant backgrounds revealed differential changes in the nuclear abundance of BES1. Therefore, COP1 and PIF4 differentially affect BES1 in the hypocotyl and the cotyledons exposed to either shade or warm temperatures. We also measured *BES1* gene expression, by qRT-PCR, independently in both organs and we observed a reduction in expression levels in response to the shade and warm-temperature treatments, particularly in the cotyledons. We propose that the differential balance of transcriptional and posttranscriptional effects of shade or warm-temperature on BES1 in the hypocotyl and cotyledons leads to opposite BES1 responses, which in turn cause the opposite growth response.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, shade, temperature, brassinosteroids, BES1.

DEDICATORIA

A mi papá y mamá mi fortaleza, y a mi abuela que siempre estará a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi familia, a mi papá por estar presente siempre y a mi mamá por apoyarme y escucharme. Los amo.

Agradezco a mis directores, a Jorge por aumentar mi entusiasmo por estudiar las plantas, por su confianza y sabiduría, a Santi por estar presente en los debates, por su pensamiento crítico y por apasionarme a entender los brasinoesteroides.

A mis compañeros de laboratorio: al team 203i, a Marti, y Majo por enseñarme muchísimo, por 3 años de mates, debates, y risas juntas, por acompañarme y alentarme aún estando lejos; al new 203i, a Ger por bancarme en todas, a Anto por su alegría y en especial a Lu por enseñarme a ser codirectora. A los chicos de IFEVA, en especial a Marian, Sofi y Ezequiel por todos los confos compartidos, las risas y debates.

A los viejos 103, Steve, Majo, Andrew, Beck, Caro, Javi, Juli y Stefi, por tantos almuerzos y viernes de cerveza compartidos, por prestarme cualquier cosa que he necesitado y por despejar mis dudas. A los nuevos 103, Marian, Dani, Buon, Coni, Jean y Lu por compartir sus frustraciones y alegrías.

A los birras por hacer de los viernes o jueves un momento de relajación, en especial a Juli, Elvia, Sole, Anita y Naty por escucharme y aconsejarme. A los vecinos del 202, por hacer más divertidas las tardes, en especial a Mora, Luana, Franco, Hora y Guadi.

A mis amigas del alma, por ayudarme a adaptarme a la ciudad de la furia, a Meli, Euge y Faty, y a Ro por ser una gran compañera de casa, por bancarme mi desorden y locura.

A mis compañeros de pensión, Ami, Geogi, Nahuel por ayudarme a establecerme el primer año en capital y a Flor, por ser mi confidente y compañera de lucha.

A mis primas Lety y Vivi por los domingos familiares.

A la Fundación Instituto Leloir, por haberme permitido aprender muchísimo en esos años, por el uso incansable de confocales y por las cinco ediciones de la noche de los museos.

A todos y cada uno de ustedes simplemente GRACIAS!

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
DEDICATORIA.....	4
AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICE	6
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	8
Introducción.....	9
Señales de sombra y de temperatura controlan el crecimiento de las plantas:	
Foto- y Termo-morfogénesis	10
Señalización por luz y temperatura	10
Principales hormonas involucradas en las señales de luz y temperatura.	12
Señalización de brasinoesteroides: importancia de BES1 y BZR1	13
Interacción entre las señales de luz y temperatura y la señalización por BR:	
.....	14
OBJETIVOS	18
Objetivo General	18
Objetivos Específicos.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Tratamientos de luz y temperatura.....	20
Material vegetal.....	20
Reproducción del material vegetal	21
Genotipado	21
Medición del crecimiento del hipocótilo y del área del cotiledón	22
Microscopía confocal	22
Análisis de imágenes	23
Blots de proteínas	23
RT-PCR cuantitativa	24
Análisis estadístico.....	25
RESULTADOS.....	26
Cambios en la acumulación de la proteína BES1 en respuesta a señales de sombra y temperatura.....	27

Niveles de la proteína BES1 en distintos órganos en respuesta a señales de luz y temperatura	28
El crecimiento de los hipocótilos y cotiledones responden de manera opuesta a señales de sombra y alta temperatura.	31
Cambios en la expresión de <i>BES1</i> ante tratamientos de sombra y temperatura.....	32
Contenido de BR en <i>A. thaliana</i> y <i>B. napus</i> expuestas a sombra y temperatura.....	33
Dinámica de COP1, PIF4, RGA y DR5 en cotiledón, ante tratamientos de sombra o temperatura.....	37
COP1 modifica la abundancia de BES1 en diferentes órganos ante tratamientos de sombra y temperatura	39
PIF4 afecta la estabilidad de BES1 en diferentes órganos en respuesta a sombra y temperatura.	40
DISCUSIÓN	41
BES1 cambia su abundancia con la sombra y la temperatura con un patrón dependiente del órgano.	42
Efectos de las condiciones de sombra y altas temperaturas sobre los niveles de BR.....	43
BES1 cambia su expresión con sombra y temperatura	44
BES1 es regulado por COP1 y PIF4 en sombra y temperatura.	44
Las respuestas morfogénicas de las plantas ante señales ambientales, dependen de la integración de las señales hormonales	45
CONCLUSIONES.....	47
Referencias bibliográficas	49

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Primers</i> de <i>pif4-101</i> utilizados para genotipar las cruizas.	22
Tabla 2. <i>Primers</i> utilizados para qRT-PCR.....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Componentes de la señalización por luz y temperatura.	11
Fig. 2. Modelo de la vía de señalización de Brasinoesteroides 14	
Fig. 3. Tratamientos de sombra (A) y temperatura (B).	20
Fig. 4. Cambio en la abundancia de BES1 ante diferentes tratamientos de sombra o temperatura.	27
Fig. 5. BES1 se acumula en el núcleo en forma diferencial en cotiledones e hipocótilos ante señales de sombra y temperatura.	29
Fig. 6. Cambios en la abundancia de BES1 en cotiledones e hipocótilos de <i>B.</i> <i>napus</i> ante tratamientos de sombra y temperatura.	30
Fig. 7. Crecimiento del área del cotiledón en respuesta a la sombra o temperaturas elevadas.....	31
Fig. 8. Crecimiento de los hipocótilos en respuesta al sombreado o altas temperatura	32
Fig. 9. Expresión BES1 ante tratamientos de sombra y temperatura.....	33
Fig. 10. Contenido de BR en plantas de <i>A. thaliana</i> expuestas a sombra y temperatura.	35
Fig. 11. Contenido de BR en plantas de <i>B. napus</i> expuestas a sombra y temperatura.	36
Fig. 12. Cambios en la intensidad nuclear de COP1, PIF4, RGA y DR5 en cotiledones ante tratamientos de sombra y temperatura.....	38
Fig. 13. Cambios en la intensidad nuclear de pBES1:BES1-GFP en fondo <i>cop1-</i> <i>4</i>	39
Fig. 14. Cambios en la intensidad nuclear de pBES1:BES1-GFP en fondo <i>pif4-</i> <i>101</i>	40

Introducción

Señales de sombra y de temperatura controlan el crecimiento de las plantas: Foto- y Termo-morfogénesis

La vida de la planta se ve comprometida por condiciones de luz y temperatura por encima o por debajo de un rango óptimo. Para evitar condiciones ambientales extremas, las plantas han desarrollado mecanismos complejos para percibir las señales informativas proporcionadas por los cambios en la luz y la temperatura; utilizan estas señales para ajustar su metabolismo y forma corporal para soportar entornos desfavorables y, por lo tanto, minimizar el daño. Estos procesos se denominan foto y termo-morfogénesis.

La foto-morfogénesis estudia el control del crecimiento y desarrollo de las plantas por las señales percibidas por receptores foto-sensoriales. Cuando las plantas están expuestas a sombra por plantas vecinas, movilizan sus recursos para crecer y llegar hasta la luz como parte de un proceso denominado "Respuestas de escape al sombreado" (Casal, 2012; Morelli & Ruberti, 2000; Vandebussche *et al.*, 2003).

El conjunto de cambios morfológicos inducidos por altas temperaturas ambiente, por debajo del rango de estrés por calor y por encima del rango que causa estrés por frío, se llama colectivamente termo-morfogénesis. (Quint *et al.*, 2016).

Tanto los patrones de luz como los de temperatura brindan señales de información esenciales que guían el ajuste de la planta a las condiciones ambientales prevalecientes. La luz penetra muy poco en el suelo y la amplitud de las oscilaciones de la temperatura (la diferencia entre las temperaturas máximas y mínimas diarias) disminuye con la profundidad del suelo (Campbell y Norman, 1998); por lo tanto, las señales de luz y temperatura proporcionan datos complementarios sobre la posición con respecto a la superficie del suelo. Los cambios en la posición de los órganos de la planta en el eje vertical en relación con el suelo (altura / profundidad), en el eje horizontal en relación con las plantas vecinas (distancia) y en el eje temporal a través de las estaciones causan grandes modificaciones en las condiciones ambientales y pueden imponer diversos desafíos a las plantas (Legris *et al.*, 2017).

Entre los cambios fisiológicos que provocan la sombra y el aumento de temperatura se encuentran hipocótilos, tallos, pecíolos o entrenudos alargados, hojas hiponásticas, tamaño reducido de la lámina de la hoja, dominancia apical mejorada y floración temprana (Franklin, 2008; Martínez-García *et al.*, 2010; Casal, 2013, Quint *et al.*, 2016).

Señalización por luz y temperatura

Las señales de sombra son percibidas principalmente por el fitocromo B (phyB). Los fitocromos son fotorreceptores de luz roja (R) y rojo lejano (RL) que contienen un tetrapirrol lineal como cromóforo (Li *et al.*, 2011). Los fitocromos se encuentran en dos formas fotointerconvertibles: 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). 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 phyB podría

participar también en la percepción de la temperatura (Jung *et al.*, 2016; Legris *et al.*, 2016).

Podemos definir dos ramas interconectadas que actúan aguas abajo de phyB en el control del crecimiento del hypocótilo mediado por la luz y la temperatura (Figura 1). Una rama involucra el factor de transcripción PIF4 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4), mientras que la otra involucra a COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1) y el factor de transcripción HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5) (Legris *et al.*, 2017). En sombra o a temperaturas elevadas, PIF4 y COP1 están activos (debido en parte a la actividad reducida de phyB) y la abundancia de HY5 finalmente se reduce (debido en parte a la mayor actividad de COP1). Este escenario es revertido por la luz o bajas temperaturas, lo que aumenta la actividad de phyB.

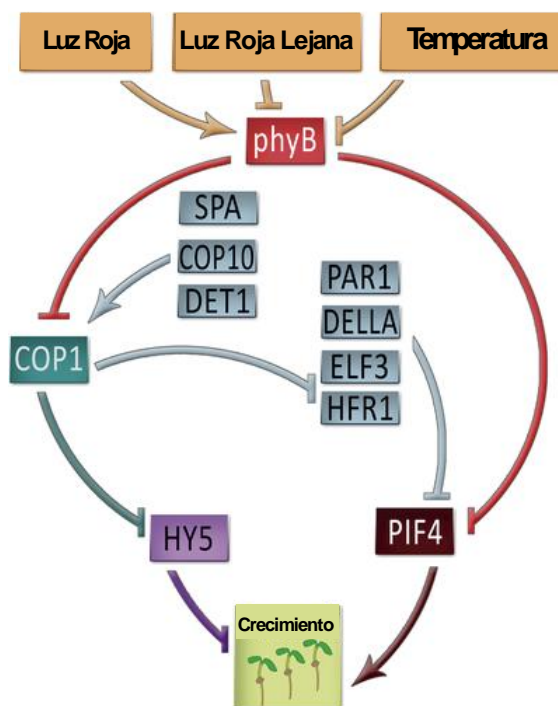


Fig. 1. Componentes de la señalización por luz y temperatura (Modificado de Legris *et al.*, 2017). El esquema resalta los componentes clave de dos ramas de señalización interconectadas que actúan aguas abajo del fitocromo B (phyB).

En *Arabidopsis*, los fitocromos activados por la luz migran al núcleo donde interactúan con una familia de factores de transcripción de tipo bHLH llamados PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIFs). En presencia de luz, la interacción provoca la fosforilación de los PIFs causando su degradación en el proteasoma 26S (Duek and Fankhauser, 2005) o bien su secuestro en cuerpos nucleares (Leivar *et al.*, 2008).

Las respuestas para evitar la sombra requieren principalmente *PIF4*, *PIF5* y *PIF7* (Lorrain *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012), mientras que la promoción del crecimiento en temperaturas cálidas requiere principalmente *PIF4* (Koini *et al.*,

2009; Stavang *et al.*, 2009). Por lo tanto, *PIF4* es compartido por las respuestas de crecimiento en respuesta a la calidad de luz y diferentes temperaturas. La estabilidad de la proteína *PIF4* aumenta con la sombra (Lorrain *et al.*, 2008) o temperaturas elevadas (Foreman *et al.*, 2011). La temperatura ambiente elevada también mejora la expresión del gen *PIF4* durante la noche (Koini *et al.*, 2009).

COP1 es una RING E3 ligasa que se dirige a varias proteínas involucradas en la fotomorfogénesis para la degradación en el proteasoma 26S, incluido el factor de transcripción HY5 (Osterlund *et al.*, 2000), que es necesario para inhibir el crecimiento del hipocótilo (Oyama *et al.*, 1997). Los niveles de COP1 se acumulan en el núcleo cuando las plantas están expuestas a la sombra (Pacín *et al.*, 2013). Las temperaturas elevadas también provocan la importación nuclear de COP1, y este hace posible la coincidencia entre la señalización de temperatura cálida y los ritmos circadianos, lo que permite a las plantas controlar la termomorfogénesis de hipocótilo en temperaturas cálidas (Park *et al.*, 2017).

Principales hormonas involucradas en las señales de luz y temperatura.

Los procesos descritos antes causan alteraciones en la síntesis y/o señalización de factores de crecimiento, que son en última instancia los responsables de los cambios de tasas de elongación diferencial de las células. La auxina es esencial para el crecimiento de hipocótilo en respuesta a la sombra (Tao *et al.*, 2008) y temperaturas cálidas (Gray *et al.*, 1998). Además de la activación directa de las enzimas degradadoras de la pared celular necesarias para la expansión celular, los PIF modulan la expresión de varios genes relacionados con la auxina y desempeñan un papel central en el control de la síntesis de la auxina (de Lucas y Prat, 2014). Los PIFs median las respuestas de escape al sombreado regulando la expresión de genes de síntesis de auxinas (*YUCCA*, *YUC*), incrementando los niveles de auxinas y promoviendo así el crecimiento del tallo (Hornitschek *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012).

En altas temperaturas ambientales, los niveles de ácido indol-3-acético (*IAA*) libre en tejidos aumentan (Franklin *et al.*, 2011), y luego se activan genes de la biosíntesis de auxina como *YUC8*, el citocromo P450 de la FAMILIA 79B (*CYP79B*) y Triptófano AMINOTRANSFERASA DE ARABIDOPSIS 1 (*TAA1*) (Sun *et al.*, 2012), lo que resulta en el crecimiento mediado por SAUR, y por una cascada que implica factores de transcripción de tipo HLH típicos y atípicos, como *PAR1* (*PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED1*), *PRE1* (*PACLOBTRAZOL RESISTANCE1*), *IBH1* (*ILI1 BINDING BHLH 1*) y *HBI1* (*HOMOLOG OF BEE2 INTERACTING WITH IBH1*), y en última instancia, una inducción de genes de remodelación de las paredes celulares (Bai *et al.*, 2012).

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 rojo/rojo lejano (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 otras proteínas DELLA (Djakovic-Petrovic *et al.*, 2007). También se informó recientemente que las proteínas DELLA promueven la degradación de los PIF en el sistema ubiquitina-proteasoma a través de una ligasa E3 desconocida (Li *et al.*, 2016). La

abundancia de proteínas DELLA se reduce por la oscuridad (Achard *et al.*, 2007), la sombra (Djakovic-Petrovic *et al.*, 2007) y las altas temperaturas (Stavang *et al.*, 2009), lo que contribuye a la liberación de PIF4.

Estudios recientes demuestran que las vías de auxina, GA y fitocromo convergen con la de brasinoesteroides, a través de interacciones directas entre sus factores de transcripción / reguladores (Oh *et al.*, 2014; Oh *et al.*, 2012). Esta tesis se centra en el estudio de la vía de señalización de los brasinoesteroides y su interacción con la sombra y la temperatura.

Señalización de brasinoesteroides: importancia de BES1 y BZR1

Los brasinoesteroides (BR) son hormonas esteroides de plantas conocidas principalmente por promover el crecimiento de órganos a través de su efecto combinado sobre la expansión y división celular. Regulan múltiples funciones fisiológicas, incluyendo germinación de semillas, elongación celular, división celular, senescencia, diferenciación vascular, reproducción, desarrollo de raíces, fotomorfogénesis, y también responden a diversos estreses bióticos y abióticos (Clouse y Sasse, 1998; Li y Chory, 1999; Sreeramulu *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2015).

El mantenimiento y la regulación del nivel endógeno de BR es crucial para varias funciones biológicas en las plantas. La regulación celular de los niveles de BR es finamente ajustada. Esto se evidencia a partir de la observación de que el aumento en la concentración de BR endógeno conduce a la regulación por retroalimentación negativa de los genes metabólicos de BR, mientras que las condiciones deficientes de BR provocan la expresión de los genes de biosíntesis de BR para mantener la homeostasis de BR (Tanaka *et al.*, 2005). La señalización de BR implica su percepción por el receptor de la membrana celular seguida por la activación de la cascada de eventos de fosforilación para transmitir la señal que resulta en la regulación de la expresión génica (Belkhadir y Jaillais, 2015).

Los BR (Figura 2) se perciben por el receptor BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1), una proteína de tipo receptor quinasa con un dominio extracelular con repeticiones ricas en leucina (LRR-RLK), localizado en la membrana plasmática (Caño-Delgado *et al.*, 2004).

En ausencia de BR, el homodímero BRI1 permanece en una forma inactiva por la interacción con la proteína inhibitoria BKI1 (BRI1 KINASE INHIBITOR 1), así como por la función autoinhibitoria de su dominio quinasa citoplasmático (Wang *et al.*, 2005b; Wang y Chory, 2006; Jaillais *et al.*, 2011).

En presencia de BR, la unión de BR al dominio extracelular de BRI1 desencadena un cambio conformacional en el receptor, resultando en la autofosforilación del bucle de activación de su dominio quinasa intracelular, y así iniciando una transfosforilación en BKI1 y su disociación de la membrana, permitiendo que BRI1 pueda interactuar con BAK1 (BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE) (Wang *et al.*, 2005b; Wang y Chory, 2006). BKI1 también promueve la señalización uniéndose a la proteína 14-3-3 y reprimiendo sus funciones negativas en la señalización de BR (Wang *et al.*, 2011). BRI1 activado fosforila CGD1 (CONSTITUTIVE DIFFERENTIAL GROWTH 1) y BSK1 y, posteriormente activa BRI1-supresor 1 (BSU1). BSU1 de-fosforila a BIN2

(BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2) (Kim y Wang, 2010) para inhibir su función, simultáneamente, BIN2, una quinasa del tipo GSK3, fosforila los factores de transcripción principales de la vía BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT 1) y BES1 (BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1, también llamado BZR2), inhibiendo su actividad por degradación de proteínas, reducción de la unión al ADN y/o retención citoplasmática por proteínas 14-3-3 (Ye *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2013).

BZR1 y BES1 son de-fosforilados por PP2A (PROTEIN PHOSPHATASE 2A) y se liberan de las proteínas 14-3-3 (Tang *et al.*, 2011), lo que resulta en su localización nuclear para unirse al promotor de sus genes diana para regular su expresión génica (Sun *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012).

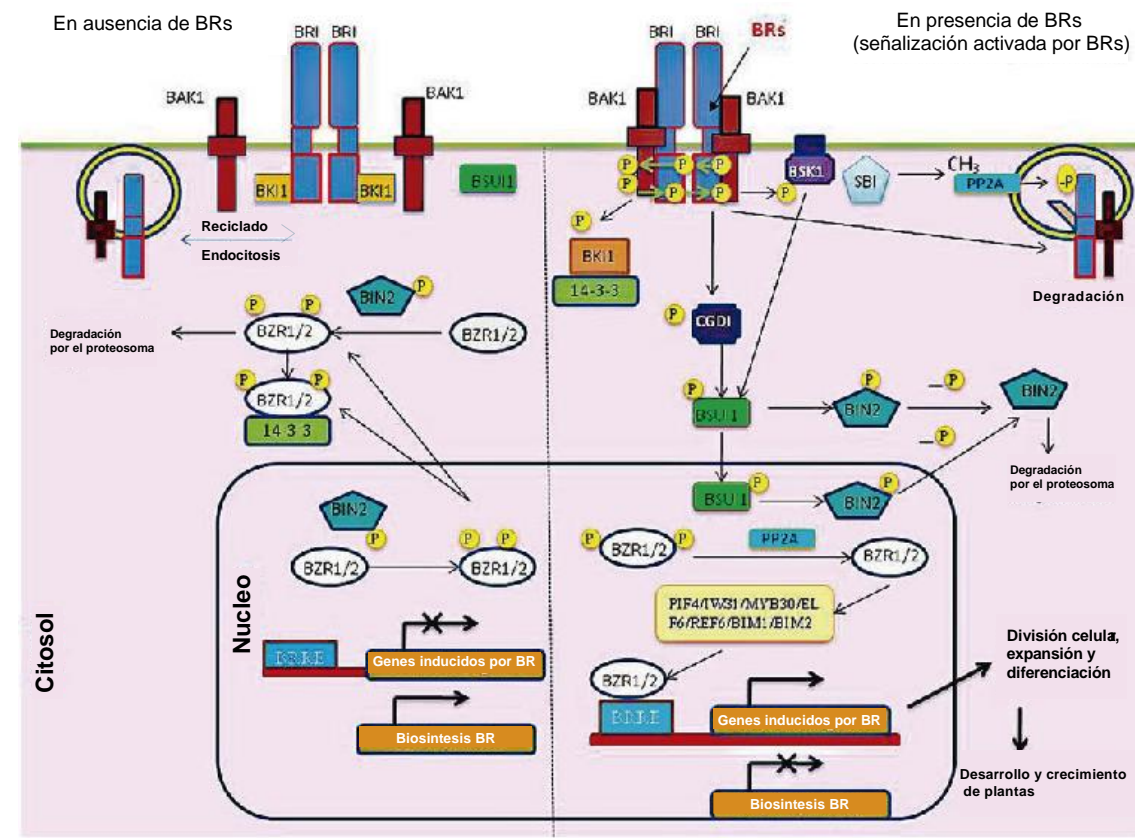


Fig. 2. Modelo de la vía de señalización de Brasinoesteroides (Modificado de Saini *et al.*, 2015)

Interacción entre las señales de luz y temperatura y la señalización por BR:

BZR1 y BES1 son los dos principales factores de transcripción de la vía de señalización de BR que median en la función de BR mediante la regulación de la expresión de varios miles de genes que representan aproximadamente el 20% del genoma en *Arabidopsis* (Guo *et al.*, 2013). Comparten una identidad de secuencia significativa del 88% a nivel de la proteína y una identidad del 97% en su dominio de unión al ADN (Wang *et al.*, 2012). Su estructura comprende

básicamente un dominio N-terminal de unión a ADN de tipo bHLH (DBD), y un dominio regulatorio C-terminal que contiene 22 sitios putativos de fosforilación por BIN2, un motivo PEST (Pro, Glu, Ser y Thr) involucrado en la degradación de proteínas, y un motivo de unión a proteínas 14-3-3, que se unen a dominios fosforilados (Tang *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2013). En el extremo C-terminal de BZR1 y BES1 se encuentran además una secuencia altamente conservada implicada en la interacción con BIN2 (Wang *et al.*, 2002) y una secuencia de dominio tipo EAR que participa en el reclutamiento de co-represores transcripcionales de la familia TPL (Martinez *et al.*, 2018). Aunque BZR1 y BES1 / BES1 desempeñan funciones bioquímica y genéticamente redundantes, los estudios realizados sobre los mutantes de ganancia de función por mutación en el dominio PEST, *bzr1-1D* y *bes1-D*, muestran fenotipos distintivos que revelan variaciones en el nivel de las proteínas, ya sea a nivel de patrón de expresión o interacción con otras proteínas asociadas (He *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2010). Recientemente se ha encontrado que tanto *BES1* como *BZR1* se pueden unir a las cajas BRRE (5'-GCTG(T/C) G-3') y E (CANNTG), BRRE principalmente enriquecido en genes reprimidos de BR y las cajas de E están principalmente enriquecidas en genes inducidos por BR (Sun *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2013).

Los análisis de interacción global proteína-ADN, así como el perfil de expresión, han identificado aproximadamente 953 genes regulados por BZR1, mientras que BES1 controla 250 genes, de los cuales un conjunto de 120 genes muestra una superposición con los genes de BZR1 y, por lo tanto, regulan varios genes en función del promotor específico del gen (Sun *et al.*, 2010; Gudesblat y Russinova, 2011; Yu *et al.*, 2011). Tras la activación de la señalización de BR, BES1 y BZR1 se unen a su propia secuencia promotora para inducir su expresión a través de un circuito de retroalimentación positiva (Yu *et al.*, 2011).

Estudios recientes demuestran que las vías BR, auxina, GA y fitocromo convergen a través de interacciones directas entre sus factores de transcripción reguladores. BZR1, PIF4 y ARF6 (AUXIN RESPONSE FACTOR 6) interactúan entre sí, para activar muchos genes diana compartidos y promover el alargamiento del hipocótilo, además de ser genéticamente interdependientes entre sí (Oh *et al.*, 2014, Oh *et al.*, 2012). Por ejemplo, aumentar los niveles de BZR1 o PIF4 aumenta la unión de ARF6 a varios promotores de genes compartidos in vivo (Oh *et al.*, 2014).

Los genes compartidos activados por PIF4, BR, auxina y GA están enriquecidos con funciones en el alargamiento de la célula (como la síntesis y el ablandamiento de la pared celular), compatibles con los roles de estos factores de transcripción para promover el alargamiento de la célula (Bai *et al.*, 2012). Dicha interacción cooperativa entre BZR1, ARF6 y PIF4, así como su inhibición por DELLA, se denomina módulo BZR-ARF-PIF/DELLA (BAP/D) (Wang *et al.*, 2014).

Basados en los datos de ChIP-seq y RNA-seq, BZR1, ARF6 y PIF4 activan un gran número de genes compartidos, pero cada uno de ellos también regula subconjuntos de genes de forma única o conjunta con uno de ellos (Oh *et al.*, 2014, Oh *et al.*, 2012). Entre estas funciones únicas se encuentran la inhibición por retroalimentación de su propia vía de señalización, pero con la activación cruzada de las vías asociadas.

La señalización de luz se ve atenuada por retroalimentación a través de la activación por parte de los genes PIF de sus inhibidores PAR1 y HFR1 (Hornitschek *et al.*, 2009, de Lucas y Prat, 2014). En contraste con la inhibición de la retroalimentación dentro de cada vía, la regulación cruzada entre las vías tiende a ser mayormente positiva. Por ejemplo, la señal de BR aumenta el transporte de auxinas, la auxina activa la expresión del gen de biosíntesis de BR, DWF4, tanto los BR como la auxina aumentan la biosíntesis de GA, y los PIF activan la biosíntesis de auxinas y aumentan los niveles de GA (de Lucas y Prat, 2014, Wang *et al.*, 2014). Además, BIN2 fosforila e inactiva tanto a PIF4 como a ARF2, y por lo tanto la inactivación de BIN2 por parte de BR también potencialmente activa estos factores de transcripción (Wang *et al.*, 2012, Bernardo-García *et al.*, 2014). PAR1 y HFR1 (LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED) se unen a PIF e inhiben su capacidad de unión al ADN, mientras que PRE1, regulado por BR y activado por BES1 y BZR1, secuestra a PAR1 y HFR1, formando un circuito de retroalimentación positiva de HLH-HLH-bHLH (HHbH) en cascada (Wang *et al.*, 2014). Dicha regulación compleja de PAR1 y HFR1 proporciona potencialmente la respuesta de luz adecuada en un amplio rango dinámico de condiciones de luz/oscuridad. El acoplamiento de los módulos BAP/D y HHbH crea un sistema de comando central altamente robusto, que integra señales de luz y hormonales en respuestas de elongación celular coherentes y dinámicas.

En estudios de Kim *et al.* (2014), se demostró que en oscuridad aumenta la actividad de BZR1, al disminuir la forma fosforilada (inactiva) de BZR1 de una manera dependiente de proteasoma, siendo marcada para su degradación por COP1. Además, BZR1 es abundante en el mutante *cop1-4*. La eliminación de BZR1 fosforilado en la oscuridad aumenta la proporción de formas de-fosforiladas de BZR1, lo que aumenta la posibilidad de que se formen homodímeros activos entre la forma de-fosforilada (dBZR1). El papel de BES1 y COP1 ante señales de sombra y temperatura, aún permanece desconocido, en esta tesis evaluaremos su posible interacción y si esa interacción produce cambios en la señalización por BR.

Por otro lado, la temperatura cálida activa la expresión de PIF4 para inducir el crecimiento termo-sensible (Quint *et al.*, 2016). En estudios recientes de Ibáñez *et al.* (2018), demostraron que tanto la función de PIF4 como la de auxina dependen de los brasinoesteroides. BZR1 se acumula en el núcleo a alta temperatura, donde induce la expresión de genes promotores del crecimiento y se une al promotor de PIF4, induciendo su expresión. Estos hallazgos sugieren que BZR1 funciona en un bucle de amplificación involucrado en la activación de PIF4, siendo BZR1 un verdadero regulador positivo, dependiente de la temperatura, de PIF4. Por otra parte, se ha demostrado que BES1, PIF4 y el complejo BES1-PIF4 reconocen diferentes elementos de unión al ADN, homodímeros BES1 se unen a los elementos BRRE y G-box conservados en los promotores de genes biosintéticos de BR e inhiben su expresión durante el día, mientras que niveles elevados de PIF4 compiten por la formación del homodímero BES1, lo que resulta en la biosíntesis de BR sin represión al amanecer y en respuesta a calor (Martínez *et al.*, 2018).

En estudios recientes (Wu *et al.*, 2018), se demostró que el mutante *phyB* muestra hipersensibilidad a BR, sugiriendo que phyB regula negativamente la vía de señalización de BR. Además, los resultados de la interacción de proteínas

muestran que phyB interactúa con BES1 de-fosforilado, de una manera dependiente de la luz roja. La señal de la luz roja mediada por phyB, inhibe la señalización de BR al reprimir la expresión de los genes regulados por BES1, incluidos los genes de biosíntesis *DWF4*, *SAUR (SMALL AUXIN UP-REGULATED)* y *PRE*; e inhibe la capacidad de unión al ADN de BES1, reprimiendo su actividad. Esto sugiere que la interacción de phyB con BES1 de-fosforilada puede permitir a las plantas equilibrar la señalización por luz y BR al reprimir la actividad transcripcional de BES1 para regular la expresión de sus genes diana.

Basados en la información disponible, podemos hipotetizar que tanto la sombra como la temperatura pueden afectar la actividad de BES1. En este trabajo se evalúa dicha posibilidad

OBJETIVOS

Objetivo General

Sabemos que la promoción del crecimiento de hipocotilo en la oscuridad (Li *et al.*, 1996), sombra (Luccioni *et al.*, 2002) o temperaturas cálidas (Stavang *et al.*, 2009) requiere una síntesis normal de brasinoesteroides, no solo para la acumulación de BZR1 y BZR2 sino también para estabilizar el PIF4 (Bernardo-García *et al.*, 2014). Basado en estos antecedentes y los antes mencionados, nos propusimos como objetivo general de esta tesis, investigar como las señales de sombra y/o temperatura pueden afectar componentes que actúan aguas debajo de la percepción de brasinosteroides y sobre su biosíntesis.

Nuestra hipótesis general de trabajo es que si las señales de sombra y temperatura producen cambios en las vías de señalización de brassinosteroides y/o en su biosíntesis, podremos comprobarlo analizando la abundancia y acumulación de los factores de transcripción principales y los compuestos activos de la biosíntesis, donde deberíamos observar esos cambios. Si estas señales afectan a la señalización a través de los factores de transcripción principales puede ser debido por ejemplo a su interacción con otras proteínas de vía de señalización por luz y temperatura.

Objetivos Específicos

El primer objetivo específico será investigar el impacto de las señales de sombra y de temperatura sobre la dinámica de las formas activas del factor de transcripción BES1, que cumple un papel fundamental en las respuestas de crecimiento en respuesta a brasinoesteroides. Para ello nos planteamos como hipótesis nula que las señales de sombra o temperatura no afectan la acumulación, localización u abundancia de BES1.

El segundo objetivo específico será investigar si las señales de sombra y/o temperatura afectan la síntesis de BR. Nuestra hipótesis nula para este objetivo es que las señales de sombra o de temperatura no afectan la biosíntesis de compuestos activos de BR, por lo tanto no veremos cambios en estos compuestos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamientos de luz y temperatura

Utilizamos el mismo esquema para tratamientos de luz/sombra y para alta/baja temperatura. Las plantas fueron cultivadas durante cuatro días en un fotoperiodo de día corto 10 h de luz y 14 de oscuridad, para poder observar mejor los cambios en la tasa de crecimiento. Se utilizaron cuatro combinaciones. Para el caso de experimentos de luz/ sombra las plantas fueron cultivadas en luz o sombra (a 20°C) y, una hora luego de comenzar el fotoperiodo del día 4, la mitad de cada grupo fue transferida a la condición opuesta (Fig. 3A). Del mismo modo, para los experimentos de temperatura las plantas fueron cultivadas en luz a 20°C o 28°C y, una hora luego de comenzar el fotoperiodo del día 4, la mitad de cada grupo fue transferida a la condición opuesta (Fig. 3B). 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) y un PAR de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 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 relación R:RL a 0.15 y el PAR a 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Pacin *et al.*, 2016).

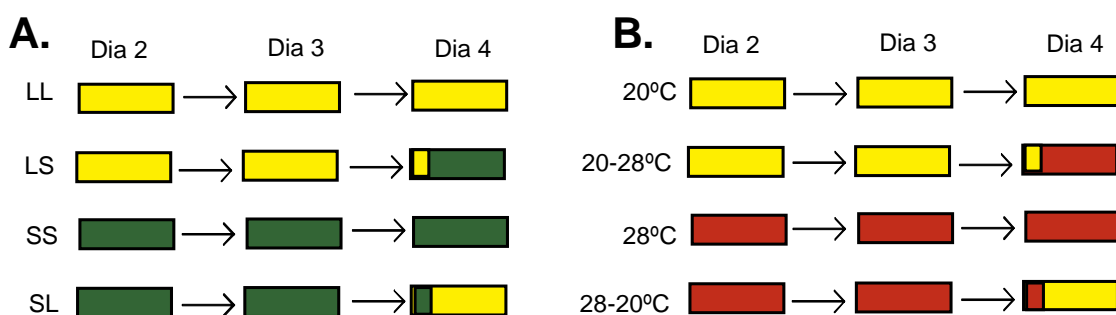


Fig. 3. Tratamientos de sombra (A) y temperatura (B). En amarillo luz y 20°C, en verde, tratamientos de sombra y en naranja 28°C.

Material vegetal

Todos los experimentos de esta tesis se realizaron con plantas de *Arabidopsis thaliana* o *Brassica napus*.

Para determinar si la dinámica del crecimiento del hipocótilo y de los cotiledones, en diferentes condiciones de sombra y temperatura, es afectada por BES1 y BZR1, analizamos la tasa de crecimiento del tallo y el área del cotiledón en plantas de *A. thaliana* de genotipo salvaje Columbia (Col) y en mutantes de ganancia de función como *bzr1-1D* y *bes1-1D* (Wang *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002) en las condiciones antes descritas (Fig.3). Además medimos la tasa de crecimiento en la mutante *bri1-301* que presenta un fenotipo de pérdida parcial en la percepción de BR (Xu *et al.*, 2008), *DWF4-OX* (Choe *et al.*, 2001) que sobre expresa un gen de la vía biosintética de BR y la mutante triple de pérdida de función de BIN2 y sus dos genes homólogos más relacionados (At1g06390 y At2g30980) GSK3 triple mutante (Vert, G. and Chory, J., 2006), involucrados en la señalización y síntesis de BR.

Utilizamos plantas que expresan *pBES1:BES1-GFP* (Yin *et al.*, 2002) expuestas a los distintos tratamientos, para analizar los cambios en la abundancia nuclear de esta proteína.

Se realizaron cruces de plantas transgénicas *pBES1:BES1-GFP*, con el mutante *cop1-4* (McNellis *et al.*, 1994); y *pif4-101* (Lorrain *et al.*, 2008). El objetivo de esta metodología fue obtener el transgen que codifica a BES1 fusionado a GFP en un sustrato mutante para poder evaluar su dinámica y abundancia nuclear.

Además analizamos la expresión de COP1, PIF4, RGA Y DR5 en cotiledones expuestos a sombra o temperatura en plantas transgénicas *35S:COP1-YFP* (Oravec *et al.*, 2006), *pPIF4:PIF4-GFP* (Pucciarello *et al.*, 2018), *pRGA:RGA-GFP* (Fu & Harberd, 2003) y *pDR5rev:3XVENUS-N7* (Heisler *et al.*, 2005).

Para entender si los efectos observados se deben a una mayor acumulación de BR en los diferentes órganos cosechamos plantas de *A. thaliana* y *B. napus*, a las cuales les separamos el cotiledón e hipocótilo. Estas muestras fueron liofilizadas y enviadas al laboratorio del Dr. Miroslav Strnad (*Laboratory of Growth Regulators, Institute of Experimental Botany, Czech Republic*), donde se midió el contenido de hormonas por medio de espectrometría de masa (Tarkowska *et al.*, 2016).

Reproducción del material vegetal

Las semillas se sembraron en agar agua 0.8%, en cajas de acrílico de 3 x 4 x 2 cm (largo-ancho-alto). Se estratificaron durante 3-5 días a 4°C, oscuridad. Luego de trasladaron a un cuarto de cultivo, con fotoperiodo de 16 h, luz provista por tubos fluorescentes. Al cabo de 3-6 días se trasplantaron las plántulas germinadas a macetas conteniendo perlita, vermiculita y turba en proporciones 2:2:1. Se regó periódicamente con Hakaphos rojo (COMPO). Una vez secas las silicuas se cosecharon y guardaron en tubos eppendorf de 1,5 ml con un orificio en la tapa. Se conservaron en frascos conteniendo silica durante al menos 15 días y luego se las guardó en cajas a temperatura ambiente o a largo plazo en cuartos fríos.

Para todos los experimentos realizados, se utilizaron los mismos *pools* de semillas, de modo de asegurarnos una germinación homogénea.

Genotipado

Plantas transgénicas *pBES1:BES1-GFP* fueron cruzadas con plantas mutantes *cop1-4*. Las plantas F1 resultantes fueron sembradas en placas con MS-agar [1%] conteniendo kanamicina [50 mg/ml], dado que el transgen que expresa *pBES1:BES1-GFP* posee resistencia a este antibiótico. Se las estratifico durante tres días en oscuridad. Luego se las colocó en luz durante cuatro horas para inducir la germinación y finalmente en oscuridad durante tres días. Se seleccionaron aquellas plantas con fenotipo similar *cop1-4* (mutante dominante de pérdida de función), es decir, plantas con hipocótilos no elongados, además de seleccionar por fluorescencia. Esta selección se repitió para la F2 y con estas plantas se hicieron los experimentos descritos en el trabajo.

Se procedió de la misma forma pero usando plantas mutantes *pif4-101* para obtener la cruce *pBES1:BES1-GFP* x *pif4-101*. La F2 de *pBES1:BES1-GFP/pif4-101* fue genotipada usando *primers* específicos (Tabla 1).

Nombre	Secuencia 5´a 3´
pif4-101 LP	CTCGATTTCCGGTTATGG
pif4-101 RP	CAGACGGTTGATCATCTG
pif4-101 BP	GCATCTGAATTCATAACCAATC

Tabla 1. Primers de *pif4-101* utilizados para genotipar las cruces.

Medición del crecimiento del hipocótilo y del área del cotiledón

Las semillas se sembraron en agar agua, se estratificaron por 4 días (oscuridad, 4°C) y luego fueron trasladadas a las condiciones de crecimiento de cada uno de los tratamientos de luz y temperatura (Fig. 3).

Las placas se colocaron en posición vertical para el caso de los hipocótilos y horizontal para los cotiledones, con el fin de poder registrar el tamaño de las plantas mediante fotografías. Al principio del tratamiento y al cabo de 9 h (final del día) se tomaron fotos de cada placa conteniendo plantas con una cámara Olympus SZ-12, de 14 Mpx.

Como resultado se obtuvieron dos imágenes de cada planta, una al principio del tratamiento y otra al final, lo que permitió medir la tasa de crecimiento de las mismas durante el tratamiento.

Las imágenes de los hipocótilos fueron analizadas con el software Global Mapper. Mediante este software se adjudicaron coordenadas específicas a las dos imágenes, de modo de superponerlas precisamente. Luego se identificó el extremo superior de cada planta en cada foto y comparando estas coordenadas se calculó la elongación durante las 9h de tratamiento. Para los cotiledones se utilizó el programa Adobe Photoshop CS6 Extended, con el cual se seleccionó el área del cotiledón del principio y del final del tratamiento y se calculó la tasa de crecimiento de este órgano.

Para estos experimentos, se utilizaron 3 réplicas técnicas por experimento, se sembraron como mínimo 12 plántulas de cada genotipo, y se midieron entre 8 a 10 de estas plántulas. Las réplicas biológicas fueron los experimentos independientes realizados, para el caso de los hipocótilos fueron un total de 7 mientras que para cotiledones fueron 2 experimentos.

Microscopía confocal

Las imágenes de microscopía de fluorescencia confocal se tomaron con un microscopio LSM5 Pascal (Zeiss) luego de 4 h de tratamiento. Se utilizó un objetivo de inmersión en agua (C-Apochromat 40x/1,2; Zeiss). Para observar las proteínas fluorescentes GFP o YFP se excitó con un láser de argón (488 nm) y se detectó la fluorescencia utilizando un filtro BP 505-530, mientras que para VENUS se utilizó un filtro BP 505-600. En algunos casos se detectó la fluorescencia de la clorofila excitando con un láser de He-Ne (543 nm) y

detectando la fluorescencia con un filtro LP 560. Las imágenes de fluorescencia de la clorofila se utilizaron con el fin de identificar la posición de los cloroplastos, ya que en algunos casos la fluorescencia de este pigmento se filtró en el canal correspondiente al GFP.

Para observar los hipocótilos de las líneas que expresan BES1, PIF4 y RGA fusionadas a un reportero fluorescente, el *pinhole* se cerró hasta obtener un seccionado óptico de 5 µm, mientras que en el caso de la línea que expresa COP1 fusionada a un reportero, debido a la baja intensidad de fluorescencia de la línea transgénica utilizada, el *pinhole* se utilizó totalmente abierto alcanzando un seccionado óptico de 11,5 µm. Para el caso de los cotiledones en todas las líneas se cerró el *pinhole* hasta obtener un seccionado óptico de 2 µm.

En todos los casos las imágenes se tomaron de la epidermis o de las primeras capas sub-epidérmicas. Las réplicas biológicas fueron los experimentos independientes realizados (entre 2 a 7 experimentos), para cada uno de los experimentos se sembró entre 8 a 10 plántulas de los genotipos, y se analizó como mínimo de 3 a 6 plántulas por cada réplica técnica, utilizándose como mínimo 3 o 4 réplicas técnicas.

Análisis de imágenes

Para cuantificar la abundancia nuclear de BES1, PIF4, RGA, DR5 y COP1 se utilizó el software ImageJ. Las imágenes obtenidas contaban con un canal de detección de la clorofila y otro para detectar GFP, YFP o VENUS.

Los núcleos se identificaron por su forma ahusada, comprimidos contra la pared celular, y en muchos casos se lograba identificar el nucléolo. En todos los casos se indica la fluorescencia nuclear promedio. Para obtener este valor se midió la intensidad promedio del canal correspondiente a la proteína fluorescente en las zonas identificadas como núcleos.

Además, se contó el número de núcleos identificados. Por otro lado, utilizando el canal de transmisión y el de clorofila se midió el tamaño de 5-10 células y el tamaño total del área fluorescente. De esta forma se calculó el número de células en el campo. La fluorescencia nuclear promedio o intensidad de fluorescencia relativa se calculó como:

$$\text{Fluorescencia nuclear promedio} = \frac{\text{Número de núcleos} \times \text{brillo nuclear promedio}}{\text{Número de células por campo}}$$

La relativización por el número de células fue necesaria porque en muchos casos los tratamientos generaron cambios en la longitud (y por lo tanto área) de las mismas, modificando la cantidad de células en el campo visual

Blots de proteínas

Los niveles de BES1, se evaluaron mediante Western *blots* en plántulas de genotipo Col, cosechadas a distintos tiempos (1h, 3h, 6h y 9h) luego de la transición entre una condición y otra (Fig. 3), también se realizaron blots de

proteínas de cotiledón e hipocótilo por separado en muestras de *B. napus*. Se utilizó un anticuerpo nativo (Yin *et al.*, 2002) contra la proteína BES1 (proporcionado por el Dr. Santiago Mora).

De cada muestra se cosecharon 50 mg y se trituraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, luego se extrajeron las proteínas totales con 100 μ l de *buffer* de carga 2X (125mM Tris/HCl [pH 7.4], SDS 2%, 10% glicerol, 6M urea), 1% β -mercaptoetanol y 1% PMSF. Las muestras se calentaron 3' a 95°C y luego se centrifugaron 20'a 13.000 rpm (4°C). Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de Acrilamida/Bisacrilamida preparados al 10%.

Se utilizó como anticuerpo secundario Anti-rabbit-HRP (Invitrogen). Para la detección se utilizó el kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) y ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare).

Se empleó la tinción con rojo *Ponceau* como control de uniformidad de carga o adicionalmente, para los *blots* de *B. napus*, se utilizó un anticuerpo que reconoce la 2-Cys Peroxirredoxina (Prx) de cloroplastos (proporcionado por el Dr. Santiago Mora).

Para la cuantificación de las bandas se utilizó el programa ImageJ, siempre se seleccionó el mismo tamaño de rectángulo, con el que se midió la intensidad de cada una de las bandas. La intensidad de cada banda de BES1 luego se le restó la intensidad de banda del Ponceau para calcular su abundancia relativa, y luego ésta fue graficada con el programa GraphPad Prisma 5.

RT-PCR cuantitativa

Con el objetivo de entender si los posibles efectos de los tratamientos de luz y temperatura se deben a un cambio en la expresión *BES1*, se separó cotiledón de hipocótilo y se extrajo ARN para medir mediante PCR cuantitativa su expresión, de forma de saber si este gen se ve afectado por los tratamientos dependiendo del órgano.

Las plántulas fueron congeladas 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 ADN copia fue sintetizado utilizando SuperScript II (Invitrogen) y primer oligo-dT. El ADN obtenido se diluyó (1:3) y fue amplificado con FastStart Universal SYBR Green Master (Roche, <http://www.roche.com>) utilizando el termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Las condiciones de ciclado fueron: un ciclo de 10' a 95°C, 40 ciclos de 30'' a 95°C seguidos de 60'' a 60°C y luego 60'' a 72°C, y un ciclo final para la curva de disociación de 60'' a 95°C seguido de un descenso gradual hasta 60°C donde permanece 30'' para luego volver a 95°C durante 30''. Los resultados de la reacción fueron analizados empleando el software "MxPro-Mx3000P" (Stratagene). Se verificó mediante una curva de disociación que todos los amplicones obtenidos posean la misma temperatura de disociación. Como control negativo se usó agua. Las mediciones se analizaron con la técnica de $\Delta\Delta Ct$.

El gen *Polyubiquitin 2 (UBQ-2)* (Tabla 2) fue utilizado como control de normalización (Staneloni *et al.*, 2009; Czechowski *et al.*, 2005), y se midieron dos o tres réplicas biológicas (experimentos independientes) sobre tres réplicas técnicas.

Gen	Secuencia (5' → 3')
BES1	FW -ACCTGGTGACATGGCTGGATC RV-TGAAGAAGAGGAAGGACTGACTTG
UBQ2	FW-AGAATGCTTGGAGTCCTGCTT RV-ACATTTGTGCCATTGAATTGAACCC

Tabla 2. Primers utilizados para qRT-PCR.

Análisis estadístico

La significancia estadística indicada en los experimentos de respuesta a la sombra o temperatura corresponden a los resultados obtenidos por ANOVA de dos factores, seguido de test de Bonferroni ($p \leq 0.05$) para comparar medias entre sí, estos análisis fueron realizados con el programa Infostat 2016 y graficados con el programa GraphPad 5 Para todos los experimentos se utilizó como unidad de análisis los resultados de cada réplica técnica (placas).

RESULTADOS

Cambios en la acumulación de la proteína BES1 en respuesta a señales de sombra y temperatura.

En electroforesis de poliacrilamida y *blots* de proteína, BES1 se presenta como dos bandas principales; la de mayor movilidad electroforética corresponde a la forma no fosforilada y la banda de menor movilidad a la forma fosforilada (Yin *et al.*, 2002). Tanto en plantas tratadas con brasinolido (BL) como plantas crecidas en oscuridad se observa la acumulación de la forma no fosforilada. Esta es considerada la forma activa que migra al núcleo desencadenando las respuestas dependientes de BR (Yin *et al.*, 2002).

Con el fin de evaluar si la sombra simulada promueve cambios en los niveles totales o relativos de las isoformas de BES1, se analizó la cinética de cambio mediante blots de proteínas utilizando un anticuerpo desarrollado contra la proteína BES1 (Yin *et al.*, 2002). Para ello, las plantas fueron crecidas en luz o sombra por tres días y al cuarto día se realizó el traspaso a las diferentes condiciones de luz o sombra en distintos tiempos (Fig. 3). Al finalizar el tratamiento se congelaron las muestras en nitrógeno líquido para luego ser procesadas con el protocolo descrito en la sección de métodos.

En la Fig. 4A, se puede observar que, en plántulas enteras, a medida que aumenta el tiempo de permanencia en sombra se reducen los niveles de BES1, ($P < 0,05$). Complementariamente, En la Figura 4B, observamos que a medida que aumenta el tiempo en luz aumentan los niveles de BES1 ($P < 0,05$).

Como para varios genes y sus productos, los cambios producidos por la sombra suelen coincidir con los producidos por temperatura, analizamos los cambios en la abundancia de BES1 ante cuatro tratamientos de temperatura: plantas crecidas a 20°C o a 28°C, y plantas que fueron pasadas de 20°C a 28°C o viceversa (según el esquema de la Fig. 3). No se observaron diferencias significativas con el nivel de resolución que se alcanza aquí (Fig. 4C).

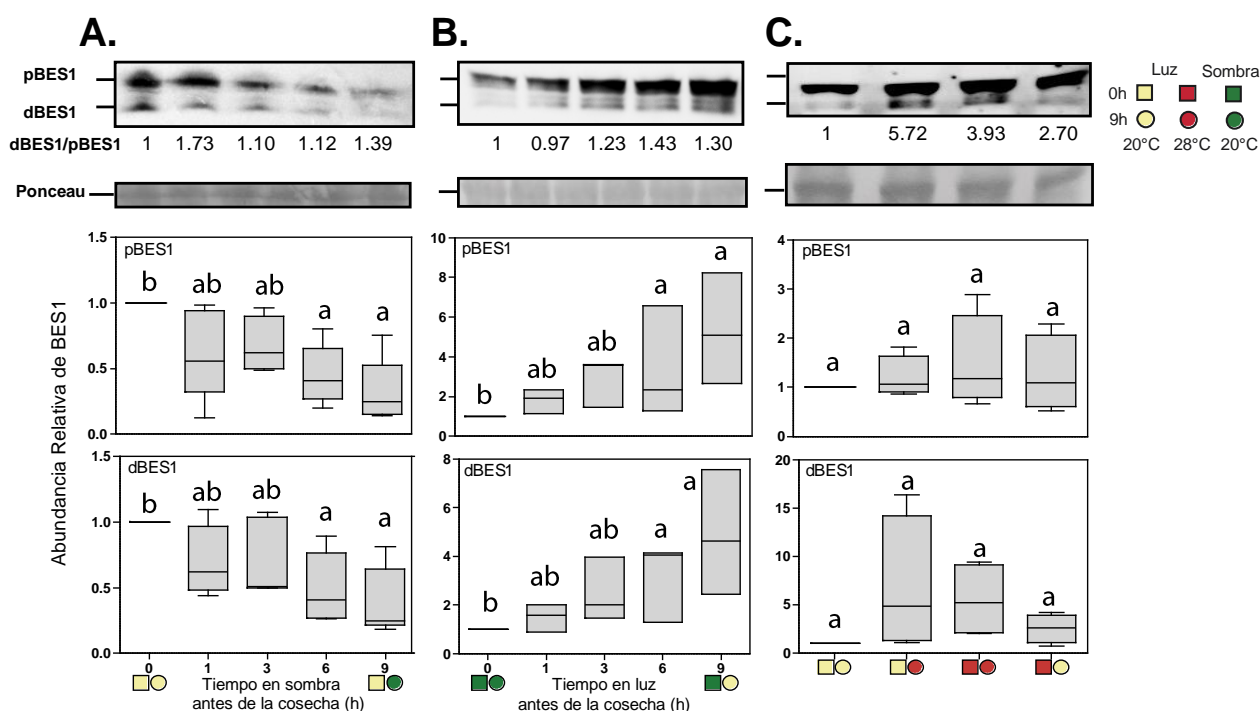


Fig. 4. Cambio en la abundancia de BES1 ante diferentes tratamientos de sombra o temperatura. Cinética de acumulación de las formas fosforilada

(pBES1) y de-fosforilada (dBES1) de BES1 en plantas transferidas de luz a sombra (**A**) o de sombra a luz (**B**) o expuesta a diferentes tratamientos de temperatura (**C**). En cada una de las figuras se muestran los *box-plot* de 4-5 *blots* de proteínas realizados con muestras independientes, en cada uno se grafica la mediana, y los máximos y mínimos. Las letras corresponden a la significancia mediante un análisis estadístico ANOVA seguido de la comparación entre medias por un test de Bonferroni, con un $p \leq 0.05$. En la parte superior se muestran blots representativos de cada tratamiento, y debajo de ellos, la relación dBES1/pBES1.

Los niveles de ambas isoformas de BES1 aumentan con la luz y disminuyen en la sombra. Dado que los BRs promueven el crecimiento y que BES1 es un regulador positivo de la respuesta a BRs, su reducción no parece consistente con la promoción del crecimiento causada por estos tratamientos y esta hormona (Ikekawa and Zhao, 1991; Clouse *et al.*, 1998). Enfrentados a esta aparente contradicción, hipotetizamos que tal vez los niveles de BES1 no respondan de la misma manera en hipocótilos y cotiledones, pues la promoción del crecimiento en respuesta a sombra o alta temperatura podría limitarse a los hipocótilos. De ese modo, los resultados de análisis basados en plántulas enteras no brindarían una imagen correcta de la relación entre el estado de BES1 y las respuestas de crecimiento. En experimentos sucesivos decidimos entonces hacer un análisis separado para cada órgano de la parte aérea.

Niveles de la proteína BES1 en distintos órganos en respuesta a señales de luz y temperatura

La forma activa de BES1 (dBES1) ingresa al núcleo y desencadena las respuestas transcripcionales (Yin *et al.*, 2002). Para analizar separadamente el estado de BES1 en hipocótilos y cotiledones, utilizamos microscopia confocal para analizar la localización sub-celular de BES1 en plantas que expresan *pBES1:BES1-GFP* (Yin *et al.*, 2002) expuestas a distintos tratamientos de sombra o temperatura. Las imágenes fueron analizadas 4 h después de las transiciones entre condiciones (según el esquema de la Fig. 3).

La sombra mostró efectos opuestos en diferentes órganos, redujo los valores de intensidad de fluorescencia nuclear en los cotiledones y los aumentó en los hipocótilos (Fig. 5A). Además también observamos un aumento de la intensidad en hipocótilos en los tratamientos de 28°C y en aquellos donde se realizó un pasaje de 20° a 28°C, estos datos concuerdan con datos previos encontrados en bibliografía para BZR1 (Ibáñez *et al.*, 2018), mientras que hay una disminución de intensidad de BES1 en cotiledones (Fig. 5B).

Dado que la cantidad total de biomasa en cotiledones es significativamente mayor que en hipocótilos, al usar plántulas enteras se observa mayormente la contribución de los cotiledones y se opaca el proceso que tiene lugar en hipocótilos. Ante estos resultados podemos afirmar que la sombra y la temperatura afectan la acumulación de BES1 en el núcleo, además esos cambios son dependientes del órgano.

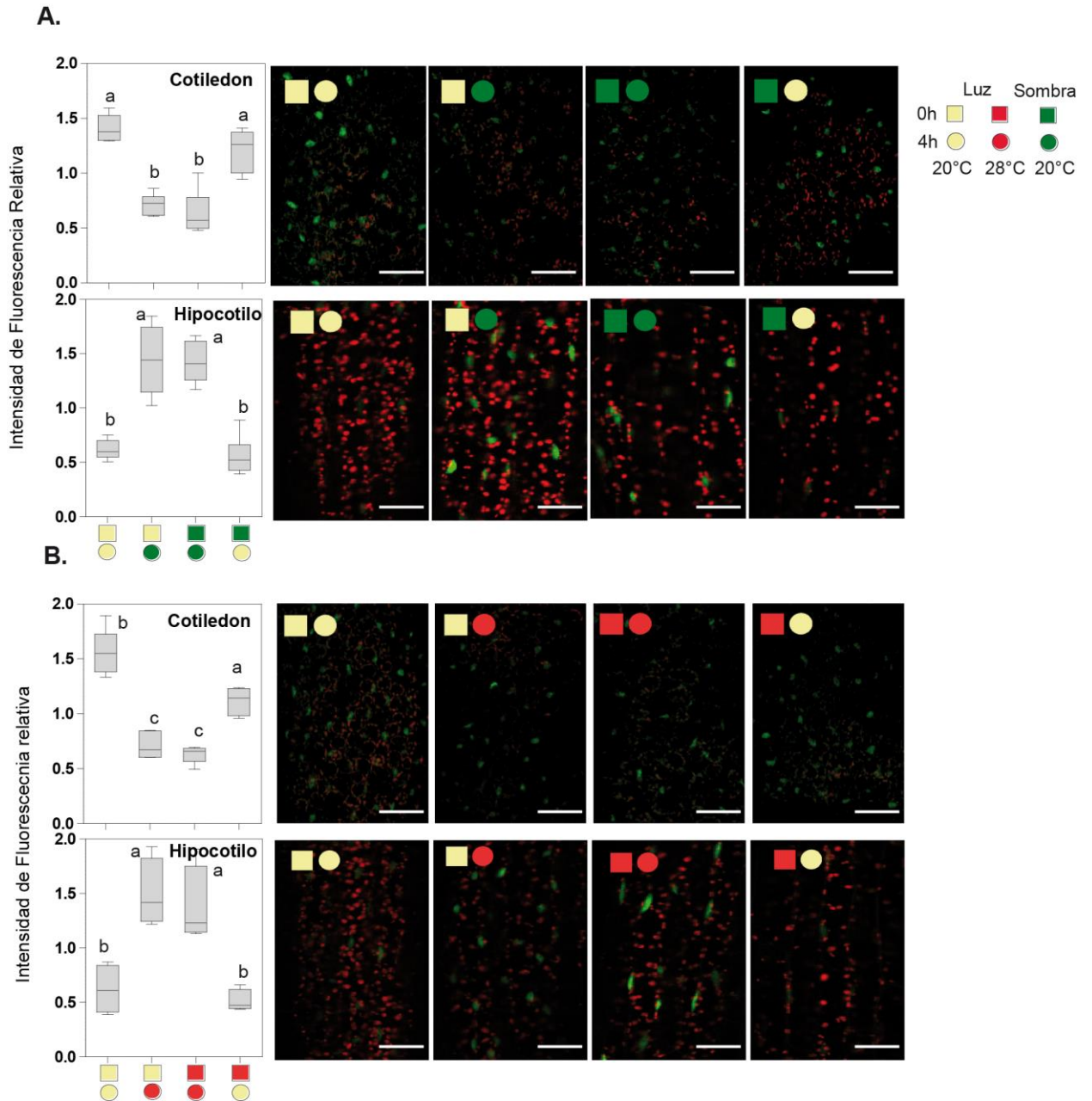


Fig. 5. BES1 se acumula en el núcleo en forma diferencial en cotiledones e hipocótilos ante señales de sombra y temperatura. Intensidad de fluorescencia en núcleos de células del cotiledón e hipocótilo, en plántulas *pBES1:BES1-GFP* crecidas en luz y transferidas sombra (A.) o a 28°C (B.), las mediciones se realizaron a las 4 h de aplicado cada tratamiento. Se grafican *box-plots* de 4-7 experimentos independientes. A la derecha se muestran imágenes representativas de cada uno de los tratamientos. La fluorescencia de la clorofila se muestra en rojo. Barra: 47 μ m. Se indican en cada gráfico las diferencias significativas ($P < 0,05$) con diferentes letras, como resultado de un análisis de ANOVA seguido de la comparación entre medias por medio del test de Bonferroni.

Para corroborar las tendencias observadas en los experimentos de microscopía confocal, utilizamos *B. napus*, por su cercanía filogenética *A. thaliana* y por su ventaja en cuanto tamaño de la plántula, de esta manera pudimos separar con facilidad hipocótilos de cotiledones y evaluar los niveles de BES1 con un anticuerpo nativo contra la proteína de *A. thaliana* que también reconoce al homólogo en *B. napus*. En los *blots* de *B. napus*, pudimos comprobar las tendencias observadas por microscopía confocal, tanto las condiciones de sombra como de temperatura elevada disminuyen la abundancia de ambas isoformas, mientras que en hipocótilos se observa el patrón opuesto (Fig. 6).

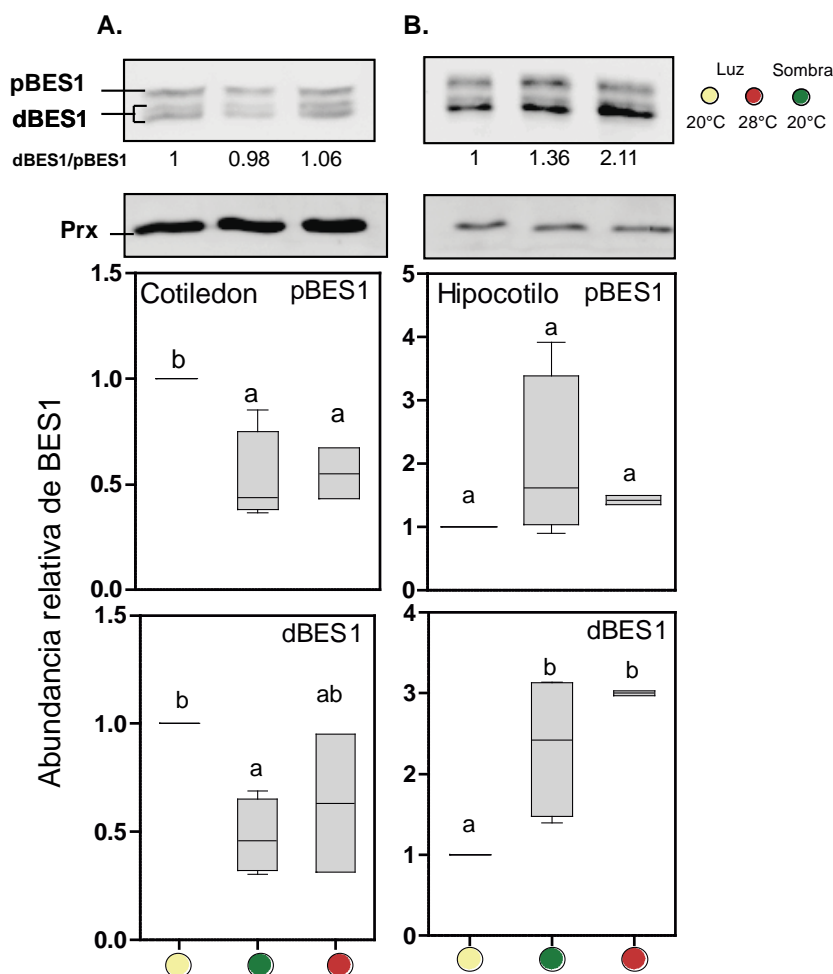


Fig. 6. Cambios en la abundancia de BES1 en cotiledones e hipocótilos de *B. napus* ante tratamientos de sombra y temperatura. Abundancia de las formas fosforilada (pBES1) y de-fosforilada (dBES1) de BES1 en plantas transferidas de luz a sombra o expuesta a altas temperaturas. En cada una de las figuras se muestra las cuantificaciones de 3-4 *blots* de proteínas realizados con muestras independientes de cotiledones (**A**) e hipocótilos (**B**) luego de 4h de tratamiento. En la parte superior se muestran blots representativos de cada uno de los tratamientos. Se indican en cada gráfico las diferencias significativas ($P < 0,05$) con letras, resultado de un análisis de ANOVA seguido de la comparación entre medias por el test de Bonferroni.

El crecimiento de los hipocótilos y cotiledones responden de manera opuesta a señales de sombra y alta temperatura.

Para evaluar si efectivamente las respuestas diferenciales de BES1 en cotiledones e hipocótilos se correlacionan con las respuestas fisiológicas evaluamos el crecimiento de ambos órganos. Para ello se compararon plantas silvestres con diversas líneas que tienen alteraciones en los niveles de BR o en la función de algunos de los intermediarios de la vía de señalización.

En cuanto a los cotiledones, plántulas de genotipo silvestre (Col), sufrieron una reducción en el incremento del área del cotiledón tanto durante la exposición a la sombra como la alta temperatura (Fig. 7). Los mutantes *bri1-301* y *bzr1-1bes1-2* muestran una reducción significativa en el crecimiento del área del cotiledón (Fig. 7), lo que indica que efectivamente la señalización por BR promueve el crecimiento de este órgano. Por el contrario, la línea que sobre expresa el gen *DWF4*, involucrado en la síntesis de BR, aumentó significativamente el crecimiento del área del cotiledón con respecto al genotipo salvaje (Fig. 7), confirmando la relación positiva entre BR y el crecimiento de los cotiledones

Los mutantes de ganancia de función *bes1-1D* y *bzr1-1D*, a pesar de ser caracterizados por una señalización por BR mayor a lo normal, mostraron menor y no mayor área (Fig. 7), al igual que la triple mutante GSK3.

Tomando a los resultados en su conjunto, consideramos que los BR promueven el crecimiento de los cotiledones y que esta respuesta estaría mediada por BZR1 y BES1, como se comprueba en la doble mutante de pérdida de función *bzr1-1bes1-2*, pero cuando las actividades de estos están muy por encima de lo normal, como en *bes1-1D*, *bzr1-1D* y la triple mutante GSK3, niveles supra-óptimos inhiben el crecimiento de los cotiledones.

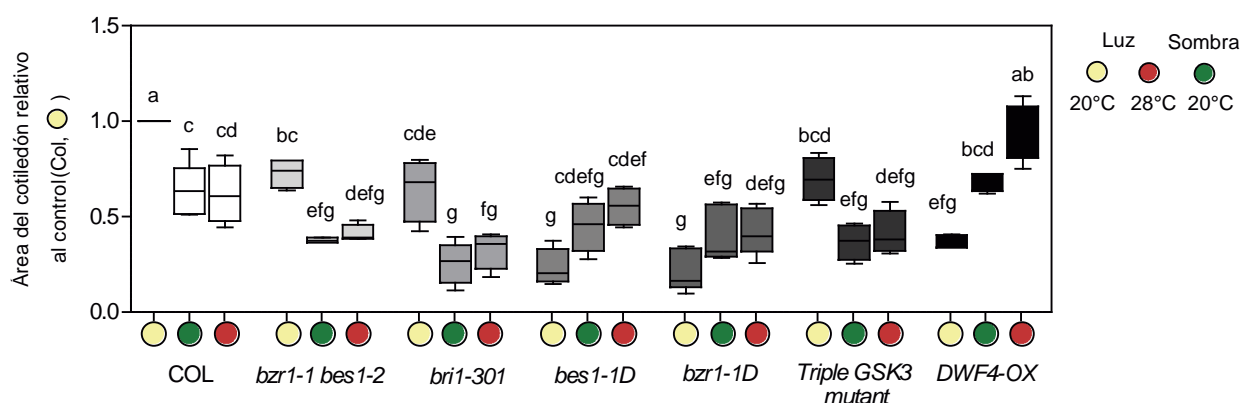


Fig. 7. Crecimiento del área del cotiledón en respuesta a la sombra o temperaturas elevadas. Tasa de crecimiento del área del cotiledón de plantas expuestas a sombra o temperatura, en mutantes de ganancia de función *bes1-1D*, *bzr1-1D* y en mutantes de pérdida de función *bzr1-1bes1-2*, además de *bri1-301*, *DWF4-OX*, *gsk3*, WT. Se grafican *box plot* con medianas, máximos y mínimos de 15-20 plántulas cultivadas en dos experimentos independientes. Se indican en cada gráfico las diferencias significativas ($P < 0,05$) con letras,

resultado de un análisis de ANOVA seguido de la comparación entre medias por el test de Bonferroni.

También analizamos la tasa de crecimiento del hipocótilo relativo al control de luz de los diferentes mutantes de la vía de síntesis, percepción y señalización por BR en tratamientos de sombra o temperatura.

En el genotipo salvaje (COL) tanto la sombra como la alta temperatura indujeron una significativa promoción del crecimiento del hipocótilo comparado con el control en luz blanca y 20°C (Fig. 8). Los mutantes de ganancia de función de los factores de transcripción principales de la vía de señalización por brasinoesteroides, *bes1-1D* y *bzr1-1D*, el mutante triple *gsk3* y el sobre-expresante de una enzima de síntesis de BR, *DWF4-OX*, mostraron efectos aditivos y/o interacciones con determinadas combinaciones de sombra o altas temperaturas (Fig. 8). En todos los casos, estos efectos fueron positivos, indicando que (como era de esperarse) la vía de BR promueve el crecimiento de los hipocótilos. Confirmando este punto, el mutante *bri1-301* y el doble mutante *bzr1-1bes1-2* no respondieron a los tratamientos de sombra o alta temperatura (Fig. 8).

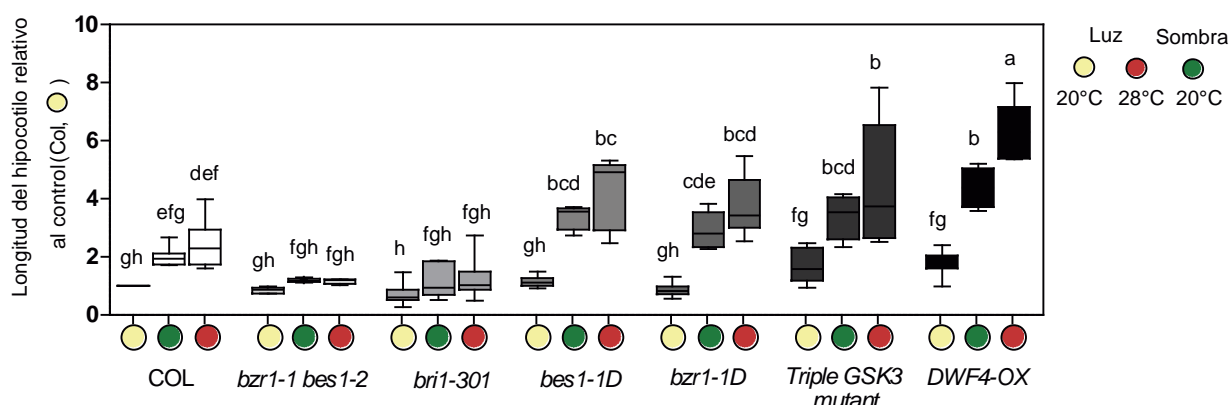


Fig. 8. Crecimiento de los hipocótilos en respuesta a la sombra o alta temperatura. Crecimiento del hipocótilo en plantas expuestas a sombra o temperatura, en mutantes de ganancia de función *bes1-1D*, *bzr1-1D* y mutantes de pérdida de función *bzr1-1bes1-2*, además de *bri1-301*, *DWF4-OX*, *gsk3*, WT. Se grafican box plot con medianas, máximos y mínimos de 70 plántulas cultivadas en 7 experimentos independientes. Se indican en cada gráfico las diferencias significativas ($P < 0,05$) con letras, resultado de un análisis de ANOVA seguido de la comparación entre medias por el test de Bonferroni.

Cambios en la expresión de *BES1* ante tratamientos de sombra y temperatura

Con el objetivo de entender si los posibles efectos de los tratamientos de luz y temperatura sobre los niveles de la proteína *BES1* se deben a un cambio en la expresión de los *BES1*, cosechamos plántulas de genotipo silvestre Col, en las que separaremos cotiledón de hipocótilo y extrajimos ARN para medir mediante PCR cuantitativa su expresión.

En la Fig. 9 podemos observar la expresión de *BES1* ante tratamientos de sombra (A) y temperatura (B). En cotiledones para ambos tratamientos hay una disminución de la expresión de *BES1*, que puede correlacionarse con lo visto anteriormente con la abundancia de la proteína. Por el contrario, en hipocótilos los cambios en la expresión no son significativos. Por lo tanto, los mayores niveles de *BES1* nuclear observados en microscopía confocal (Fig. 5) y en los *blots* con muestras de colza (Fig. 6), se debería a una regulación post-traduccional.

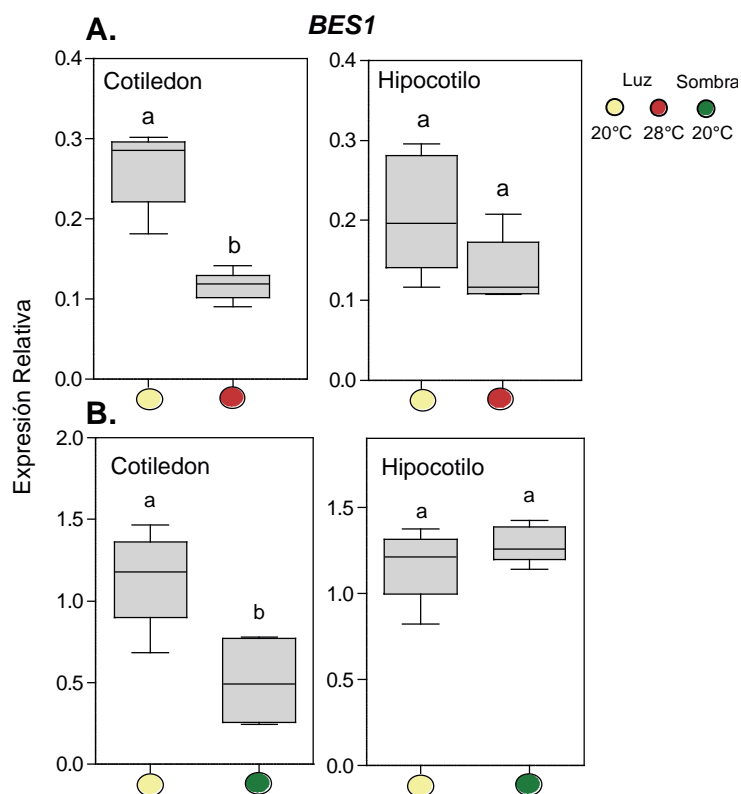


Fig. 9. Expresión *BES1* ante tratamientos de sombra y temperatura. Expresión relativa a *UBQ-2* de en hipocótilos y cotiledones en plántulas WT (COL-0) luego de 4 h de tratamientos sombra y de alta temperatura (28°C). Se grafican medianas, máximo y mínimos de 3 experimentos independientes. Las letras simbolizan la significancia ($p \leq 0.05$) para cada tratamiento, realizada por un análisis de ANOVA de dos vías, seguido por una prueba de medias de Bonferroni.

Contenido de BR en *A. thaliana* y *B. napus* expuestas a sombra y temperatura

Los BR son hormonas esteroideas específicas de plantas, caracterizadas por su estructura de esteroles polihidroxilado. El mantenimiento y la regulación del nivel endógeno de BR es crucial para varias funciones en las plantas (Tanaka *et al.*, 2005). La vía bio-sintética comienza con el campesterol, y se ramifica en tres vías, una de oxidación del C6 temprana, otra tardía y una vía triterpenoidea. Luego convergen en la castesterona que conduce finalmente a la formación del brasinolido (Fujioka *et al.*, 1998).

Con el objetivo de entender si los cambios observado en los diferentes órganos se deben a un cambio en los niveles de brasinoesteroides, a partir de plantas de *A. thaliana* (Fig. 10) y *B. napus* (Fig. 11) cultivadas en la condición control (luz a 20°C) o expuestas a 4 h de tratamientos de sombra o 28°C, se colectaron cotiledones e hipocótilos separadamente, para medir intermediarios y productos finales de la vía bio-sintética en estos órganos. Estas muestras fueron enviadas al laboratorio del Dr. Miroslav Strnad (*Laboratory of Growth Regulators, Institute of Experimental Botany, Czech Republic*) donde se midieron las concentraciones de los diferentes compuestos (Tarkowska *et al.*, 2016).

En la figura 10 podemos observar los resultados de los análisis del contenido de intermediarios de la vía en cotiledón e hipocótilo de *A. thaliana*. Para los principales componentes activos, brasinolido, epibrasinolido y castesterona, solamente esta última presenta una reducción de niveles con los tratamientos de sombra y temperatura en hipocótilos, para los demás intermediarios metabólicos solamente la homocatesterona y el tifasterol, presentan cambio con la sombra, mientras que la dolicoesterona y homodolicoesterona, los presentan con la temperatura. Los cambios detectados son principalmente en hipocótilos, donde parece haber una tendencia a disminuir la concentración de los últimos intermediarios de la vía, mientras que en cotiledones no se observaron cambios significativos, con excepción de una reducción en la catesterona con el tratamiento de temperatura.

En la figura 11 podemos observar los resultados de los análisis del contenido de BR en cotiledón e hipocótilo de *B. napus*. Para los principales componentes activos, se observan cambios significativos en hipocótilos con temperatura en castesterona, mientras que en epibrasinolido con ambos tratamientos. Para los demás intermediarios metabólicos solamente la homocatesterona, presenta cambio con la temperatura, y el tifasterol con ambos tratamientos. En cotiledones podemos observar cambios en el brasinolido, dolicoesterona y tifasterol con temperatura, homocatesterona con sombra y norcatesterona y homodolicoesterona con ambos tratamientos.

Estos resultados nos permiten dos conclusiones importantes. En primer lugar, no observamos ningún compuesto que haya aumentado sus niveles de modo significativo en el hipocótilo o haya reducido sus niveles de modo significativo en los cotiledones, de manera que pueda explicar el aumento de abundancia y localización nuclear de BES1 para el hipocótilo y la reducción de los mismos descrita para los cotiledones (ver Fig. 5 y Fig. 6). Esto es en particular cierto para las consideradas formas activas de los BR (brasinolido, catesterona y epibrasinolido). Por lo tanto, según nuestros resultados, niveles más altos o más bajos de BES1 nuclear no pueden explicarse por niveles respectivamente más altos o más bajos de BR. En segundo lugar, la biosíntesis de la BR es controlada por un mecanismo de retroalimentación negativa, en que BES1 y BZR1 reducen la expresión de genes biosintéticos claves de BR, como *CPD* y *DWF4* (genes que codifican enzimas hidroxilasas importantes para la biosíntesis) (Sun *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011). Todos los cambios estadísticamente significativos (por ejemplo, catesterona en hipocótilo en *A. thaliana*, homodolicoesterona en cotiledones en *B. napus*) puede explicarse, en principio, por este mecanismo de retroalimentación negativa porque anti-correlacionan con los cambios en BES1.

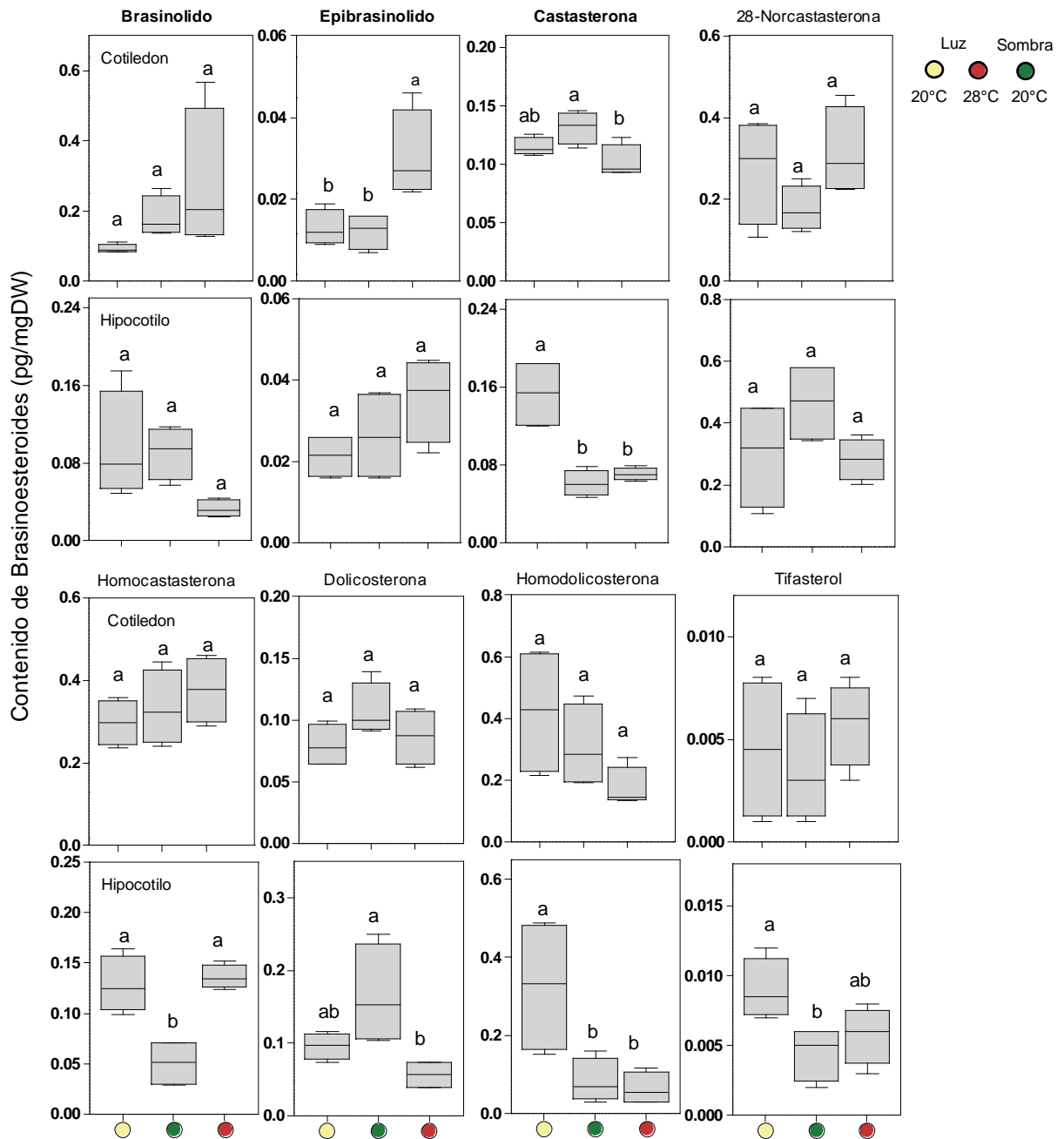


Fig. 10. Contenido de BR en plantas de *A. thaliana* expuestas a sombra y temperatura. Concentración de hormonas principales e intermediarios hormonales de la vía de BR en hipocótilos y cotiledones. Se grafican medianas, máximos y mínimos para 4 experimentos independientes. Las letras simbolizan aquellas medias significativas ($p \leq 0.05$), obtenidas mediante un análisis de ANOVA de dos vías, seguido de una prueba de Bonferroni.

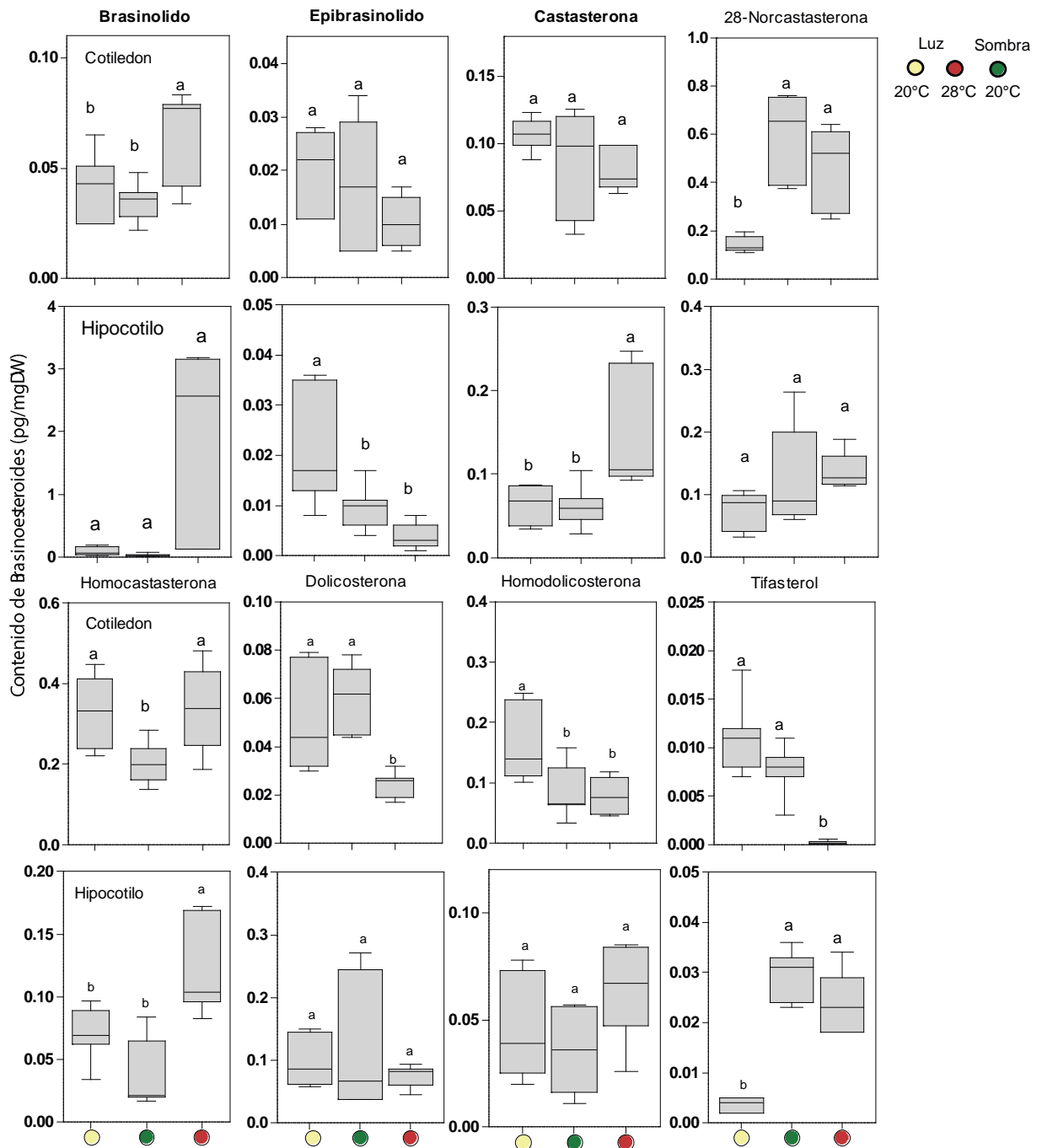


Fig. 11. Contenido de BR en plantas de *B. napus* expuestas a sombra y temperatura. Concentración de hormonas principales e intermediarios hormonales de la vía de BR en hipocótilos y cotiledones. Se grafican medianas, máximos y mínimos para 6 experimentos independientes. Las letras simbolizan aquellas medias significativas ($p \leq 0.05$), obtenidas mediante un análisis de ANOVA de dos vías, seguido de una prueba de Bonferroni. En negrita los compuestos activos.

Dinámica de COP1, PIF4, RGA y DR5 en cotiledón, ante tratamientos de sombra o temperatura

Dado que BES1 muestra un comportamiento diferencial en hipocótilos y cotiledones, analizamos en cotiledones el comportamiento de dos proteínas que han sido caracterizadas en hipocótilos para saber si también tienen un patrón diferencial. Con sombra o altas temperaturas, en el hipocótilo COP1 aumenta su abundancia nuclear (Pacin *et al.*, 2016) y RGA la reduce (Stavang *et al.*, 2009). Como controles positivos utilizamos PIF4 y DR5-VENUS porque se sabe que tanto la proteína PIF4 como la señalización por auxinas aumentan tanto en hipocótilo como en cotiledones en respuesta a sombra o altas temperaturas. Para ello las plantas fueron crecidas por cuatro días en luz y 20°C y luego transferidas a los diferentes tratamientos de sombra o temperatura, las imágenes fueron tomadas, luego de 4 h en los respectivos tratamientos.

COP1 es una E3 ligasa de ubiquitina que marca a varias proteínas involucradas en la fotomorfogénesis para su degradación en el proteasoma 26S. Por estudios previos de nuestro grupo se sabe que COP1 aumenta en hipocótilos en condiciones de sombra y temperatura. En la figura 12A podemos ver que también aumenta su abundancia con estos tratamientos en cotiledones.

De la misma manera ocurre con PIF4. PIF4 es compartido por las respuestas de crecimiento a la luz y la temperatura. La estabilidad de la proteína PIF4 aumenta con la sombra (Lorrain *et al.*, 2008) o temperaturas elevadas (Foreman *et al.*, 2011) en hipocótilos, y también en cotiledones (Fig. 12B).

Las proteínas DELLA inhiben la actividad transcripcional de PIF4 mediante su unión a los dominios de reconocimiento de ADN de este factor de transcripción, así se identificó el vínculo entre la luz y la señalización de giberelina en la regulación del crecimiento del hipocótilo (De Lucas *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008). También se informó recientemente que las proteínas DELLA promueven la degradación de los PIF en el sistema ubiquitina-proteasoma a través de una ligasa E3 desconocida (Li *et al.*, 2016). Además de ello, las proteínas DELLA, como GAI inactivan la actividad reguladora de la transcripción de BZR1, al inhibir la capacidad de BZR1 para unirse a los promotores diana (Gallego-Bartolome *et al.*, 2012). La abundancia de proteínas DELLA, como RGA, en hipocótilos, se reduce por la sombra (Djakovic-Petrovic *et al.*, 2007) y las altas temperaturas (Stavang *et al.*, 2009), lo que contribuye a la liberación de PIF4. Sorprendentemente en cotiledones no parece cambiar la abundancia de RGA con los tratamientos de sombra y temperatura (Fig. 12C), por lo que la señalización por giberelinas podría no estar regulando el crecimiento del cotiledón.

Por otra parte las auxinas son esenciales para el crecimiento de hipocótilo en respuesta a la sombra (Tao *et al.*, 2008) y temperaturas cálidas (Gray *et al.*, 1998). Los PIF modulan la expresión de varios genes relacionados con la auxina y desempeñan un papel central en el control de la síntesis de la auxina (de Lucas y Prat, 2014). DR5-VENUS es un marcador de la señalización de auxinas y podemos observar que en cotiledones también aumenta su abundancia en respuesta a la sombra y a la temperatura (Fig. 12D).

Como podemos observar las diferentes proteínas involucradas en la señalización por sombra y temperatura pueden tener comportamientos

diferentes en cotiledones e hipocótilos (como el caso de RGA), o comportarse de igual manera en ambos órganos. Teniendo en cuenta las interacciones reportadas para COP1 y PIF4 con BZR1 (Wang *et al.*, 2012, Bernardo-García *et al.*, 2014, Kim *et al.*, 2014), nos preguntamos si estos podían afectar de algún modo la dinámica de BES1.

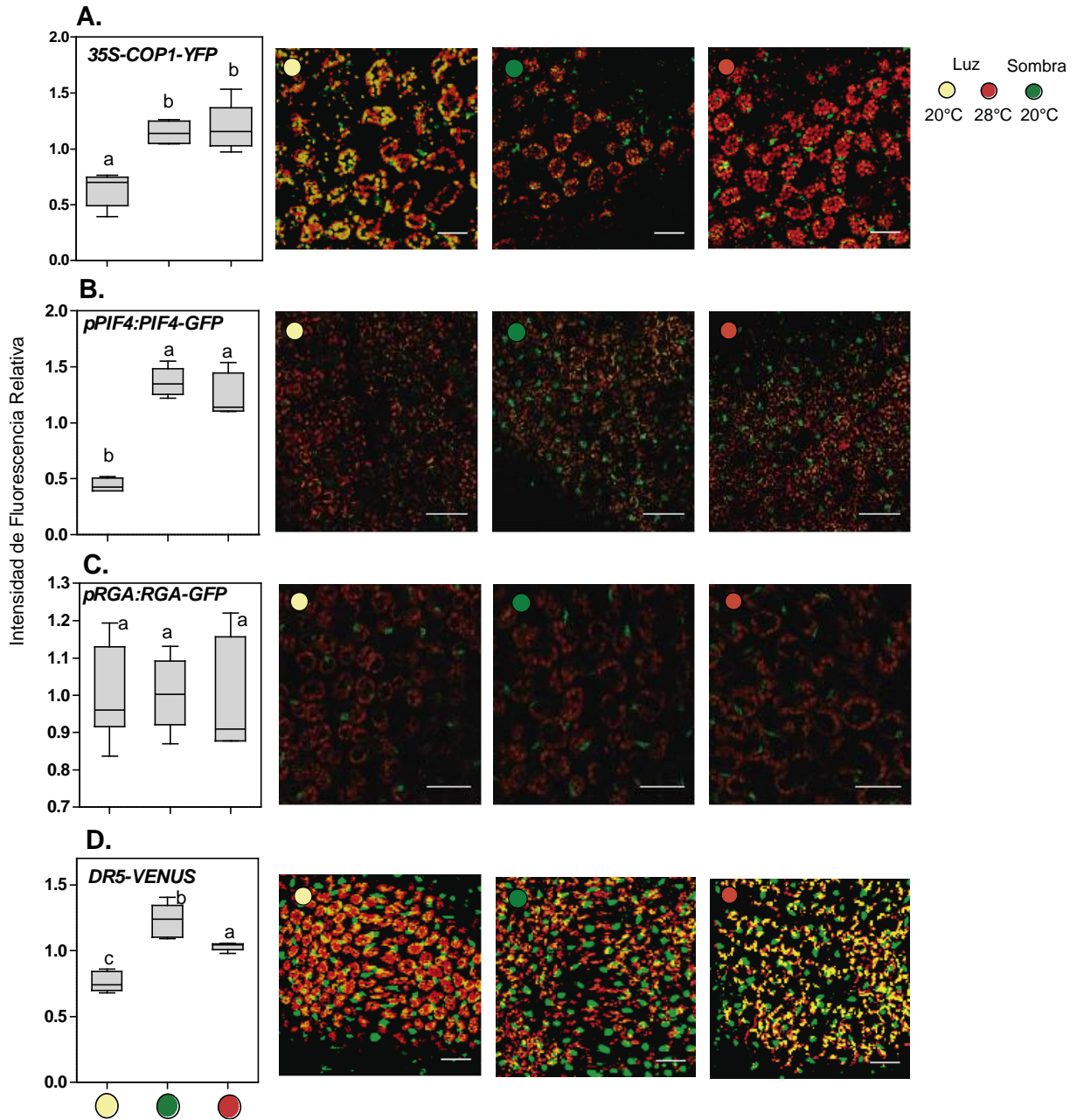


Fig. 12. Cambios en la intensidad nuclear de COP1, PIF4, RGA y DR5 en cotiledones ante tratamientos de sombra y temperatura. Intensidad de fluorescencia de núcleos en plántulas *35S:COP1-YFP* (A), *pPIF4:PIF4-GFP* (B), *pRGA:RGA-GFP* (C) y *DR5-VENUS* (D), crecidas en luz y transferidas sombra o altas temperaturas (28°C), las mediciones se realizaron a las 4hs de aplicado cada tratamiento. Se grafican medianas, máximos y mínimos de 2-3 experimentos independientes. En la parte derecha muestran imágenes representativas de cada uno de los tratamientos. La fluorescencia de la clorofila se muestra en rojo. Barra: 47 μm. Se indican en cada gráfico los términos

estadísticamente significativos ($P < 0,05$) con letras diferentes, resultado de una análisis de ANOVA, seguido de una prueba de medias de Bonferroni.

COP1 modifica la abundancia de BES1 en diferentes órganos ante tratamientos de sombra y temperatura

COP1 interacciona con BZR1 (homólogo a BES1) en oscuridad, regulando su estabilidad, de manera tal que un desacoplamiento en la degradación de BZR1 puede causar la expresión de genes regulados corriente abajo (Kim *et al.*, 2014). Para evaluar su influencia sobre BES1, y los posibles cambios en la dinámica y abundancia nuclear, se realizaron cruza de plantas transgénicas *pBES1:BES1-GFP*, con el mutante de pérdida de función *cop1-4*.

Como podemos observar en la Fig. 13, en ambos órganos medidos se observan cambios en la intensidad de fluorescencia de BES1. En cotiledones en un contexto mutante *cop1-4* la abundancia nuclear de BES1 aumentó significativamente en los tratamientos de sombra y temperatura. Por otro lado en hipocótilos también se ve afectada la intensidad de fluorescencia de BES1, pero con una disminución con respecto a la línea transgénica, es decir que los tratamientos no producen cambios en BES1 cuando tenemos mutado *cop1-4*, por lo cual parecería estar regulando positivamente a BES1.

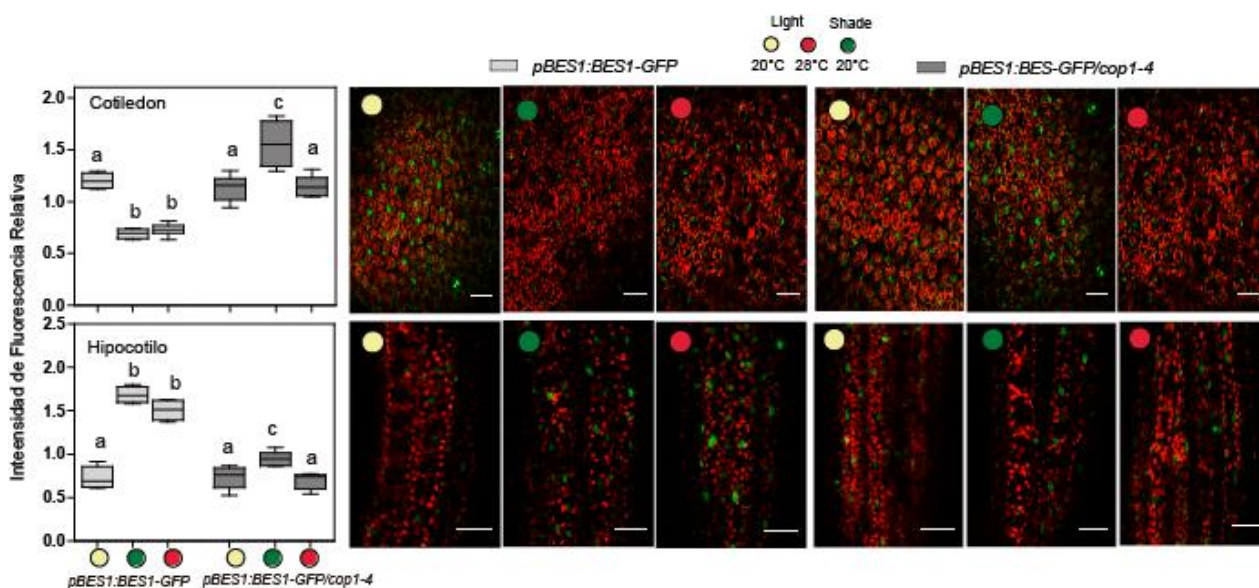


Fig. 13. Cambios en la intensidad nuclear de *pBES1:BES1-GFP* en fondo *cop1-4*. Intensidad de fluorescencia de núcleos de células del cotiledón (A) e hipocótilo (B), en plántulas *pBES1:BES1-GFP* y *pBES1:BES1-GFP/cop1-4* crecidas en luz y transferidas sombra y altas temperaturas (28°C), las mediciones se realizaron a las 4 h de aplicado cada tratamiento. Se grafican *box plots* de medianas, máximos y mínimos de 2 experimentos independientes. Al costado se muestran imágenes representativas de cada uno de los tratamientos. La fluorescencia de la clorofila se muestra en rojo. Barra: 47 μm. Se indican en cada gráfico los términos estadísticamente significativos ($P < 0,05$), en letras diferencias entre los tratamientos y con asteriscos, las diferencias entre genotipos resultado de un análisis de ANOVA, seguido de prueba de medias de Bonferroni

Estos resultados evidencian que la actividad de COP1 es necesaria para la regulación de la actividad de BES1 ante la sombra y el aumento de temperatura. Esta regulación tiene efectos opuestos en los órganos: mientras que la abundancia de BES1 en el núcleo de las células de los cotiledones es regulada negativamente por COP1, en hipocótilos es regulada positivamente

PIF4 afecta la estabilidad de BES1 en diferentes órganos en respuesta a sombra y temperatura.

Para evaluar posibles cambios en la abundancia de BES1 asociados a la presencia de PIF4, se realizó la cruce de plantas *pBES1:BES1-GFP* con plantas mutantes por pérdida de función *pif4*, las plantas resultantes fueron estudiadas mediante microscopia confocal.

En la Fig. 14 se puede observar que en el fondo *pif4* en cotiledones no cae la fluorescencia nuclear asociada a *pBES1:BES1-GFP* con los tratamientos de sombra y temperatura. En hipocótilos en el fondo *pif4* la fluorescencia asociada a *pBES1:BES1-GFP* es alta en el control de luz a 20°C y ya no sube ni con sombra ni con temperaturas elevadas.

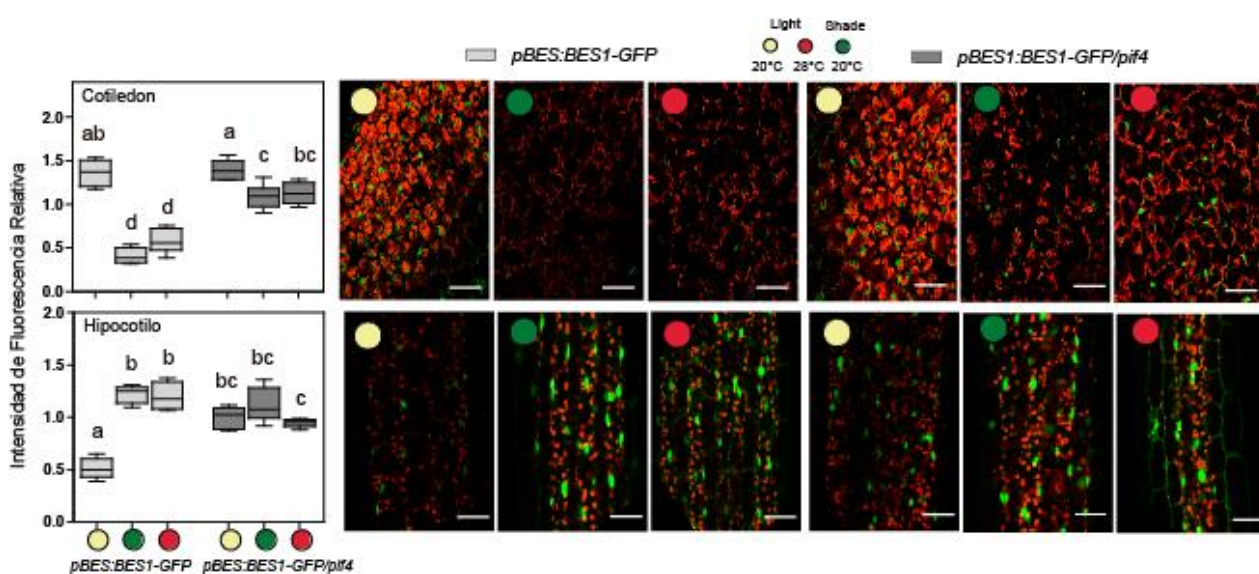


Fig. 14. Cambios en la intensidad nuclear de *pBES1:BES1-GFP* en fondo *pif4-101*. Intensidad de fluorescencia de núcleos de células del cotiledón (A) e hipocótilo (B), en plántulas *pBES1:BES1-GFP* y *pBES1:BES1-GFP/pif4-101* crecidas en luz y transferidas sombra o altas temperaturas (28°C), las mediciones se realizaron a las 4 h de aplicado cada tratamiento. Se grafican *box plots* con medianas, máximos y mínimos de 2 experimentos independientes. Al costado se muestran imágenes representativas de cada uno de los tratamientos. La fluorescencia de la clorofila se muestra en rojo. Barra: 47 μm. Se indican en cada gráfico los términos estadísticamente significativos (P < 0,05), en letras diferencias entre los tratamientos y con asteriscos, las diferencias entre genotipos resultado de un análisis de ANOVA, seguido de prueba de medias de Bonferroni.

DISCUSIÓN

BES1 cambia su abundancia con la sombra y la temperatura con un patrón dependiente del órgano.

En esta tesis nos centramos en conocer la dinámica del factor de transcripción BES1 en respuesta a la sombra o temperatura elevada, tratamientos que reducen la actividad de los fitocromos y promueven procesos de crecimiento celular diferencial en distintas partes de la planta. Los resultados del análisis mediante *blots* de proteínas con un anticuerpo específico para BES1 y microscopía confocal sobre una línea que expresa BES1 fusionado a GFP bajo el control de su promotor endógeno, efectivamente muestran que BES1 es afectado en su abundancia y distribución sub-celular frente a los tratamientos de temperatura y sombra.

Tanto la forma fosforilada como la de-fosforilada de la proteína BES1, disminuyen en plantas enteras cuanto mayor es el tiempo en sombra. Por otro lado, para los tratamientos de temperatura no observamos cambios estadísticamente significativos (Fig. 4). Este último resultado concuerda con los informados en la literatura (Stavang et al. 2009), basados en plantas expuestas a 28°C durante 4 h y hasta 5 días, en los que tampoco se observaron cambios significativos en las isoformas de BES1 de plantas 35S:BES1-GFP, crecidas en luz continua, comparadas con los controles a 28°C.

Dado que BES1 es un importante factor de transcripción implicado en el crecimiento y en la elongación celular, su disminución con la sombra no concuerda con su función esperada, y por lo tanto resultó sorprendente. Los BR en general y BES1 en particular ya habían sido implicados en las respuestas del hipocótilo a señales de plantas vecinas (Luccioni *et al.*, 2002, Legris *et al.*, 2016; Kozuka *et al.*, 2010; Keuskamp *et al.*, 2011). Por otro lado, estudios recientes demuestran que BES1 aumenta su abundancia en *blots* de plantas Col expuestas a 28°C, crecidas en fotoperiodo de día corto (Martínez *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta estos resultados no del todo esperados, decidimos realizar estudios de microscopía confocal para entender si los cambios observados en los *blots* de proteína se pueden deber a una regulación diferencial entre órganos aéreos.

En este contexto, los ensayos de microscopía aportaron información valiosa. En efecto, observamos que la temperatura y el nivel de sombreado afectan la abundancia nuclear de BES1 de forma dependiente del órgano (Fig. 5). En cotiledones la abundancia de *pBES1:BES1:GFP* disminuye mientras que en hipocótilos aumenta tanto con sombra como con altas temperaturas. Sabiendo que la isoforma activa es la que se acumula en el núcleo (Ryu *et al.*, 2010), estos resultados sugieren que, ante sombra y el aumento de temperatura, BES1 activo se acumula en el hipocótilo y así promovería su crecimiento a través de la activación de genes involucrados en expansión celular. Por el contrario, en los cotiledones la abundancia de BES1 activo disminuye, y esto podría ser una de las causas de la menor área de los mismos en condiciones de sombreado.

Para evaluar si los resultados observados mediante microscopía confocal se deben al menos en parte a cambios en abundancia total de proteína BES1, o son

predominantemente causados por una partición nucleo-citoplásmica diferencial, realizamos blots de proteína BES1 en *B. napus*. Esta especie ha sido utilizada en otros estudios para complementar la información obtenida en *A. thaliana*, dado el parentesco entre ambas especies y el mayor tamaño en colza (Procko *et al.*, 2014). Pudimos observar cambios significativos en la acumulación de la proteína BES1 (Fig. 6), y en particular de la forma activa de BES1 (dBES1), que permiten explicar al menos en parte los efectos de los tratamientos de temperatura y sombra sobre la abundancia nuclear.

Los experimentos fisiológicos de medición de tasa de crecimiento en cotiledones e hipocótilos (Fig. 7 y 8) son en principio consistentes con la idea que la actividad de BES1 es mayor en el núcleo de las células del hipocótilo para promover el crecimiento de este órgano y más baja en los cotiledones para reducir el crecimiento de este último, en ambos casos cuando las plantas pasan de condición control a sombra o temperaturas elevadas. Los hipocótilos de los mutantes que reducen la señalización por BR vieron reducido su tasa de crecimiento (*bri1-301* y *bzr1-1bes1-2*), mientras que las líneas que aumentan la señalización por BR (los mutantes de ganancia de función *bes1-D*, *bzr1-D*, el triple mutante *gsk3* que aumenta los niveles de BES1 y BZR1 y la transgénica *DWF4OX*) en aumentada su tasa de crecimiento particularmente en condiciones de sombra o alta temperatura. Los cotiledones de los mutantes de pérdida de función vinculados a BR también vieron reducido su tasa de crecimiento (*bri1-301* y *bzr1-1bes1-2*) mientras *DWF4OX* la aumentó. Sin embargo, los mutantes de ganancia de función de BES1 y BZR1 redujeron la expansión de los cotiledones, sugiriendo que habría un óptimo de actividad de BES1 y BZR1, por encima o por debajo del cual se reduciría el crecimiento,

Los resultados de esta tesis son los primeros en reportar cambios en la abundancia de BES1 en sombra y que este cambio es dependiente del órgano.

Efectos de las condiciones de sombra y altas temperaturas sobre los niveles de BR

Para entender si los cambios de abundancia de BES1 observados se deben a un aumento de la síntesis de BR en el hipocótilo y/o una disminución de la síntesis de BR en los cotiledones, realizamos mediciones de los niveles de BR y de los principales precursores de en la vía de síntesis (Fig. 10 y 11). Se observaron disminuciones en los niveles de diferentes compuestos, activos e intermediarios, en hipocótilos. En cotiledones no parece haber cambios sustanciales con los tratamientos de sombra y temperatura. Esto nos permite concluir que los cambios en abundancia nuclear de BES1 no se deben a un efecto por la vía canónica de BR. Si este fuera el caso, los BR activos deberían haber elevado su nivel en el hipocótilo y reducir su nivel en los cotiledones de plantas expuestas a sombra o altas temperaturas, y ninguna de estos patrones concuerda con el observado. Los bajos niveles de BR en hipocótilo pueden deberse al bucle de regulación por retroalimentación de biosíntesis de BR (Tanaka *et al.*, 2005), ya que BES1 regula negativamente muchos genes que codifican enzimas que intervienen en las reacciones de biosíntesis de

castesterona a brasinolido, y que cuando BES1 está activo reprime la síntesis de dichos genes.

BES1 cambia su expresión con sombra y temperatura

Es interesante notar que al medir la expresión de *BES1* (Fig. 9), observamos que esta disminuye en el cotiledón y se mantiene sin mayores cambios en los hipocótilos de plantas tratadas con sombra y altas temperaturas. En este caso, la disminución de la proteína activa BES1 en cotiledón podría explicarse al menos parcialmente por una disminución en la expresión del gen que la codifica. La expresión de BES1 es regulada positivamente y de manera directa por BES1 (Guo *et al.*, 2013), sugiriendo que también la expresión de BES podría ser consecuencia de una caída en la abundancia de su proteína. En cambio, el aumento de BES1 en hipocótilo no es consecuencia de un aumento directo en su expresión génica. Es posible que sea consecuencia de un aumento en la estabilidad proteica de BES1.

BES1 es regulado por COP1 y PIF4 en sombra y temperatura.

En este trabajo se encontró que la abundancia de BES1 es regulada por al menos dos proteínas: COP1 y PIF4 (Fig. 13 y 14). COP1 es una E3 ligasa que marca para degradación diferentes proteínas, regulando negativamente a proteínas involucradas en el crecimiento. Se sabe que COP1 se acumula en sombra (Pacin *et al.*, 2013) y temperatura elevada (Park *et al.*, 2017) en el núcleo, y que en estudios realizados con BZR1, COP1 degrada a la forma inactiva de BZR1, liberando a la forma activa para estimular la expresión de los genes de respuesta a BR en oscuridad (Kim *et al.*, 2014). Estos antecedentes sugieren que COP1 podría interactuar con BES1 marcándolo para la degradación en proteasoma en los cotiledones.

Los resultados de los experimentos de microscopia confocal con plantas *pBES1BES1-GFP* en fondo *cop1-4*, indican un cambio del modo de acción de COP1 en cotiledones e hipocótilos. Frente al aumento de temperatura y sombra, COP1 parece actuar como represor de BES1 en cotiledones, mientras que en hipocótilos actúa como un activador. Dada la naturaleza de COP1, la represión de BES1 en cotiledones podría ser una consecuencia directa de la interacción COP1-BES1, como se argumenta en el párrafo previo. En hipocótilos, COP1 podría estar activando indirectamente a BES1 mediante la degradación de un inhibidor. Recientemente se ha descrito que la proteína SINAT (SINA de *Arabidopsis thaliana*) interactúa específicamente con la forma dBES1 y media su ubiquitinación y degradación. Los datos genéticos demostraron que las proteínas SINAT inhiben la señalización de BR de una manera dependiente de BES1 (Yang *et al.*, 2017). Puede ser que el aumento en la actividad de BES1 en hipocótilo ocurra por inhibición de un inhibidor, como por ejemplo de SINAT. En efecto, hay antecedentes de sistemas que usan un tándem de E3 ligasas como mecanismo de regulación (Casal, 2016).

Los BRs tienen una estrecha relación con PIF4. Estudios recientes indican que BES1 interactúa con PIF4 y como resultado cambia la especificidad de unión

del reconocimiento de ADN de BES1 del motivo 5'-CATGTC-3', previamente identificado como un elemento de unión a PIF (PBE) (Martínez *et al.*, 2018). La regulación combinatoria de PIF4 y BES1 es responsable de la expresión conjunta de múltiples loci. Incluso, BES1 reprime genes de la vía de BRs en presencia de luz pero en oscuridad forma un heterodímero con PIF4, lo cual hace que BES1 cambie de función y active la expresión de esos mismos genes. La sombra y la temperatura provocan una mayor actividad de PIF4, que se traduce en la activación directa de la expresión de genes de biosíntesis de auxinas, promoviendo su expresión y abundancia (Lorrain *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012, Koini *et al.*, 2009; Stavang *et al.*, 2009). Por esos motivos, nos pareció interesante evaluar si PIF4 afectaba de algún modo la abundancia de BES1. Efectivamente, observamos que ya sea en la condición control o las de sombra o alta temperatura, la abundancia nuclear de BES1 aumenta en el fondo *pif4*. Esto indica que PIF4 es un regulador negativo de la abundancia de BES1. Los mecanismos de esta regulación son aún desconocidos. Esto indica que el rol de PIF4 no está limitado a interactuar con BES1 para activar la transcripción de genes sino que además controlar su abundancia.

Los PIF promueven la degradación de HY5 mediante COP1, actuando por tanto como potenciales cofactores del complejo COP1/SPA. PIF1 en efecto se asocia in vivo con COP1, SPA1 y HY5, y aumenta la afinidad de COP1 y HY5, promoviendo la autoubiquitinación de COP1 y la ubiquitinación de HY5. Esto sugeriría que los PIFs actúan como cofactores integrales del complejo COP1/SPA, y posiblemente estén involucrados en el reclutamiento específico de sustratos de ubiquitinación (Xu *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta estos datos de literatura y de acuerdo a nuestros resultados (en especial el efecto del fondo mutante en cotiledones, donde no genera una reversión completa del fenotipo), PIF4 afecta negativamente a BES1 en ambos órganos, desconocemos aún el mecanismo por el cual ocurre esta regulación pero podría ser que los PIFs puedan aumentar la actividad E3 ligasa de COP1, favoreciendo así su regulación negativa de BES1.

Las respuestas morfogénicas de las plantas ante señales ambientales, dependen de la integración de las señales hormonales

El desarrollo de las plantas depende fuertemente de las condiciones ambientales. Estudios clásicos remarcan la capacidad de adaptación de las plantas a su ambiente y la gran plasticidad de *Arabidopsis* a un amplio rango de temperaturas e iluminaciones. Se ha descrito a las auxinas como las principales hormonas que median estas respuestas, sin embargo se sabe que hay múltiples regulaciones donde participan otras fitohormonas, por medio de mecanismos complejos que las plantas han desarrollado a lo largo de la evolución. En los casi 40 años desde el descubrimiento de los brasinoesteroides como la sexta clase de hormonas vegetales, se ha hecho un esfuerzo continuo para dilucidar su papel en los múltiples aspectos de la fisiología vegetal. Se sabe que las BR influyen en varios procesos biológicos, como el crecimiento, el metabolismo de las proteínas, el transporte y la señalización celulares, la biosíntesis de la pared celular, la formación de componentes de cromatina y citoesqueleto, el cierre estomático y las respuestas ambientales. Los BR regulan miles de genes,

aunque no está tan claro qué otros factores de transcripción y proteínas de señalización interactúan con BZR1 y BES1 en la homeostasis de las plantas. En esta tesis encontramos que BES1 cumple un rol central en las respuestas ante sombra y el aumento de temperatura.

Es interesante explorar el papel de la vía de señalización de BR, las interacciones hormonales y las interferencias en los niveles de órganos, tejidos y células para comprender mejor cómo responden las plantas a las tensiones ambientales. De acuerdo a nuestros resultados BES1 estaría implicado en la regulación fina del crecimiento ante condiciones de sombra u elevadas temperaturas, regulando positiva o negativamente el crecimiento de los órganos. Se sabe que la principal respuesta ante estas condiciones ambientales, es la elongación del hipocótilo, a expensas de los cotiledones, en esta tesis, reportamos como la vía de brasinoesteroides, a través de BES1, estaría implicada en este mecanismo; por un lado aumentando la abundancia de BES1 en hipocótilos y reduciéndola en cotiledones, y de esta manera pudiendo posiblemente reforzar la vía de auxinas. Aunque todavía no comprendemos como sería el mecanismo de esta regulación fina, podemos decir que COP1 y PIF4 parecería actuar de forma directa, o por interacciones con otras proteínas, para inhibir al regulador del crecimiento BES1 en cotiledones, de esta manera reducir u inhibir su crecimiento, mientras que PIF4 en hipocótilos, parece mantener a BES1 en un estado basal y COP1 favorece su acumulación posiblemente inhibiendo a los reguladores negativos de BES1, para así contribuir a la elongación de este órgano.

Es importante destacar que la planta recurre a los mismos reguladores de la señalización para actuar de modo diferente de acuerdo a la respuesta de crecimiento que necesita ante los cambios ambientales. Cuanto más fuerte sea la entrada de irradiación, mayor será la temperatura del suelo y los tejidos de las plantas. Aunque una fuerte entrada de luz inhibe el crecimiento del hipocotilo, este efecto se equilibraría con las temperaturas cálidas, lo que favorecería que los hipocótilos sean más largos, pudiendo ayudar a alejar los tejidos apicales sensibles del suelo, donde las temperaturas son elevadas. La hiponastia de la hoja reduciría la incidencia de la radiación solar del mediodía y también mejora la ventilación de las hojas y la transpiración, dos factores que reducen la temperatura. Esta manera de regular, en estadios tempranos, el crecimiento puede ser una característica evolutiva que tienen las plantas para sobrevivir ante estos ambientes cambiantes, para luego invertir sus reservas en la floración y fructificación, y así asegurarse la descendencia. Conocer estos mecanismos en detalle, la variabilidad genética y el impacto de la sombra y elevadas temperaturas en otras plantas de interés agronómico nos permitirá asegurar que la productividad de las plantas responda a las nuevas necesidades planteadas ante el cambio climático global.

CONCLUSIONES

En esta tesis se planteó como objetivo general investigar cómo las señales de sombra y/o temperatura pueden afectar componentes que actúan aguas debajo de la percepción de BR y sobre su biosíntesis. Para ello se usaron aproximaciones de fisiología, y biología molecular. Los resultados muestran una regulación diferencial en hipocótilos y cotiledones de BES1. Esto coincide con la fisiología de las plantas, ya que ambos órganos se comportan diferente: los hipocótilos aumentan y los cotiledones disminuyen el crecimiento en respuesta a mayores temperaturas y sombra.

La sombra y la temperatura promueven que BES1 se acumule en núcleos de células del hipocótilo, pudiendo activar la transcripción de genes involucrados en el crecimiento. Este aumento en la abundancia de BES1 no ocurre por un aumento en la transcripción del gen que la codifica, lo cual indica una posible regulación postranscripcional que estabilice a la proteína e induzca su acumulación. COP1 y PIF4 parecen regular la actividad de BES1, pudiendo marcar para degradación a reguladores negativos de BES1, en el caso de COP1, o interaccionando de forma directa para promover la transcripción de genes del crecimiento.

En células de cotiledón, la sombra y la temperatura reducen la abundancia de BES1, esto también puede ser regulado por COP1, en este caso de forma directa, pudiendo marcar para su degradación por el proteosoma a BES1. Por otro lado PIF4 también regula negativamente a BES1, por mecanismos no establecidos.

Los resultados resaltan el rol de BES1 como intermediario entre las claves del ambiente y la regulación diferencial del crecimiento de diversos órganos del vástago aéreo, de manera de alcanzar una morfología más adecuada para reducir las probabilidades de exposición a sombra y altas temperaturas. .

Referencias bibliográficas

- Achard, P., Liao, L., Jiang, C., Desnos, T., Bartlett, J., Fu, X. and Harberd, N.P. (2007) DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiol.* 143, 1163–1172.
- Bai, M. Y., Shang, J. X., Oh, E., Fan, M., Bai, Y., Zentella, R., ... & Wang, Z. Y. (2012). Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in Arabidopsis. *Nature Cell Biology*, 14(8), 810-817.
- Belkhadir, Y., and Jaillais, Y. (2015). The molecular circuitry of brassinosteroid signaling. *New Phytol.* 206, 522–540. doi: 10.1111/nph.13269
- Bernardo-García S. de Lucas M., Martínez C., Espinosa-Ruiz A., Davière J.M., Prat S. (2014). BR-dependent phosphorylation modulates PIF4 transcriptional activity and shapes diurnal hypocotyl growth. *Genes Dev.* 2014; 28: 1681-1694
- 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
- Campbell, G. y Norman, J. (1998) Una introducción a la biofísica ambiental, 2ª ed. Nueva York : Springer - Verlag Nueva York, inc.
- Caño-Delgado, A., Yin, Y., Yu, C., Vafeados, D., Mora-Garcia, S., Cheng, J. C., et al. (2004). BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in Arabidopsis. *Development* 131, 5341–5351. doi: 10.1242/dev.01403
- Casal, J. J. (2013). Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. *Annual review of plant biology*, 64, 403-427.
- Casal, J.J. (2012) Shade avoidance. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 10. doi: 0110.1199/tab.0157.
- Choe, S., Fujioka, S., Noguchi, T., Takatsuto, S., Yoshida, S., & Feldmann, K. A. (2001). Overexpression of DWARF4 in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 26(6), 573-582.
- Clouse, S. D., and Sasse, J. M. (1998). Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 49, 427–451. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.427
- 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.
- de Lucas, M. and Prat, S. (2014) PIFs get BRright: PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS as integrators of light and hormonal signals. *New Phytol.* 202, 1126–1141.
- De Lucas, M., Davière, J.-M., Rodríguez-Falcón, M. et al. (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature*, 451, 480–484.
- Djakovic-Petrovic, T., Wit, M.D., Voeselek, L.A.C.J. and Pierik, R. (2007) DELLA protein function in growth responses to canopy signals. *Plant J.*, 51, 117–126

- Duek PD, Fankhauser C (2005) bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. *Trends in Plant Science* 10: 51-54
- 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.
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G. et al. (2008) Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature*, 451, 475–479
- Foreman, J., Johansson, H., Hornitschek, P., Josse, E.-M.M., Fankhauser, C. and Halliday, K.J. (2011) Light receptor action is critical for maintaining plant biomass at warm ambient temperatures. *Plant J.* 65, 441–452.
- Franklin, K. a (2008) Shade avoidance. *New Phytol.* 179, 930–44
- Franklin, K. A., Lee, S. H., Patel, D., Kumar, S. V., Spartz, A. K., Gu, C., ... & Wigge, P. A. (2011). Phytochrome-interacting factor 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(50), 20231-20235.
- Fu, X., & Harberd, N. P. (2003). Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature*, 421(6924), 740.
- Fujioka, S., Noguchi, T., Yokota, T., Takatsuto, S., and Yoshida, S. (1998). Brassinosteroids in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 48, 595–599. doi: 10.1016/S0031-9422(98)00065-X
- Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E. G., Grau-Enguix, F., Abbas, M., Locascio, A., Thomas, S. G., ... & Blázquez, M. A. (2012). Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(33), 13446-13451.
- Gray, W.M., Östin, A., Sandberg, G., Romano, C.P. and Estelle, M. (1998) High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95, 7197–7202.
- Gudesblat, G. E., and Russinova, E. (2011). Plants grow on brassinosteroids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 530–537. doi: 10.1016/j.pbi.2011.05.004
- Guo, H., Li, L., Aluru, M., Aluru, S., and Yin, Y. (2013). Mechanisms and networks for brassinosteroid regulated gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 545–553. doi: 10.1016/j.pbi.2013.08.002
- Hao, J., Yin, Y., and Fei, S. (2013). Brassinosteroid signaling network: implications on yield and stress tolerance. *Plant Cell Rep.* 32, 1017–1030. doi: 10.1007/s00299-013-1438-x
- He JX, Gendron JM, Sun Y, Gampala SS, Gendron N, Sun CQ, Wang ZY (2005) BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* 307: 1634-1638
- Heisler, M. G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G. V., Long, J. A., & Meyerowitz, E. M. (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Current biology*, 15(21), 1899-1911.

- 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
- Hornitschek P., Lorrain S., Zoete V., Michielin O., Fankhauser C. (2009). Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. *EMBO J.* 2009; 28: 3893-3902
- Hornitschek, P., Kohnen, M.V., Lorrain, S., Rougemont, J., Ljung, K., López-Vidriero, I., Franco-Zorrilla, J.M., Solano, R., Trevisan, M., Pradervand, S., Xenarios, I. and Fankhauser, C. (2012) Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. *Plant J*, 71, 699-711.
- Ibañez, C., Delker, C., Martinez, C., Bürstenbinder, K., Janitza, P., Lippmann, R., ... & Grossjohann, A. (2018). Brassinosteroids dominate hormonal regulation of plant thermomorphogenesis via BZR1. *Current Biology*, 28(2), 303-310.
- Ikekawa, N., and Zhao, Y. J. (1991). "Application of 24-epibrassinolide in agriculture," in *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, and Applications*, eds H. G. Cutler, T. Yokota, and G. Sadam (Washington, DC: In ACS Symposium Series, American Chemical Society), 280–291.
- Jaillais, Y., Hothorn, M., Belkhadir, Y., Dabi, T., Nimchuk, Z. L., Meyerowitz, E. M., et al. (2011). Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor. *Genes Dev.* 25, 232–237. doi: 10.1101/gad.2001911
- Jung, J.-H., Domijan, M., Klose, C., et al. (2016) Phytochromes function as thermosensors in *Arabidopsis*. *Science* (80-). 354, 886–889
- Keuskamp, D. H., Sasidharan, R., Vos, I., Peeters, A. J., Voeselek, L. A., & Pierik, R. (2011). Blue-light-mediated shade avoidance requires combined auxin and brassinosteroid action in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*, 67(2), 208-217.
- Kim, B., Jeong, Y. J., Corvalán, C., Fujioka, S., Cho, S., Park, T., & Choe, S. (2014). Darkness and gulliver2/phyB mutation decrease the abundance of phosphorylated BZR1 to activate brassinosteroid signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 77(5), 737-747.
- Kim, T. W., & Wang, Z. Y. (2010). Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annual review of plant biology*, 61, 681-704.
- Koini, M.A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C.A., Harberd, N.P., Whitelam, G.C. and Franklin, K.A. (2009) High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Curr. Biol.* 19, 408–413.
- Kozuka, T., Kobayashi, J., Horiguchi, G., Demura, T., Sakakibara, H., Tsukaya, H., & Nagatani, A. (2010). Involvement of auxin and brassinosteroid in the regulation of petiole elongation under the shade. *Plant Physiology*, pp-110.
- Legris, M., Nieto, C., Sellaro, R., Prat, S., & Casal, J. J. (2017). Perception and signalling of light and temperature cues in plants. *The Plant Journal*, 90(4), 683-697.

- Legris, M; Klose, C; Burgie, S; Costigliolo, C; Neme, M; Hiltbrunner, A; Wigge, P; Schäfer, E; Vierstra, R; Casal, J. (2016). Phytochrome B integrates light and temperature signals in Arabidopsis. *Science*, 354(6314), 897-900.
- Leivar P, Monte E, Oka Y, Liu T, Carle C, Castillon A, Huq E, Quail PH (2008) Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factor repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Current Biology* 18: 1815-1823
- Li, J., & Chory, J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*, 90(5), 929-938.
- Li, J., and Chory, J. (1999). Brassinosteroid actions in plants. *J. Exp. Bot.* 50, 275–282. doi: 10.1093/jxb/50.332.275
- Li, J., Nagpal, P., Vitart, V., McMorris, TC y Chory, J. (1996) Un papel para los brassinoesteroides en el desarrollo de Arabidopsis dependiente de la luz. *Science*, 272, 398-401.
- Li, K., Yu, R., Fan, L.-M. Wei, N., Chen, H. and Deng, X.W. (2016) DELLA-mediated PIF degradation contributes to coordination of light and gibberellin signalling in Arabidopsis. *Nat. Commun.* 7, 11868.
- Li, L., Ljung, K., Breton, G., Schmitz, R.J., Pruneda-Paz, J., Cowing-Zitron, C., Cole, B.J., Ivans, L.J., Pedmale, U.V., Jung, H.-S., Ecker, J.R., Kay, S.A. and Chory, J. (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.
- Lorrain, S., Allen, T., Duek, P.D., Whitelam, G.C. and Fankhauser, C. (2008) Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growthpromoting bHLH transcription factors. *Plant J.*, 53, 312–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18047474> [Accessed October 9, 2014].
- Luccioni, L. G., Oliverio, K. A., Yanovsky, M. J., Boccalandro, H. E., & Casal, J. J. (2002). Brassinosteroid mutants uncover fine tuning of phytochrome signaling. *Plant physiology*, 128(1), 173-181.
- Martínez, C., Espinosa-Ruíz, A., de Lucas, M., Bernardo-García, S., Franco-Zorrilla, J. M., & Prat, S. (2018). PIF4-induced BR synthesis is critical to diurnal and thermomorphogenic growth. *The EMBO journal*, 37(23), e99552.
- 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
- 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.
- Morelli, G., & Ruberti, I. (2000). Shade avoidance responses auxin along lateral routes. *Plant Physiol* 122, 621-626

- Oh, E., Zhu, J. Y., Bai, M. Y., Arenhart, R. A., Sun, Y., & Wang, Z. Y. (2014). Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the Arabidopsis hypocotyl. *eLife*, e03031-e03031.
- Oh, E., Zhu, J.Y. and Wang, Z.Y. (2012) Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nat. Cell Biol.* 14, 802–809.
- 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., 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.
- Pacín, M., Legris, M. and Casal, J.J. (2013) COP1 re-accumulates in the nucleus under shade. *Plant J.* 75, 631–641.
- Pacín, M., Semmoloni, M., Legris, M., Finlayson, S. A., & Casal, J. J. (2016). Convergence of CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 and PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR signalling during shade avoidance. *New Phytologist*.
- Park, Y. J., Lee, H. J., Ha, J. H., Kim, J. Y., & Park, C. M. (2017). COP 1 conveys warm temperature information to hypocotyl thermomorphogenesis. *New Phytologist*, 215(1), 269-280.
- Procko, C., Crenshaw, C. M., Ljung, K., Noel, J. P., & Chory, J. (2014). Cotyledon-generated auxin is required for shade-induced hypocotyl growth in Brassica rapa. *Plant physiology*, pp-114.
- Pucciariello, O., Legris, M., Costigliolo Rojas, C., Iglesias, M. J., Hernando, C. E., Dezar, C., ... & Casal, J. J. (2018). Rewiring of auxin signaling under persistent shade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201721110.
- Quint, M., Delker, C., Franklin, K. A., Wigge, P. A., Halliday, K. J., & van Zanten, M. (2016). Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. *Nature plants*, 2, 15190.
- Reed, J.W., Foster, K.R., Morgan, P.W. and Chory, J. (1996) Phytochrome B affects responsiveness to giberellins in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 112, 337–342
- Ryu, H., Cho, H., Kim, K., & Hwang, I. (2010). Phosphorylation dependent nucleocytoplasmic shuttling of BES1 is a key regulatory event in brassinosteroid signaling. *Molecules and cells*, 29(3), 283-290.
- Saini, S., Sharma, I., & Pati, P. K. (2015). Versatile roles of brassinosteroid in plants in the context of its homeostasis, signaling and crosstalks. *Frontiers in plant science*, 6, 950.

- Saito, M., Kondo, Y., & Fukuda, H. (2018). BES1 and BZR1 Redundantly Promote Phloem and Xylem Differentiation. *Plant and Cell Physiology*, 59(3), 590-600.
- Sharma, I., Bhardwaj, R., and Pati, P. K. (2015). Exogenous application of 28-Homobrassinolide modulates the dynamics of salt and pesticides induced stress responses in an elite rice variety Pusa Basmati-1. *J. Plant Growth Regul.* 34, 509–518. doi: 10.1007/s00344-015-9486-9
- Sreeramulu, S., Mostizky, Y., Sunitha, S., Shani, E., Nahum, H., Salomon, D., et al. (2013). BSKs are partially redundant positive regulators of brassinosteroid signaling in Arabidopsis. *Plant J.* 74, 905–919. doi: 10.1111/tpj.12175
- Staneloni, R.J., Rodriguez-Batiller, M.J., Legisa, D., Scarpin, M.R., Agalou, A., Cerdán, P.D., Meijer, A.H., Ouwerkerk, 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
- Stavang, J.A., Gallego-Bartolomé, J., Gómez, M.D., Yoshida, S., Asami, T., Olsen, J.E., García-Martínez, J.L., Alabadí, D. and Blázquez, M.A. (2009) Hormonal regulation of temperature-induced growth in Arabidopsis. *Plant J.* 60, 589–601.
- Sun, J., Qi, L., Li, Y., Chu, J., & Li, C. (2012). PIF4-mediated activation of YUCCA8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating Arabidopsis hypocotyl growth. *PLoS Genet*, 8(3), e1002594.
- Trupkin, S. A., Mora-García, S., & Casal, J. J. (2012). The cyclophilin ROC1 links phytochrome and cryptochrome to brassinosteroid sensitivity. *The Plant Journal*, 71(5), 712-723.
- Sun, Y., Fan, X. Y., Cao, D. M., Tang, W., He, K., Zhu, J. Y., et al. (2010). Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in Arabidopsis. *Dev. Cell* 19, 765–777. doi: 10.1016/j.devcel.2010.10.010.
- Tanaka, K., Asami, T., Yoshida, S., Nakamura, Y., Matsuo, T., and Okamoto, S. (2005). Brassinosteroid homeostasis in Arabidopsis is ensured by feedback expressions of multiple genes involved in its metabolism. *Plant Physiol.* 138, 1117–1125. doi: 10.1104/pp.104.058040.
- Tang, W., Yuan, M., Wang, R., Yang, Y., Wang, C., Oses-Prieto, J. A., et al. (2011). PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat. Cell Biol.* 13, 124–131. doi: 10.1038/ncb2151
- 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.
- Tarkowská, D., Novák, O., Oklestkova, J., & Strnad, M. (2016). The determination of 22 natural brassinosteroids in a minute sample of plant tissue by UHPLC–ESI–MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(24), 6799-6812.
- Vandenbussche, F., Vriezen, W.H., Smalle, J., Laarhoven, L.J.J., Harren, F.J.M., and Van Der Straeten, D. (2003). Ethylene and Auxin Control the Arabidopsis Response to Decreased Light Intensity. *Plant Physiol.* 133, 517-527

- Vert, G., & Chory, J. (2006). Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature*, 441(7089), 96-100.
- Vierstra, R.D. and Zhang, J. (2011) Phytochrome signaling: Solving the Gordian knot with microbial relatives. *Trends Plant Sci.*, 16, 417–426
- Wang, H., Yang, C., Zhang, C., Wang, N., Lu, D., Wang, J., et al. (2011). Dual role of BKI1 and 14-3-3 s in brassinosteroid signaling to link receptor with transcription factors. *Dev. Cell* 21, 825–834. doi: 10.1016/j.devcel.2011.08.018
- Wang, W., Bai, M. Y., & Wang, Z. Y. (2014). The brassinosteroid signaling network—a paradigm of signal integration. *Current opinion in plant biology*, 21, 147-153.
- Wang, X., and Chory, J. (2006). Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BR1 signaling, from the plasma membrane. *Science* 313, 1118–1122. doi: 10.1126/science.1127593
- Wang, X., Goshe, M. B., Soderblom, E. J., Phinney, B. S., Kuchar, J. A., Li, J., et al. (2005b). Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase. *Plant Cell* 17, 1685–1703. doi: 10.1105/tpc.105.031393
- Wang, Z. Y., Bai, M. Y., Oh, E., and Zhu, J. Y. (2012). Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. *Annu. Rev. Genet.* 46, 701–724. doi: 10.1146/annurev-genet-102209-163450
- Wang, Z. Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., ... & Chory, J. (2002). Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Developmental cell*, 2(4), 505-513.
- Wu, J., Wang, W., Xu, P., Pan, J., Zhang, T., Li, Y., ... & Lian, H. (2018). phyB Interacts with BES1 to Regulate Brassinosteroid Signaling in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*.
- Xu, W., Huang, J., Li, B., Li, J., & Wang, Y. (2008). Is kinase activity essential for biological functions of BRI1?. *Cell research*, 18(4), 472.
- Xu, X., Paik, I., Zhu, L., Bu, Q., Huang, X., Deng, X. W., & Huq, E. (2014). PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR1 enhances the E3 ligase activity of CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1 to synergistically repress photomorphogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, tpc-114.
- Yang, M., Li, C., Cai, Z., Hu, Y., Nolan, T., Yu, F., ... & Wang, X. (2017). SINAT E3 ligases control the light-mediated stability of the brassinosteroid-activated transcription factor BES1 in Arabidopsis. *Developmental cell*, 41(1), 47-58.
- Ye, H., Li, L., and Yin, Y. (2011). Recent advances in the regulation of brassinosteroid signaling and biosynthesis pathways. *J. Int. Plant Biol.* 53, 455–468. doi: 10.1111/j.1744-7909.2011.01046.x
- Yin, Y., Wang, Z. Y., Mora-Garcia, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T., & Chory, J. (2002). BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell*, 109(2), 181-191.

Yu, X., Li, L., Zola, J., Aluru, M., Ye, H., Foudree, A., et al. (2011). A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 65, 634–646. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04449.x.

Zhu, J. Y., Sae-Seaw, J., and Wang, Z. Y. (2013). Brassinosteroid signalling. *Development* 140, 1615–1620. doi: 10.1242/dev.060590