

MÁSTER EN
BIOTECNOLOGÍA
MOLECULAR Y
CELULAR DE
PLANTAS

VARIACIÓN GENÉTICA NATURAL
DE LA FOTOMORFOGÉNESIS EN
ARABIDOPSIS

TESIS DE MÁSTER
AUTORA: BERTA SOTILLO SAÚCO
DIRECTOR: MIGUEL ÁNGEL BLÁZQUEZ RODRÍGUEZ

ÍNDICE

1.	Introducción	3
2.	Objetivos	7
3.	Resultados	9
3.1	Efecto de la reducción de GAs sobre la fotomorfogénesis en poblaciones naturales.	9
3.2	Caracterización fisiológica de accesiones con comportamientos extremos.	10
3.3	Estudio de asociación de genes candidatos.	11
3.4	Caracterización funcional del alelo <i>GAI^{Bla}</i>	14
3.5	Análisis de QTLs.	20
4.	Discusión.....	23
5.	Conclusiones	25
6.	Materiales y métodos	27
6.1	Preparación de medios de cultivo.....	27
6.2	Siembra.....	27
6.3	Condiciones de crecimiento.....	27
6.4	Extracción DNA genómico, purificación y amplificación.	27
6.5	Análisis de las plántulas.	28
6.6	Ensayo del doble híbrido de levadura.....	28
6.7	Complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC).	28
6.8	Expresión transitoria.....	29
6.9	Análisis de QTLs.	29
7.	Referencias bibliográficas	31

1. Introducción

Los estudios de la variación natural en los organismos modelo constituyen un puente entre los análisis moleculares de la función génica y las investigaciones de adaptación y selección natural. En *Arabidopsis thaliana*, recientes estudios de variación natural han contribuido a la identificación de importantes complejos génicos que han intervenido en el proceso de evolución de su genoma, en la estructura de la población y en los mecanismos de selección. El estudio de las poblaciones naturales de *Arabidopsis* como fuente de variación genética (Figura 1) ha hecho posible en algunos casos la determinación de los genes concretos de una ruta susceptibles de ser seleccionados por el entorno para generar cambios adaptativos en las variedades naturales (Alonso-Blanco et al., 2005).

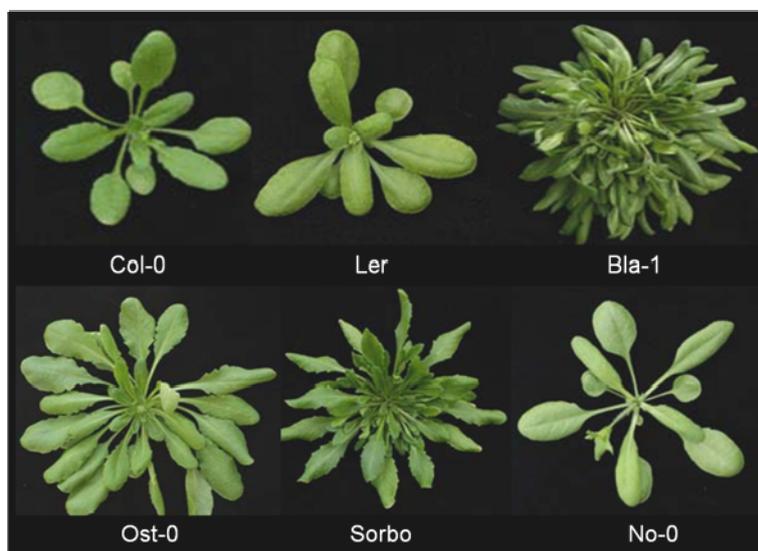


Figura 1. Accesiones de *Arabidopsis*. Las seis accesiones están incluidas entre las 20 seleccionadas para este trabajo.

Casi todo el desarrollo de las plantas es post-embionario, lo que implica que la planta puede modularlo o modificarlo dependiendo de las condiciones ambientales del entorno. Las plantas han desarrollado diferentes estrategias que les permiten seleccionar aquellos cambios ambientales que representan una señal para su desarrollo. La información que obtienen es procesada e integrada por factores endógenos como las hormonas o el reloj circadiano, que inducen cambios en el crecimiento y el desarrollo que facilitarían la correcta adaptación de la planta a su entorno. Esta capacidad de adaptación es lo que denominamos **plasticidad** (Casal et al., 2004).

El ejemplo más temprano de plasticidad tiene lugar al finalizar la germinación. En este momento, las plantas pueden seguir dos programas de desarrollo diferentes y alternativos dependiendo de si están creciendo en presencia de luz, **fotomorfogénesis**, o en oscuridad,

escotomorfogénesis (Figura 2). El desarrollo escotomorfogénico se caracteriza por un crecimiento rápido del hipocotilo, unos cotiledones pequeños, blanquecinos, cerrados y plegados sobre sí mismos formando un **gancho apical**. Cuando la luz desencadena el desarrollo fotomorfogénico, el crecimiento del hipocotilo se ralentiza y **los cotiledones se abren y expanden** (Holm and Deng, 1999). La apariencia **etiolada** o blanca que confiere la escotomorfogénesis a las plántulas se debe a que contienen etioplastos en lugar de cloroplastos; además, la expresión de los genes que normalmente están inducidos por la luz se encuentra reprimida o se mantiene muy baja.

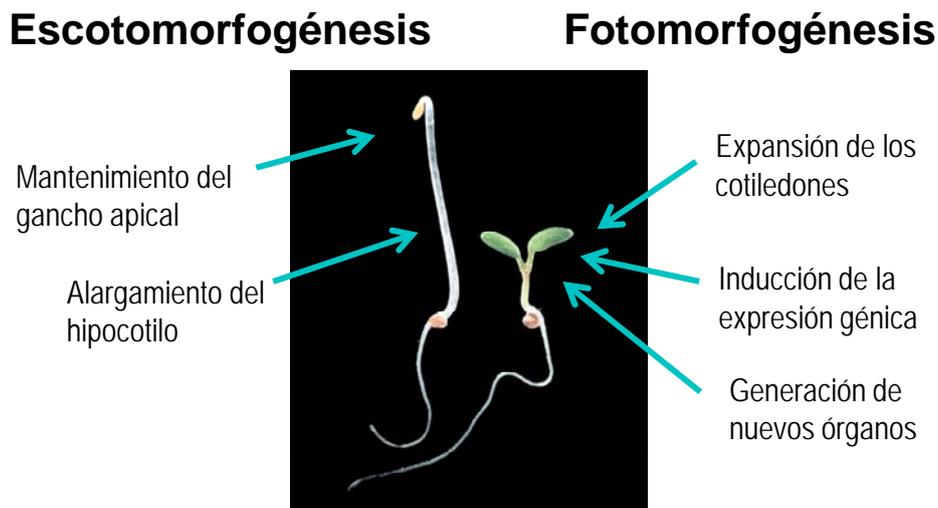


Figura 2. Diferencias fenotípicas entre la escotomorfogénesis y la fotomorfogénesis. Se muestran dos plántulas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en presencia y ausencia de luz, indicando los rasgos característicos de los dos programas de desarrollo.

Diversos análisis genéticos han demostrado que la fotomorfogénesis es el programa de desarrollo que la planta elige por defecto tras la germinación, y que se mantiene reprimido principalmente gracias a la acción del complejo COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1), una E3 ubiquitina ligasa que induce la degradación proteolítica de factores que promueven este programa de desarrollo cuando la plántula no detecta la presencia de luz (Ma et al., 2002). En presencia de luz, COP1 abandona el núcleo contribuyendo así al desarrollo fotomorfogénico.

Además de por la luz, la decisión de seguir un desarrollo escotomorfogénico o fotomorfogénico está estrictamente regulada por hormonas. En concreto hay evidencia para la implicación de los brasinosteroides (BRs), las citoquininas, las auxinas, el etileno y las giberelinas (GAs). El ejemplo más claro es que la deficiencia en BRs o en GAs provoca que las plantas tengan un aspecto desetiolado característico de la fotomorfogénesis cuando son cultivadas en la oscuridad (Li et al., 1996); en concreto, la deficiencia en la síntesis de GAs

favorece la transición entre los dos tipos de desarrollo, fomentando un desarrollo fotomorfogénico en el que se activa la expresión de los genes implicados en la utilización energética de la luz y en la protección frente a la irradiación, entre otros (Alabadi et al., 2004).

Los análisis moleculares realizados hasta la fecha en *Arabidopsis* han generado un modelo de regulación de la fotomorfogénesis por GAs (Figura 3), en el que la señalización por estas hormonas, a través de las proteínas DELLA, está modulada al menos en dos puntos: la regulación de la concentración de HY5 (LONG HYPOCOTYL 5) y la regulación de la actividad de los elementos PIF (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR) (Alabadi et al., 2008).

HY5 es un factor de transcripción de tipo *bZIP* responsable de promover la fotomorfogénesis (Yadav et al., 2002). COP1 promueve su degradación en la oscuridad y juega un papel muy importante por ejemplo, en la acumulación de antocianinas en presencia de luz.

Los factores de transcripción PIF pertenecen a la familia bHLH e interaccionan con los fotorreceptores phyA y phyB, actuando como reguladores negativos de la señalización de phyB.

Las GAs inducen la degradación vía proteasoma de las proteínas DELLA, que depende de la interacción de éstas con el complejo SCF a través de la F-box SLY-1 (SLEEPY 1) (Dill et al., 2004). Este complejo ubiquitina a las proteínas DELLA para que sean degradadas. La delección de 17 aminoácidos en la región N-terminal de las proteínas DELLA, incluyendo el “motivo DELLA” altamente conservado, impide su unión a GID1 (GA INSENSITIVE DWARF1), el receptor de GAs, por lo que la unión al complejo SCF no tiene lugar y las proteínas DELLA no son degradadas (Dill et al., 2001; Fu et al., 2004). Las plantas de *Arabidopsis* con alelos de alguna de las 5 proteínas DELLA resistentes a la degradación por GAs (alelos *gai-1* y *rga-Δ17*) muestran un fenotipo dominante equivalente al observado en condiciones de deficiencia en GAs, que no puede ser complementado con la aplicación exógena de estas hormonas.

El papel represor de las GAs sobre la fotomorfogénesis se basa en la observación de que la reducción de la síntesis de GAs mediante la aplicación del inhibidor paclobutrazol (PAC), o el bloqueo de la acción de las GAs mediante mutaciones estabilizadoras en las proteínas DELLA, provocan una Desetiolación parcial en la oscuridad (Alabadi et al., 2004).

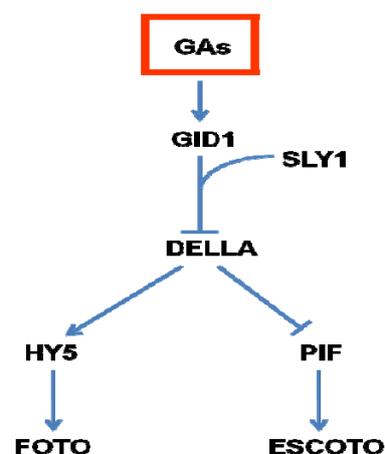


Figura 3. Esquema simplificado de la señalización por GAs.

El mecanismo propuesto para esta función tiene lugar a través de la inhibición de la actividad de los factores de transcripción de la familia PIF, y de la estabilización de la proteína HY5 en la oscuridad (Alabadi et al., 2008), inclinando la elección hacia el programa fotomorfogénico incluso en ausencia de luz (Figura 4).

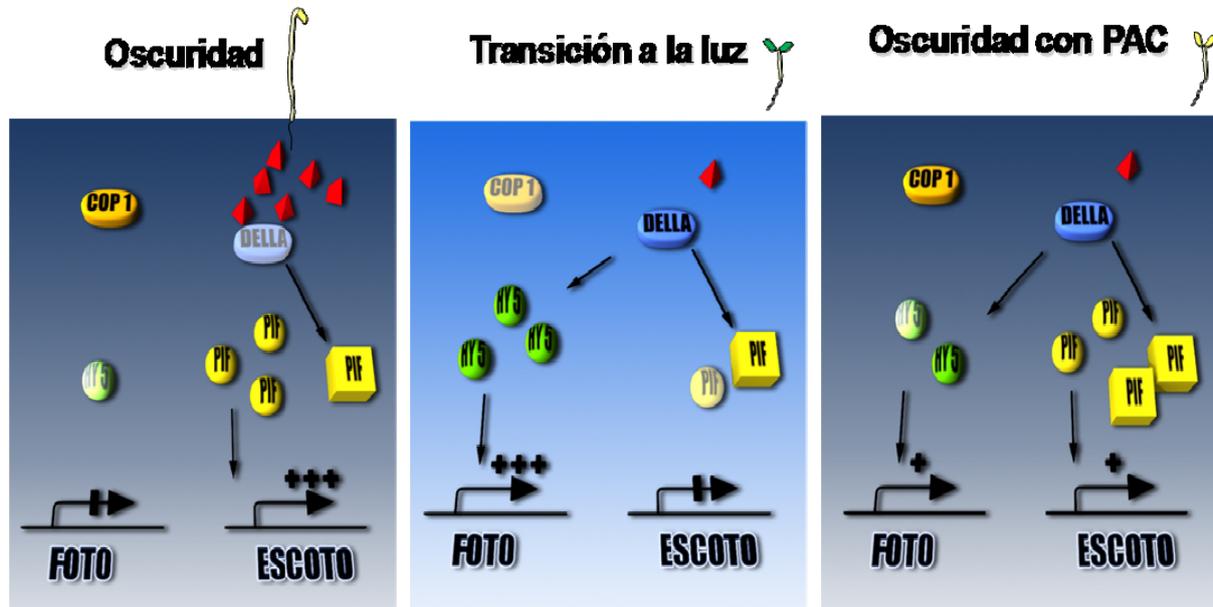


Figura 4. Regulación de la fotomorfogénesis por GAs. a) Después de la germinación en ausencia de luz, COP1 es muy activo y promueve la degradación de los factores que inducen la fotomorfogénesis, como HY5. Por otro lado, COP1 induce la acumulación de proteínas PIF activas responsables del crecimiento etiolado. Los altos niveles de GAs provocan un descenso en la acumulación de las proteínas DELLA, lo que conlleva la prevención de su efecto negativo sobre la actividad de las proteínas PIF y de su efecto positivo en la acumulación de HY5. b) En la transición a la luz, los niveles de GAs descienden y no inhiben a las proteínas DELLA, promoviendo una acumulación de HY5, un descenso en los niveles de las proteínas PIF y, por tanto, un desarrollo desetiolado o fotomorfogénico. c) Cuando las plántulas son tratadas con PAC se produce una desetiolación parcial en oscuridad.

2. Objetivos

Enmarcado en el contexto de comprender cómo las hormonas confieren plasticidad al desarrollo vegetal, el proyecto que da origen a este trabajo se centra en el estudio del control por GAs de la elección del programa de desarrollo a seguir por las plántulas recién germinadas. El objetivo final de esta línea de investigación es averiguar si la represión que ejercen las GAs sobre la fotomorfogénesis en la oscuridad tiene un valor adaptativo; es decir, si la Naturaleza ha sometido a presión selectiva a esta vía de señalización para permitir la adaptación de distintas variedades a sus nichos ambientales. En concreto, este trabajo se plantea con los objetivos:

2.1 Comprobar si existe variación natural en la sensibilidad a GAs en la oscuridad. Esto se realiza mediante un análisis de la apertura de los cotiledones y la longitud de hipocotilo en oscuridad y en presencia de PAC, en 150 accesiones de *A. thaliana*.

2.2 En caso de existir variación natural, estudiar la posible asociación entre el fenotipo observado y genes candidatos elegidos entre los que se conoce su participación en alguna de las etapas del desarrollo foto- y escotomorfogénico. De esta manera se podrían encontrar dianas génicas con posible valor adaptativo.

2.3 Iniciar un análisis de QTLs entre dos accesiones con comportamientos opuestos en su sensibilidad a GAs respecto a la represión de la fotomorfogénesis en la oscuridad. Mediante este análisis se podrán identificar en el futuro nuevos *loci* implicados en la regulación del crecimiento por luz y GAs.

3. Resultados

3.1 Efecto de la reducción de GAs sobre la fotomorfogénesis en poblaciones naturales.

Se ha analizado la sensibilidad a GAs en 150 accesiones naturales disponibles en el banco de germoplasma de *Arabidopsis* (NASC, U. de Nottingham), midiendo el ángulo de apertura entre los cotiledones y la longitud del hipocotilo a los 7 días después de la germinación en presencia de PAC.

Como se ve en la Figura 5, existe una gran variabilidad en la respuesta al PAC en las distintas accesiones estudiadas: desde aquellas que mantienen los cotiledones prácticamente cerrados, hasta aquellas que los abren completamente. Es importante destacar que este comportamiento sólo se observó al reducir la síntesis de GAs, puesto que en las placas control todas las accesiones mostraron los cotiledones completamente cerrados (resultados no mostrados). Mediante un análisis estadístico se seleccionaron aquellas accesiones cuyo comportamiento se desviaba del 70% de la media.

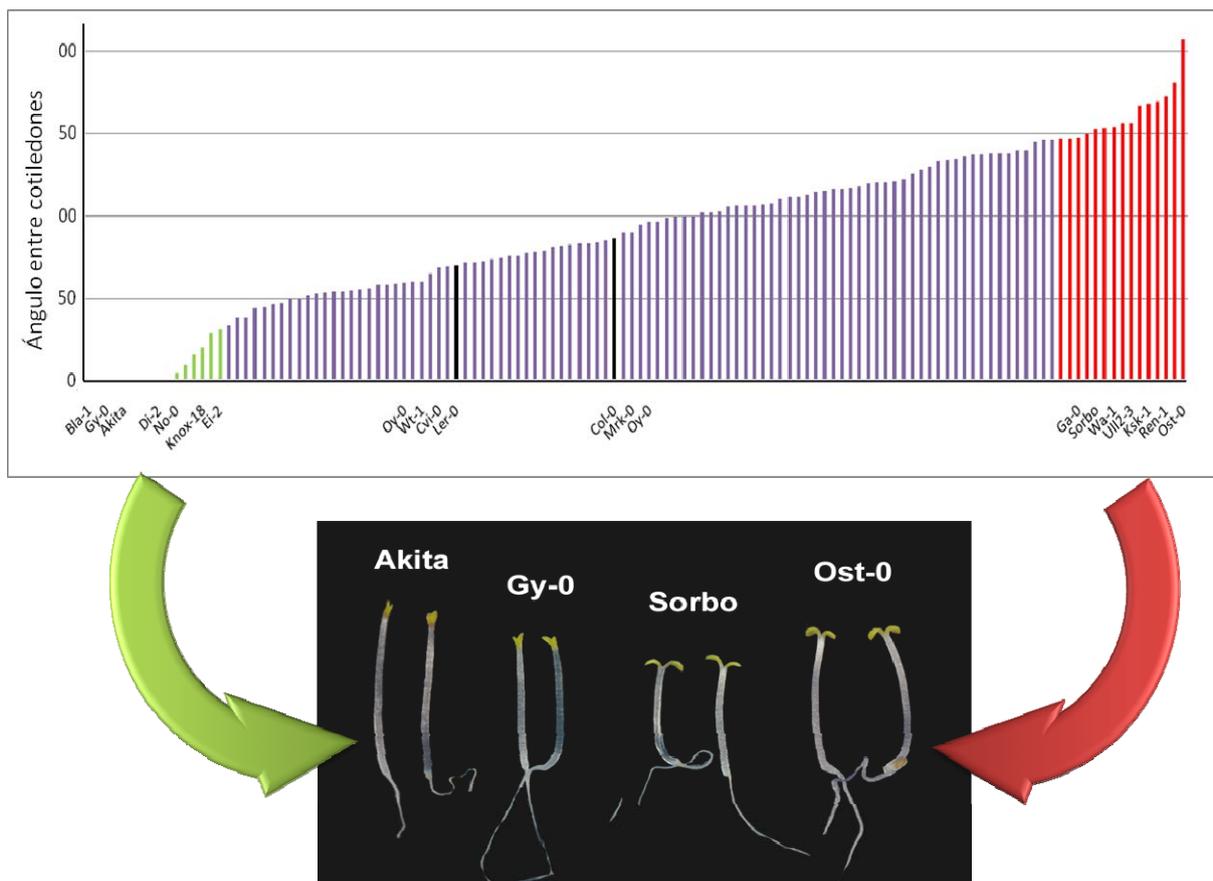


Figura 5. Variación natural en el control de la fotomorfogénesis por GAs en la oscuridad. Las barras representan las medias en los ángulos de apertura de cotiledones ($n > 15$) en cada una de las 150 accesiones. Las plántulas se cultivaron en presencia de PAC $1 \mu\text{M}$ durante 7 días en oscuridad. En el panel inferior se muestran dos ejemplos de accesiones poco sensibles a PAC (Akita y Gy-0) y dos ejemplos de accesiones muy sensibles a PAC (Sorbo y Ost-0).

De la misma manera, pudimos detectar un elevado grado de variabilidad en las poblaciones naturales al medir la altura del hipocotilo, tanto en ausencia, como en presencia de PAC. Para distinguir el efecto específico del PAC sobre el hipocotilo, se representó la correlación entre el tamaño en MS frente al tamaño en MS + PAC (Figura 6), y se identificaron aquellas accesiones cuya respuesta relativa al PAC se desviaba del 70% de la media.

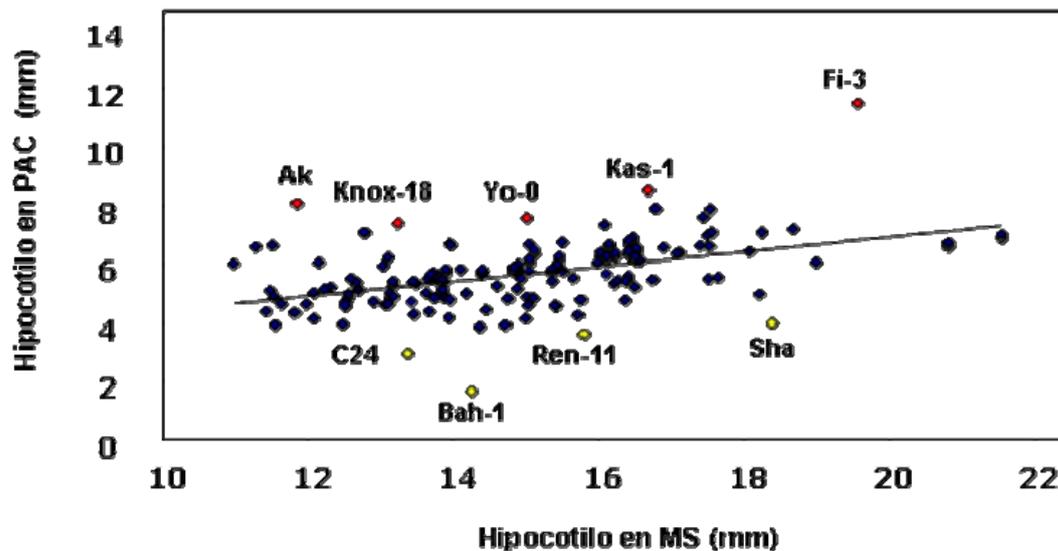


Figura 6. Variación natural en el control de la fotomorfogénesis por GAs en la oscuridad. Los puntos representan las medias en la longitud del hipocotilo ($n > 15$) de cada una de las 150 accesiones. Las plántulas se cultivaron en presencia de PAC $1 \mu\text{M}$ durante 7 días en oscuridad. Los datos se han ordenado ascendentemente en función de los valores MS-PAC: diferencia entre la longitud obtenida en las plántulas control (MS) y las plántulas cultivadas con PAC (MS + PAC).

Para los estudios posteriores, se seleccionaron 20 accesiones representativas de tres grupos de comportamiento (ver la Figura 5 para un ejemplo): 6 que eran más resistentes al PAC de forma natural (Akita, Knox-18, Mr-0, Bla-1, Gy-0 y Di-2), 7 que eran más sensibles (Ost-0, Sorbo, Wa-1, Ren-1, Ksk-1, Ga-0 y Ull2-3), y 7 con un comportamiento intermedio (Col-0, *Ler*, Cvi-0, Ei-2, Mrk-0, Oy-0 y Wt-1).

3.2 Caracterización fisiológica de accesiones con comportamientos extremos.

Para determinar si el grado de sensibilidad al PAC variaba con la concentración de forma equivalente en las distintas accesiones seleccionadas, se realizó un análisis de dosis-respuesta midiendo la apertura entre los cotiledones a distintas concentraciones de PAC. Como se muestra en la Figura 7, la magnitud de la respuesta de cada accesión fue dependiente de la dosis del inhibidor, cubriendo rangos de concentración variables. Es decir, algunas

accesiones mostraron su hipersensibilidad o su resistencia a todas las concentraciones de PAC (p. ej. Ost-0), mientras que otras sólo la mostraron a concentraciones elevadas de PAC (p. ej. Ksk-1). Estos resultados indican que entre las variedades naturales seleccionadas existe más de un mecanismo distinto que explique su comportamiento diferencial.

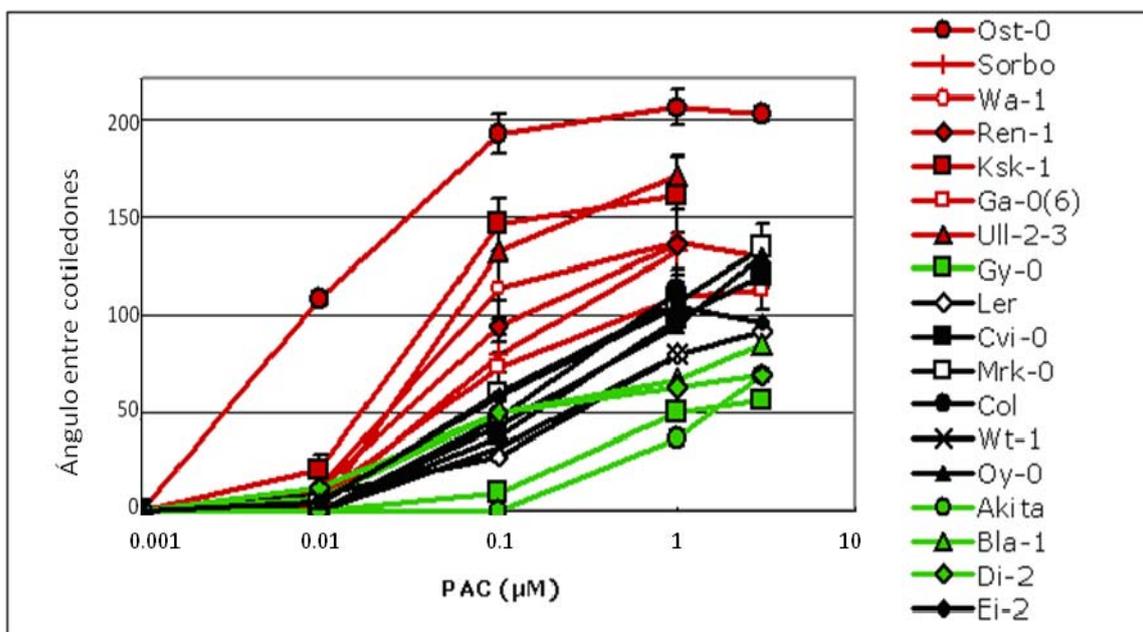


Figura 7. Sensibilidad frente a PAC de las accesiones seleccionadas. La gráfica muestra la respuesta de cada accesión a concentraciones crecientes de PAC, medida a través del ángulo entre cotiledones. Cada valor es la media de al menos 7 plántulas y las barras representan la desviación estándar (SD).

3.3 Estudio de asociación de genes candidatos.

Para averiguar si el distinto comportamiento de cada accesión se debía a variaciones alélicas en genes cuya participación ha sido demostrada para la regulación de la fotomorfogénesis por GAs (Alabadi et al., 2008), se obtuvo la secuencia de 8 de estos elementos en las 20 accesiones. Los genes estudiados fueron los que codifican: los factores de transcripción *PIF3* (Ni et al., 1998) y *HY5* (Somers et al., 1991); las proteínas DELLA que se sabe están implicadas en el desarrollo fotomorfogénico, *GAI* (*GA* *INSENSITIVE*) (Peng and Harberd, 1993) y *RGA* (*REPRESSOR OF gal-3*) (Silverstone et al., 1998); los 3 receptores de GAs presentes en *Arabidopsis* *GID1a*, *GID1b* y *GID1c* (Nakajima et al., 2006); y la F-box *SLY1* (McGinnis et al., 2003). La secuencia de estos genes se analizó *in silico* con el programa *SeqMan* y se incluyó como referencia la secuencia de la accesión Col-0.

La secuencia del gen *SLY1* está altamente conservada ya que no se encontró ningún polimorfismo en las accesiones analizadas. La ausencia de polimorfismos también puede

verse influida por el pequeño tamaño del gen (930 pb). Los genes *GID1a*, *GID1b* y *GID1c*, presentaron polimorfismos en las secuencias codificantes pero todos correspondientes a cambios silenciosos. En el gen *HY5* sólo se encontró un polimorfismo no silencioso (S → N) en la posición 76 de las accesiones Bla-1, Akita, Gy-0, Ga-0, Ksk-1, Ren-1, Mrk-0, Wt-1, Mr-0 y Ost-0; entre estas accesiones se encuentran representantes de los tres grados de sensibilidad identificados, por lo que no se encuentra ninguna asociación entre dicho polimorfismo y la intensidad del fenotipo de cada accesión. En el resto de los genes analizados no se encontraron cambios drásticos en las secuencias de aminoácidos: a pesar de que aparecieron numerosos polimorfismos que implicaban un cambio en la naturaleza del aminoácido diferencial (Tablas 1, 2, 3) ninguno correlacionaba con el fenotipo observado; es decir, no parece probable que ninguno de estos cambios observados tenga *a priori* consecuencias en la actividad de las proteínas estudiadas que sean relevantes en la sensibilidad a GAs.

Tabla 1. Variaciones alélicas en el gen PIF-3 para 19 accesiones. Se muestran en la tabla los polimorfismos que generan un cambio de aminoácido. El aminoácido que difiere de la secuencia de Col-0 está representado en color rojo. “del” indica la ausencia del aminoácido correspondiente.

PIF-3													
POSICIÓN	124	141	176	186	209	217	220	236	407	425	468	482	485
Bla-1	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	S	G
Akita	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	P	G
Gy-0	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	S	G
Di-2	E	K	Q	Q	F	del	T	V	M	T	A	S	D
Knox-18	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	S	G
Mr-0	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	S	G
Col-0	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	A	G	S	G
Ei-2	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	S	G
Cvi	E	K	Q	Q	F	del	T	V	M	T	A	S	D
Mrk-0	E	K	Q	Q	F	N	T	V	L	T	G	S	G
Wt-1	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	S	G
Oy-0	D	N	H	K	L	del	I	I	M	T	A	S	G
Ost-0	D	N	H	K	L	del	I	I	M	T	A	S	G
Wa-1	E	K	Q	Q	F	N	T	V	L	A	G	S	G
Ren-1	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	S	G
UII2-3	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	A	G	S	G
Sorbo	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	P	G
Ga-0	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	P	G
Ksk-1	E	K	Q	Q	F	N	T	V	L	T	G	S	G

Tabla 2. Variaciones alélicas en el gen RGA para las 20 accesiones. Se muestran en la tabla los polimorfismos que generan un cambio de aminoácido. El aminoácido que difiere de la secuencia de Col-o está representado en color rojo. “del” indica la ausencia del aminoácido correspondiente.

RGA	POSICIÓN	7	13	14	182	197	198	199	200	203	210	587
Bla-1		Q	S	N	T	T	T	T	T	A	I	H
Akita		Q	S	N	T	T	T	T	M	A	I	Y
Gy-0		Q	S	N	T	T	T	T	T	A	I	Y
Di-2		Q	S	N	T	T	T	T	T	A	I	H
Knox-18		Q	S	N	T	T	T	T	T	G	I	Y
Mr-0		Q	S	N	A	del	del	del	del	A	I	H
Col-0		Q	S	N	T	T	T	T	T	A	I	H
Ler		Q	S	N	T	T	T	T	T	A	I	H
Ei-2		Q	S	N	T	T	T	T	T	G	I	Y
Cvi		Q	S	N	T	T	T	T	T	G	I	Y
Mrk-0		Q	S	N	T	T	T	T	T	A	I	Y
Wt-1		Q	S	N	T	T	T	T	M	A	I	Y
Oy-0		del	del	del	T	T	T	T	T	A	I	H
Ost-0		Q	S	N	T	T	T	T	T	G	I	Y
Wa-1		Q	S	N	T	T	T	T	T	A	I	H
Ren-1		Q	S	N	T	T	T	T	T	A	I	Y
Ull2-3		Q	S	N	T	T	T	T	T	A	V	Y
Sorbo		Q	S	N	T	T	T	T	T	A	I	Y
Ga-0		Q	S	N	T	T	T	T	M	A	I	H
Ksk-1		Q	S	N	T	T	T	T	T	G	I	Y

Tabla 3. Variaciones alélicas en el gen GAI para las 20 accesiones. Se muestran en la tabla los polimorfismos que generan un cambio de aminoácido. El aminoácido que difiere de la secuencia de Col-o está representado en color rojo. “del” indica la ausencia del aminoácido correspondiente. Aparece un codón de parada en la posición 112 de la accesión Bla-1.

GAI	POSICIÓN	10	62	112	156	160	314	386	394	409
Bla-1		del	E	/**						
Akita		del	E	N	P	L	F	S	E	V
Gy-0		del	E	N	H	V	F	G	E	I
Di-2		del	E	N	H	V	F	G	E	I
Knox-18		H	E	N	H	V	F	G	E	I
Mr-0		del	E	N	H	V	F	G	E	I
Col-0		H	E	N	H	V	F	G	E	I
Ler		del	E	N	H	V	F	G	E	I
Ei-2		H	E	N	H	V	F	G	E	I
Mrk-0		del	E	N	H	V	F	G	E	I
Wt-1		H	E	N	H	V	F	G	E	I
Oy-0		del	D	N	H	V	F	S	E	V

Ost-0	H	E	N	H	V	F	G	E	I
Wa-1	del	E	N	H	V	F	G	Q	I
Ren-1	del	E	N	H	V	F	G	E	I
UII2-3	del	E	N	H	V	del	G	E	I
Sorbo	del	E	N	H	V	F	G	E	I
Ga-0	del	E	N	H	V	F	G	E	I
Ksk-1	del	E	N	H	V	F	G	E	I

En la accesión Bla-1, la delección de una citosina (Tabla 3) en la posición 300 genera un cambio en la pauta de lectura del gen *GAI* que tiene como consecuencia la aparición de un codón de parada 24 aminoácidos después de dicha delección (Figura 8). La proteína truncada resultante tendría un tamaño aproximado de 13,5 kDa.

A

<i>GAI</i> ^{Bla}	M	K	R	D	H	-	H	H	H	Q	D	K	K	T	M	M
<i>GAI</i>	M	K	R	D	H	H	H	H	H	Q	D	K	K	T	M	M
<i>GAI</i> ^{Bla}	M	N	E	E	D	D	G	N	G	M	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>V</u>
<i>GAI</i>	M	N	E	E	D	D	G	N	G	M	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>V</u>
<i>GAI</i> ^{Bla}	L	G	Y	K	V	R	S	S	E	M	A	D	V	A	Q	K
<i>GAI</i>	L	G	Y	K	V	R	S	S	E	M	A	D	V	A	Q	K
<i>GAI</i> ^{Bla}	L	E	Q	L	E	V	M	M	S	N	V	Q	E	D	D	L
<i>GAI</i>	L	E	Q	L	E	V	M	M	S	N	V	Q	E	D	D	L
<i>GAI</i> ^{Bla}	S	Q	L	A	T	E	T	V	H	Y	N	P	A	E	L	Y
<i>GAI</i>	S	Q	L	A	T	E	T	V	H	Y	N	P	A	E	L	Y
<i>GAI</i> ^{Bla}	T	W	L	D	S	M	L	T	D	L	N	P	P	S	S	N
<i>GAI</i>	T	W	L	D	S	M	L	T	D	L	N	P	P	S	S	N
<i>GAI</i> ^{Bla}	A	E	Y	D	L	K	A	I	P	G	D	A	I	L	<u>I</u>	<u>S</u>
<i>GAI</i>	A	E	Y	D	L	K	A	I	P	G	D	A	I	L	<u>N</u>	<u>Q</u>
<i>GAI</i> ^{Bla}	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>I</u>
<i>GAI</i>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>D</u>
<i>GAI</i> ^{Bla}	<u>R</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>G</u>									
<i>GAI</i>	<u>T</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>N</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	...								

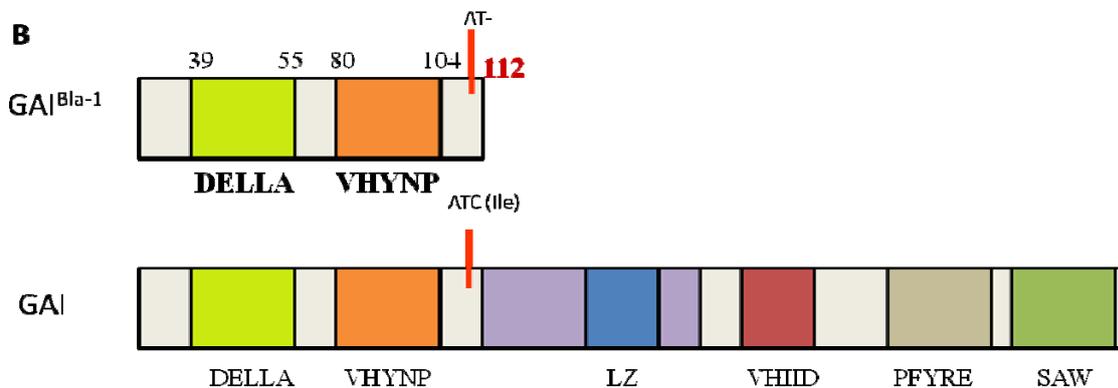


Figura 8. Estructura primaria de *GAI*^{Bla}. a) La estructura primaria de *GAI*^{Bla} coincide con la de *GAI* en la accesión Col-o hasta el aminoácido 112. Después de 24 aminoácidos que difieren de la estructura consenso, la proteína se trunca. b) La proteína *GAI*^{Bla} es aproximadamente 3 veces más pequeña que *GAI* silvestre, conservando el dominio DELLA con el que interacciona con los receptores de GAs. Los dominios representados en la figura se han definido en la proteína DELLA de *O. sativa* SLR-1 (Itoh et al., 2002).

3.4 Caracterización funcional del alelo *GAI^{Bla}*.

Para determinar la dominancia o recesividad de la hipersensibilidad a GAs de la accesión Bla-1, se analizó el fenotipo de la F1 del cruce entre dicha accesión y Col-0, con un comportamiento intermedio.

No se encontraron diferencias significativas en la longitud del hipocotilo entre los parentales y los cruces; sin embargo, al medir el ángulo de apertura entre los cotiledones, se ve claramente que el fenotipo resultante del cruce es equivalente al observado en la accesión Bla-1 (Figura 9).

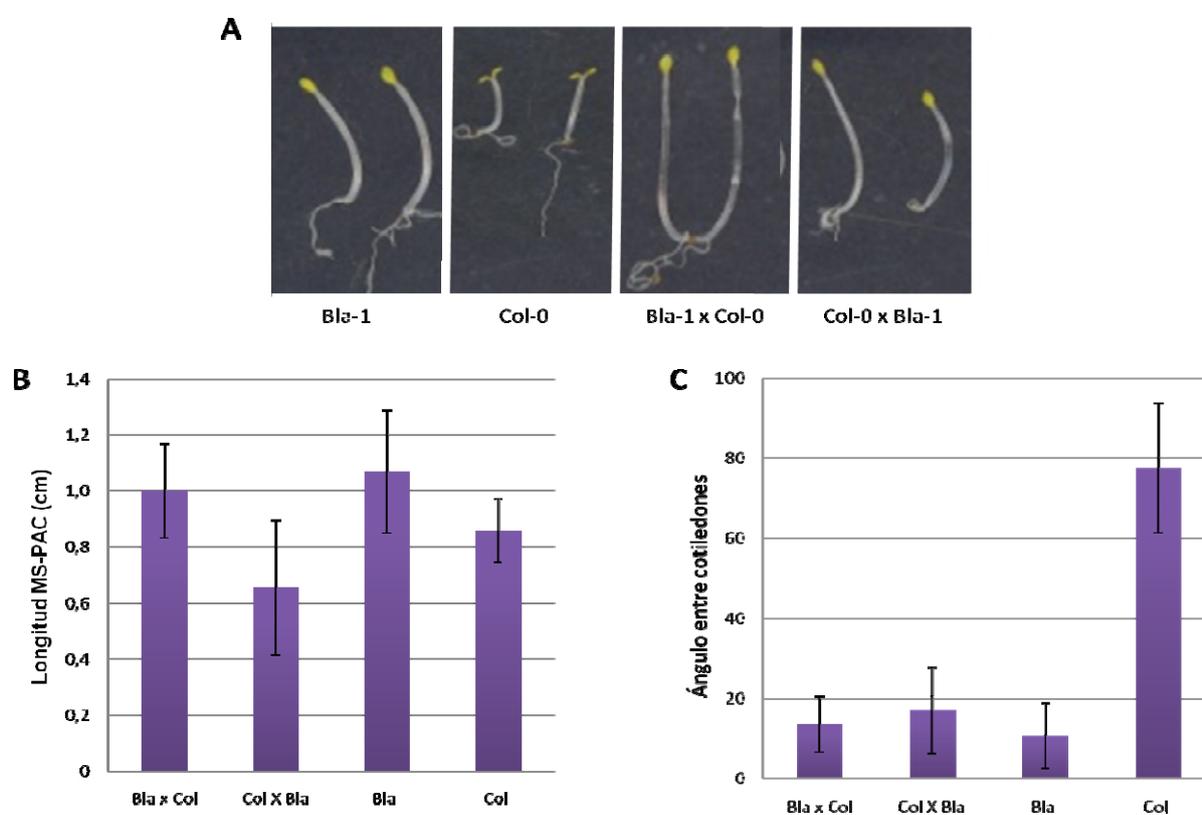


Figura 9. Col-0 x Bla-1. a) Fenotipo de la F1 del cruce Bla-1 x Col-0 y recíproco. b) Diferencia en la longitud de hipocotilo medida en MS menos la obtenida en PAC 1 μ M. c) Ángulo de apertura entre los cotiledones en PAC 1 μ M.

A la vista de los resultados obtenidos se podría decir que hay uno o más alelos con efecto dominante que contribuyen en la hipersensibilidad de la accesión Bla-1 y la pregunta que se planteaba en este momento es si *GAI^{Bla}* era uno de estos alelos. El truncamiento de esta proteína parecía implicar una pérdida de función que explicaría su fenotipo, sin embargo, si *GAI^{Bla}* fuese un alelo nulo sería recesivo.

El hecho de que GAI en la accesión Bla-1 no sea claramente un alelo nulo, no invalida la hipótesis de que GAI sea el gen responsable del fenotipo de Bla-1, porque la versión truncada de GAI podría actuar como un dominante negativo; es decir, de alguna manera el alelo GAI de esta accesión interferiría en la actividad de las demás proteínas DELLA (Figura 10).

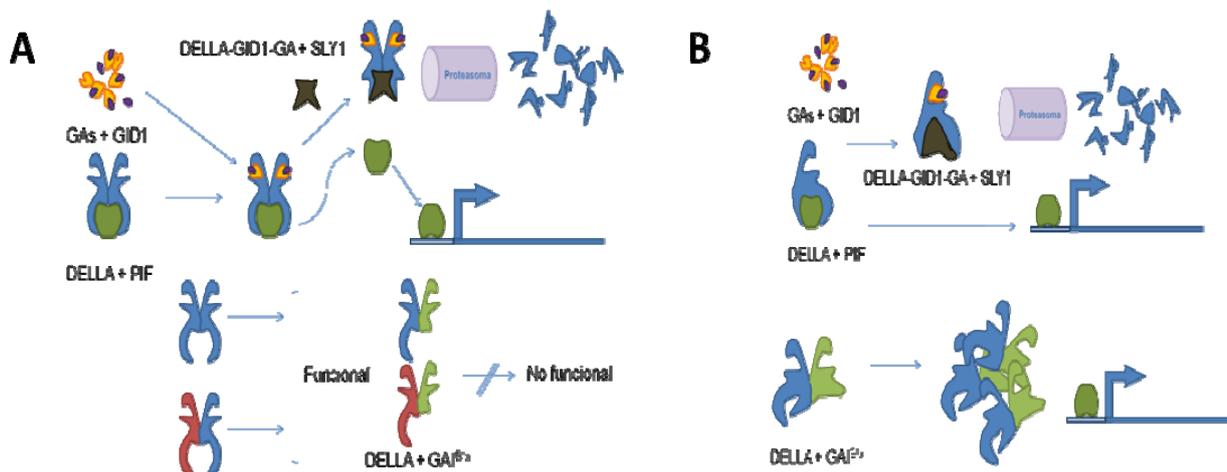


Figura 10. Modelos teóricos de la interacción de GAI^{Bla} con el resto de proteínas DELLA. a) Las proteínas DELLA, formarían dímeros que estarían reprimiendo la actividad de los elementos PIF. En oscuridad, el complejo formado por las GAs y los receptores GID se une a las DELLA, induciendo un cambio conformacional que libera a PIF permitiendo por un lado la transcripción de los genes de escotomorfogénesis y por otro lado la unión de SLY, la ubiquitinación de las DELLA y su degradación vía proteasoma. b) Las proteínas DELLA son activas en forma monomérica, por lo que la presencia de GAI^{Bla} aumentaría el conjunto de dímeros inactivos permitiendo la acción de los elementos PIF.

Para determinar si GAI^{Bla} actuaba como un alelo dominante negativo interaccionando con el resto de DELLAs, debían cumplirse dos premisas: que se expresase *in vivo* y fuera insensible a GAs, y que formase dímeros, sobre todo heterodímeros GAI^{Bla}-RGA, ya que se ha visto que de las 5 DELLA presentes en *Arabidopsis*, GAI y RGA son las que contribuyen en mayor medida en la sensibilidad a GAs (Alabadi et al., 2004).

Al carecer de la región C-terminal, la proteína GAI^{Bla} no interaccionaría con el complejo SCF y no se degradaría al aplicar GAs (Harberd et al., 2009), por lo que se infiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con la construcción 35S::GAI^{Bla}:YFP, y se observó la fluorescencia de YFP en el microscopio confocal antes y después de aplicar GAs (Figura 11). Se usaron como controles las construcciones 35S::GAI:YFP y 35S::gai-1:YFP, ya que GAI silvestre se degrada rápidamente al aplicar GAs y gai-1, que carece del motivo DELLA y no puede interaccionar con el complejo GID1-GA, es un alelo insensible a GAs. Al igual que gai-1, GAI^{Bla} se mantiene estable incluso 24 horas después de aplicar GAs.

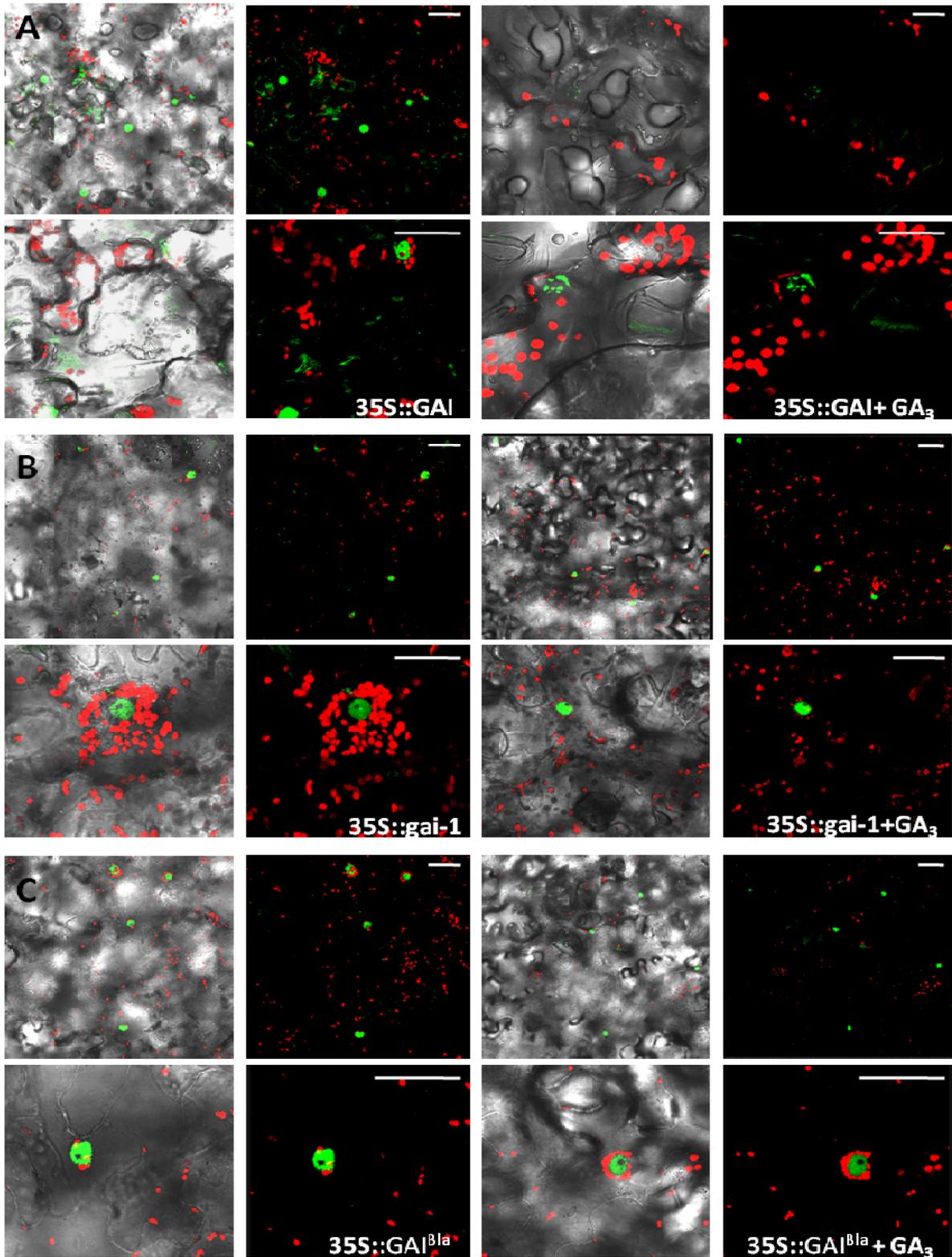


Figura 11. Expresión transitoria. La primera imagen corresponde a la superposición de campos y la segunda a la fluorescencia de YFP (verde) y de los cloroplastos (rojo). **a)** Expresión transitoria de 35S::GAI::YFP en hojas de *Nicotiana benthamiana* antes y después de la aplicación de GA₃ 50 μM. Se puede observar una clara reducción del número de núcleos, así como una diferencia en la estructura de los mismos. **b)** Expresión transitoria de 35S::gai-1::YFP en *N. benthamiana* antes y después de la aplicación de GA₃ 50 μM. No se observan diferencias significativas antes y después del tratamiento. **c)** Expresión transitoria de 35S::GAI^{Bla}::YFP en *N. benthamiana* antes y después de la aplicación de GA₃ 50 μM. No se observan diferencias significativas antes y después del tratamiento.

Para determinar la interacción entre las proteínas DELLA se empleó el sistema de doble híbrido en levadura. En primer lugar se comprobó mediante western blot que todas las construcciones se expresaban de manera equiparable en las levaduras (Figura 12).

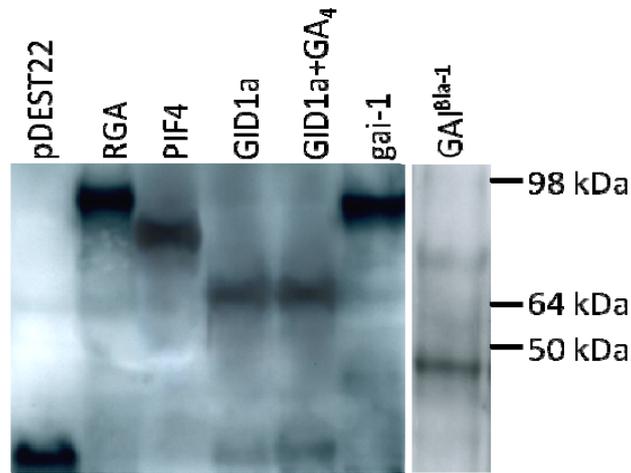


Figura 12. Western blot. Abundancia de las distintas proteínas (pDEST22:X) en extractos de levadura. 30 µg de proteína detectados con anticuerpo anti-BD.

Debido a que el alelo GAI^{Bla} posee el dominio DELLA, como control positivo se usó la pareja GAI^{Bla} -GID1a (Griffiths et al., 2006). Como controles negativos se usaron las parejas GAI^{Bla} con el vector vacío pDEST22 y GAI^{Bla} con PIF4, ya que al carecer del extremo C-terminal GAI^{Bla} debería ser incapaz de interactuar con los elementos PIF (Itoh et al., 2002). Se obtuvieron los resultados esperados en las interacciones control; sin embargo, como se puede ver en la Figura 13-a, la proteína GAI^{Bla} , a pesar de su pequeño tamaño, es capaz de activar por sí sola la transcripción del gen *HIS3* y por tanto las colonias son capaces de crecer en un medio sin histidina.

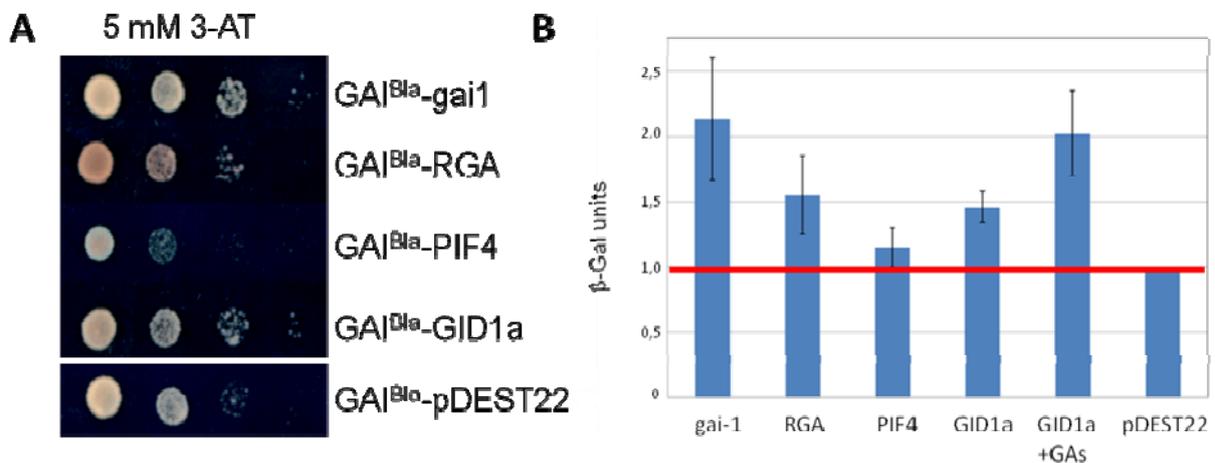


Figura 13. Doble híbrido de levadura. a) Colonias creciendo en medio His⁻, Leu⁻, Trp⁻ a una concentración de 3AT de 5 mM. b) Ensayo β -Gal de las interacciones de GAI^{Bla} con distintas proteínas de la vía de señalización de GAs.

Para el ensayo β -Gal (Figura 13-b) en el que la interacción entre proteínas activa la transcripción del gen *lacZ*, se utilizaron los mismos controles y se añadió como control positivo la pareja GAI^{Bla} -GID1a con GA_4 en el medio de cultivo (Griffiths et al., 2006). Como se puede ver en la figura no se observa señal en el control negativo GAI^{Bla} -PIF4, se observa un aumento de la señal de 1,5 veces en la interacción GAI^{Bla} -GID1a que aumenta en presencia de GAs, y tiene lugar un aumento de la señal tanto en la formación del homodímero como del heterodímero.

Con el fin de averiguar si las interacciones observadas en levadura tenían lugar también en planta, se llevó a cabo un ensayo de Complementación Bimolecular de Fluorescencia en hojas de *N. benthamiana* con las proteínas GAI^{Bla} , *gai-1*, RGA y *GAI* fusionadas a los fragmentos N-terminal y C-terminal de la proteína YFP (Figura 14). Tres días después de la agro-infiltración, se observaron las plantas en el microscopio confocal demostrando la formación del homodímero DELLA y del heterodímero entre RGA y *GAI*.

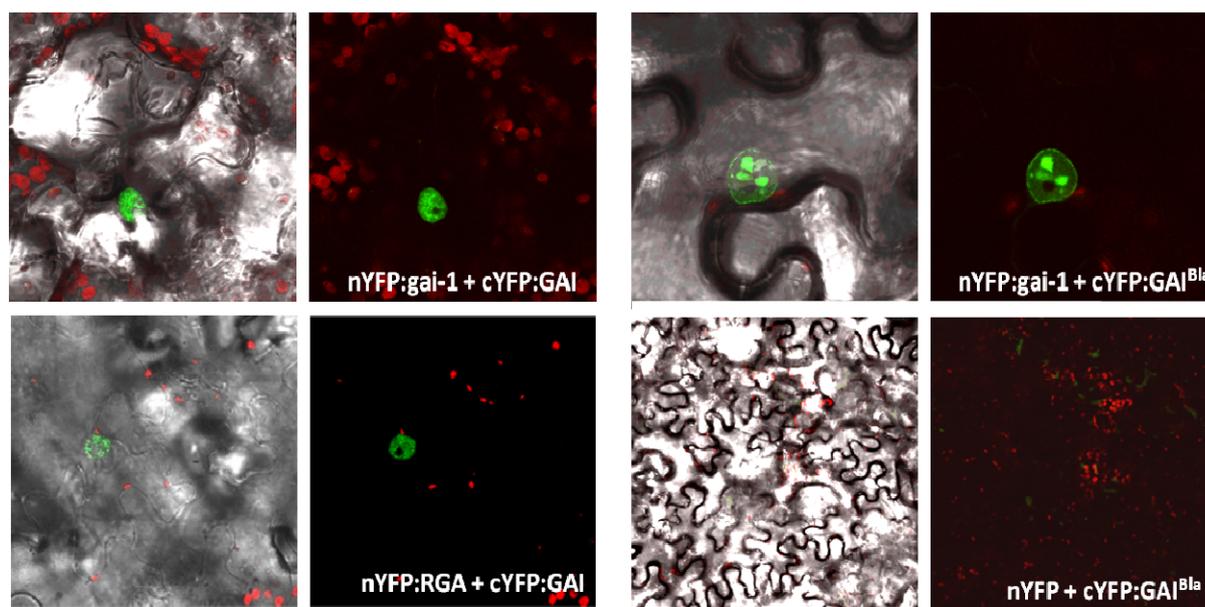


Figura 14. Ensayo BiFC para las interacciones con la proteína GAI^{Bla} . Fluorescencia de YFP en los núcleos de las células de *N. benthamiana* después de agro-infiltrar. La primera imagen corresponde a la superposición de campos y la segunda a la fluorescencia de YFP (verde) y de los cloroplastos (rojo).

En último lugar, para determinar si el fenotipo observado en la F1 del cruce Col-0 x *Bla-1* era debido únicamente a la contribución de GAI^{Bla} , se generaron líneas homocigotas Col-0 transformadas con la construcción 35S:: GAI^{Bla} :YFP (Figura 15).

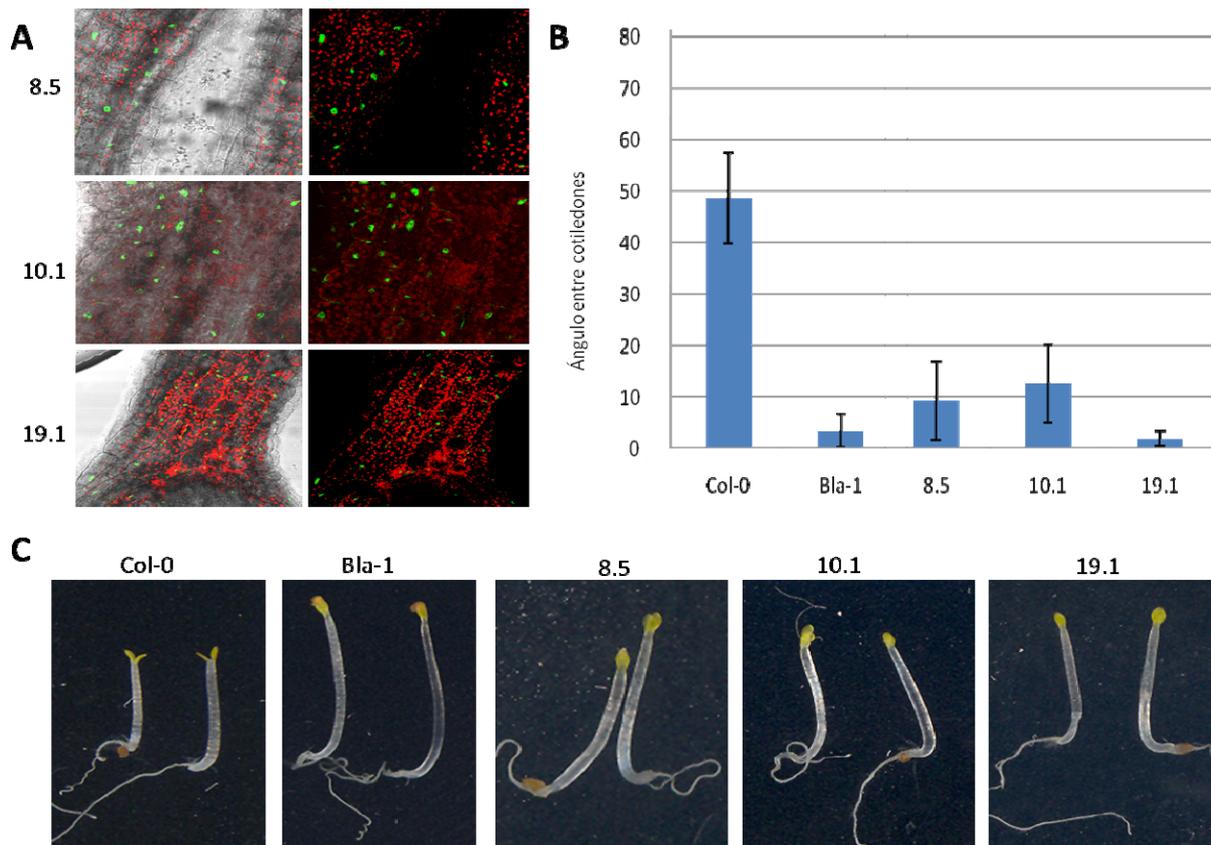


Figura 15. Apertura de cotiledones en líneas homocigotas Col-GAI^{Bla}. a) Expresión de YFP en plántulas de 3 líneas homocigotas cultivadas 7 días en oscuridad (PAC 1 μ M). b) Apertura en grados de los cotiledones de las 3 líneas homocigotas y de las accesiones Col-0 y Bla-1. c) Fenotipo de las 3 líneas homocigotas y de las accesiones Col-0 y Bla-1.

En primer lugar se comprobó la estabilidad de la construcción 35S::GAI^{Bla}:YFP en todas las líneas generadas (Figura 15-a). A continuación se midió la apertura de los cotiledones de las líneas homocigotas Col-GAI^{Bla} cultivadas siete días en oscuridad en presencia de PAC 1 μ M, encontrando que tres líneas tenían los cotiledones con una apertura menor de 10° o completamente cerrados (Figura 15-b, c). Con estos resultados podemos confirmar que la hipersensibilidad a GAs de la accesión Bla-1 se debe a la contribución de la proteína GAI^{Bla}.

3.5 Análisis de QTLs.

Para poder concretar qué otros loci están implicados en la variación genética natural de la sensibilidad a GAs en oscuridad hemos empezado un análisis de QTLs. Para este abordaje estamos usando una colección de RILs (*Recombinant Inbred Lines*) generada a partir del cruce entre *Ler* y No-0 (Magliano et al., 2005), dos accesiones con comportamientos distintos en presencia de PAC: *Ler* con una apertura de unos 60° y No-0 con los cotiledones

casi cerrados en respuesta a PAC 1 μ M. La población obtenida comprende 137 RILs cuyos mapas genéticos individuales han sido establecidos mediante el análisis de 46 polimorfismos en los cinco cromosomas (Magliano et al., 2005).

El examen fenotípico inicial ha tenido como resultado la identificación de un QTL asociado a la sensibilidad diferencial frente a PAC en la oscuridad. Dicho QTL está localizado entre los genes *PHYB* y *ER* en el cromosoma II, y cubre una región de aproximadamente 2 cM, que equivalen a 500 Kb (\approx 700 genes) (Figura 16).

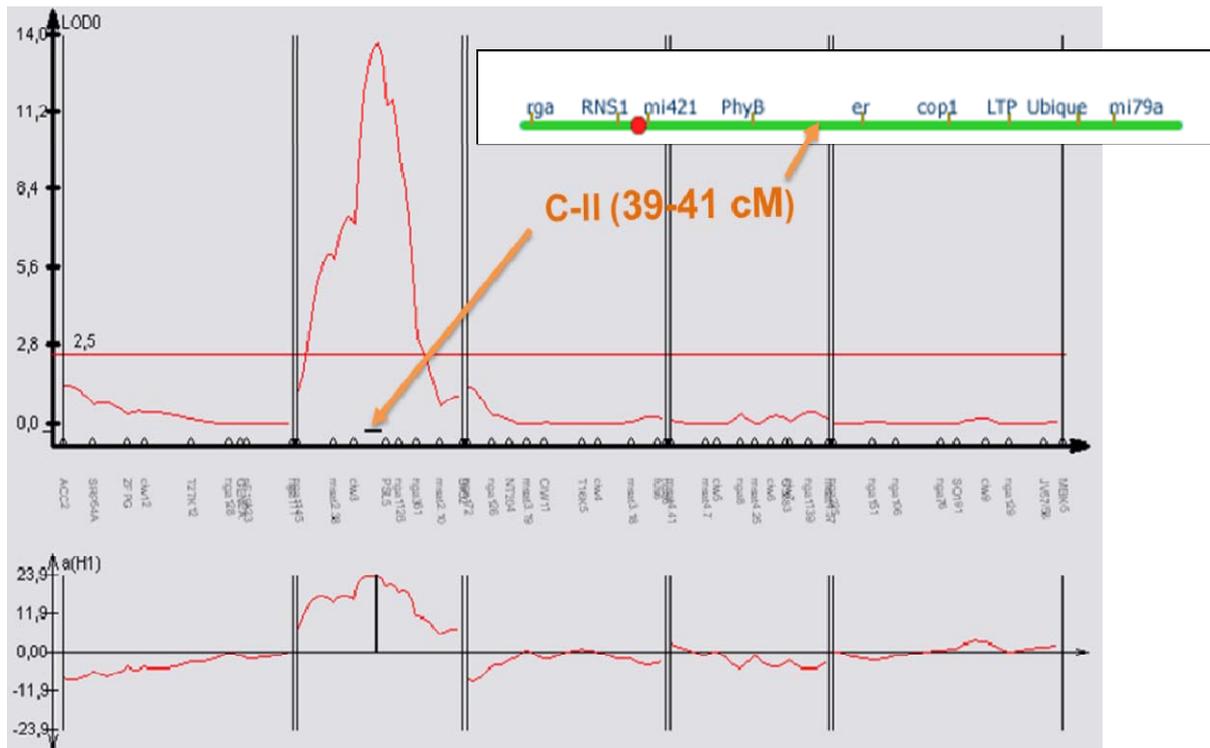


Figura 16. Análisis de QTLs (No-o x Ler). QTL encontrado por el programa “WIN QTL cartographer” en el cromosoma II asociado a la apertura de cotiledones. En la gráfica de la aditividad (abajo), que representa las medias debidas a la contribución de ambos parentales, se puede ver que el QTL se debe al parental A, es decir a Ler.

El principal objetivo que se plantea a la vista de estos resultados es aislar y caracterizar molecularmente el gen o genes que regulan el proceso de desetiología en la oscuridad en ausencia de GAs, responsable del QTL identificado.

4. Discusión

El objetivo del abordaje que se ha iniciado con este trabajo es contestar a la pregunta de si **la represión que ejercen las giberelinas sobre la fotomorfogénesis en la oscuridad tiene un valor adaptativo**; es decir, si la naturaleza ha sometido a presión selectiva a esta vía de señalización para permitir la adaptación de distintas variedades a sus nichos ambientales. La observación de que existe un alto grado de variabilidad fenotípica (examinando los ángulos entre cotiledones y la longitud de los hipocotilos) en la respuesta de poblaciones naturales de *Arabidopsis* frente a la falta de giberelinas, es un buen indicio de que esta regulación puede tener valor adaptativo, aunque para poder realizar esta afirmación con seguridad tendrían que cumplirse otros requisitos. Por ejemplo, deberíamos encontrar una correlación entre el grado de sensibilidad o resistencia a la falta de giberelinas, y factores ambientales propios del hábitat de cada variedad natural; sin embargo, el único dato disponible en el banco de germoplasma es la latitud y la longitud que determinan la localización inicial de cada accesión, y ninguno de estos parámetros muestra correlación con la sensibilidad a giberelinas (datos no mostrados). Probablemente son otros parámetros (como la calidad de la luz recibida, o el nivel de sombra provocada por vegetación vecina, o la temperatura media) los que resultan más importantes en la etapa del desarrollo que hemos estudiado.

En general, el análisis de asociación entre variaciones alélicas en genes candidatos y el grado de sensibilidad a giberelinas no ha resultado muy informativo, y la presencia de polimorfismos en los genes analizados requiere un estudio más detallado para averiguar si estas alteraciones afectan a la función proteica. Algunos de estos polimorfismos de los genes *RGA*, *PIF3* y *GID1a* aparecen en otras plantas como *O. sativa* o *V. vinifera*, indicando que no son residuos esenciales para la función de estas proteínas. En el caso de *GID1b* hemos encontrado numerosos polimorfismos a nivel intrónico: en Sorbo y Ost-0 (accesiones sensibles a PAC) hay una inserción de 31 nucleótidos. Como se ha visto en eucariotas que hay una relación directa entre el mayor tamaño del intrón y un aumento en la tasa de transcripción, podría ocurrir que en estas accesiones tuviera lugar un aumento en el conjunto de estos receptores que podría activar un mecanismo de degradación de exceso de GIDs, promoviendo una mayor desetiología en la oscuridad. En la accesión Ga-0 (accesión sensible a PAC) hay dos inserciones de ocho nucleótidos en el intrón de *GID1b*, pero además la segunda inserción que viene después de una zona rica en pirimidinas termina en un par AG, lo que podría

generar una zona aceptora de splicing alternativa: el exón 2 no es reconocido y no es introducido en el mRNA procesado (*exon skipping*) o se ve alterada toda la pauta de lectura dando lugar a una proteína totalmente distinta. Un alelo nulo de este receptor podría explicar la mayor desetiación en la oscuridad de esta accesión.

El único caso en el que podría establecerse una conexión entre el fenotipo de hipersensibilidad a GAs y un gen concreto sería el de Bla-1. El truncamiento de la proteína GAI en esta accesión daría como resultado una proteína no funcional, y se sabe que un alelo nulo de *GAI* en *Ler* también provoca hipersensibilidad a GAs respecto a la apertura de cotiledones (Alabadi et al., 2008). Sin embargo, el hecho de que la hipersensibilidad de Bla-1 sea dominante dificulta la atribución de la causa al alelo GAI^{Bla} , salvo que se trate de un alelo dominante negativo. Nuestros resultados indican que GAI^{Bla} en efecto se puede expresar como proteína truncada y estable en presencia de GAs, y además es capaz de interactuar con otras proteínas DELLA como RGA, lo que da cuerpo a la hipótesis de que la hipersensibilidad de Bla-1 está asociada a la mutación en *GAI*. No obstante, la prueba más contundente es la inducción de hipersensibilidad a GAs en la accesión Col-0 mediante la introducción del gen *GAI* truncado como en Bla-1. Por lo tanto, salvo que la actividad observada dependa de los 24 aminoácidos extra que se añaden como consecuencia del truncamiento (Figura 8), nuestros resultados indican que las proteínas DELLA pueden formar heterodímeros en *Arabidopsis*, algo ya sugerido en el caso de arroz, donde sólo existe una proteína DELLA (Itoh et al., 2002).

Es interesante que una accesión haya seleccionado un alelo mutante de *GAI*, ya que este gen también ha resultado ser diana durante la domesticación de cereales en la revolución verde, así como en la aparición de la variedad *Pinot Meunier* de vid (Boss and Thomas, 2002). Nuestro hallazgo extiende el valor de *GAI* a la selección en condiciones naturales.

Como ya se ha descrito en numerosos trabajos, muchos procesos regulados por GAs también están regulados por otros estímulos y señales endógenas (Alabadi and Blazquez, 2009). Los mecanismos moleculares de estas interacciones se están resolviendo poco a poco, aunque queda todavía por determinar si las mismas accesiones con mayor sensibilidad/resistencia a GAs en el mecanismo de desetiación en la oscuridad, también muestran el mismo comportamiento frente a los BRs, las otras hormonas que también reprimen la fotomorfogénesis en la oscuridad (Li et al., 1996; Alabadi et al., 2004).

5. Conclusiones

- ❖ Existe un alto grado de variación natural en la sensibilidad a GAs durante la regulación de la fotomorfogénesis, lo que sugiere que este mecanismo puede presentar valor adaptativo en *Arabidopsis*.
- ❖ No parece existir correlación entre el fenotipo de sensibilidad a GAs y los polimorfismos encontrados en los genes con mayor papel conocido en la regulación por GAs de la fotomorfogénesis, salvo en el caso de GAI en la accesión Bla-1.
- ❖ El alelo GAI^{Bla} se comporta como un alelo dominante negativo que interferiría con la actividad del resto de proteínas DELLA.
- ❖ Hay al menos un QTL asociado a la regulación de la fotomorfogénesis por GAs entre las accesiones *Ler* y No-0 que se encuentra situado en el cromosoma II.

6. Materiales y métodos

6.1 Preparación de medios de cultivo.

El medio de crecimiento utilizado fue el de Murashige-Skoog: 2,2 g de MS, 15 g de sacarosa, 0,5 g de tampón MES y 7 g de *PhytoAgar*. Se ajustó el pH hasta 5,7 con NaOH o KOH 5M. El medio se autoclavó antes de verterlo en las placas. A las placas se les añadió PAC 1 μ M en acetona, o sólo acetona en las placas control.

6.2 Siembra.

Las semillas se esterilizaron y se colocaron espaciadas sobre las placas. Métodos de esterilización:

6.2.1 Incubando las semillas durante 3 minutos en una solución de etanol 70 % y SDS 0,5 % (100 μ l /100 semillas), y un posterior lavado de 1 minuto con etanol 96 %, dejando que las semillas se sequen en un papel antes de depositarlas sobre las placas.

6.2.2 Incubando las semillas secas durante 5-6 horas en una atmósfera cerrada saturada con gas, producto de la mezcla de 100 ml de lejía con 3 ml de HCl 37 %.

6.3 Condiciones de crecimiento.

Después de sembrar y sellar las placas, se envolvieron en papel de aluminio para evitar la luz y se mantuvieron a 4° C durante 6-8 días para romper el letargo y sincronizar la germinación. A continuación se indujo la germinación durante 24 h en luz blanca a 20° C y se volvieron a tapar las placas para su posterior análisis pasados 7 días.

6.4 Extracción DNA genómico, purificación y amplificación.

6.4.1 Extracción de DNA genómico. Se trituraron 20 mg de tejido verde y fresco con un émbolo en un tubo Eppendorff. Se añadió el tampón de extracción (50 ml Tris-HCl 1M pH 7,5; 12,5 ml NaCl 5M; 12,5 ml EDTA; 12,5 ml SDS 10 %; 162,5 ml H₂O), se homogenizó y se centrifugó. Se añadió un volumen de isopropanol al sobrenadante para precipitar el DNA y se centrifugó, eliminando el sobrenadante. Se dejaron secar los tubos abiertos y se resuspendió el DNA en 100 μ l de H₂O. El DNA extraído se conservó a -20° C.

6.4.2 Purificación de DNA amplificado producto de PCR. El DNA amplificado y purificado se cuantificó en el *Nanodrop*[™], y se utilizaron 40-50 µg /µl para secuenciar un fragmento de aproximadamente 1000 pb. Métodos de purificación empleados:

- a. Kit de *Qiagen*[™]: según las instrucciones del fabricante.
- b. Fenolización. Sobre 40 µl del producto de PCR se añadieron 260 µl de H₂O y 300 µl de fenol:cloroformo. Se centrifugó para ayudar a separar las fases y se extrajo la fase acuosa. Se añadió acetato de sodio 3M pH 5,3, 2,5 volúmenes de etanol 100% y se incubaron las muestras 1h a -80°C. Con el fin de precipitar el DNA se centrifugaron las muestras a 15000 rpm durante 15 min a 4°C. A continuación se llevaron a cabo varios lavados con etanol 70 % y 100 % para retirar todas las sales. Se volvió a centrifugar y se dejaron secar. El DNA se resuspendió en 20-40 µl de H₂O.

6.4.3 Condiciones PCR: 15'' a 94° C para la desnaturalización, 30'' a 58° C para la hibridación de los oligos y 1'30'' a 72° C para la elongación de la cadena. La polimerasa utilizada fue la Taq de *NETZIME*[™] y el DNA amplificado se comprueba en geles de agarosa 1 % con bromuro de etidio.

6.5 Análisis de las plántulas.

Se obtuvo una imagen escaneada de al menos 16 plántulas por condición y genotipo, y se analizó el ángulo entre los cotiledones y la longitud del hipocotilo con el programa *ImageJ*.

6.6 Ensayo del doble híbrido de levadura.

Se han utilizado los vectores de Gateway® pDEST[™]22 y pDEST[™]32. En primer lugar, se generó una fusión entre el ORF de GAI^{Bla} y el dominio de unión a DNA en el vector pDEST[™]32. Las demás ORFs se fusionaron al dominio de activación en el vector pDEST[™]22.

6.7 Complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC).

Para generar las construcciones se amplificaron los genes GAI^{Bla}, PIF3, GAI, gai-1, RGA y GID1a, y se clonaron en distintos vectores donadores. A continuación se clonaron en los vectores pYFN43 y pYFC43 mediante reacción LR, obteniéndose las siguientes construcciones: nYFP-PIF3, cYFP-PIF3, cYFP-GAI, nYFP-RGA, nYFP-GAI^{Bla}, cYFP-GAI^{Bla}, nYFP-gai-1 y cYFP-gai-1. Se transformaron células de *Agrobacterium tumefaciens*

(cepa C-58) con las que se infiltraron hojas de *N. benthamiana* mediante una jeringuilla. El medio de infiltración se preparó con MgCl_2 1M, MES 100 mM y acetosiringona 500X. Las plantas se mantuvieron en el invernadero durante tres días antes de su observación en el microscopio confocal.

6.8 Expresión transitoria.

Se realizaron las siguientes construcciones: 35S::GAI:YFP, 35S::gai:YFP y 35S::GAI^{Bla}:YFP. Se transformaron células de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C-58) y se infiltraron hojas de *N. benthamiana* con los cultivos correspondientes de *Agrobacterium* mediante una jeringuilla, a razón de dos plantas por construcción. Se analizó la expresión de YFP tres días después de la agro-infiltración. Se roció una planta de cada construcción con una disolución de GA₃ 50 μM y se observó la diferencia de señal a las 24 horas de las plantas +GA₃ frente a las plantas -GA₃.

6.9 Análisis de QTLs.

El análisis se llevó a cabo con las RILs generadas entre Landsberg erecta (*Ler*) y Nossen (No-0). Se sembraron 137 líneas en las mismas condiciones utilizadas para el rastreo inicial de accesiones con fenotipos extremos. Se obtuvo una imagen escaneada de al menos 10 plántulas por condición y línea, y se analizó el ángulo entre los cotiledones y la longitud del hipocotilo con el programa *ImageJ*.

7. Referencias bibliográficas

- Alabadi, D., and Blazquez, M.A.** (2009). Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. *Plant Mol Biol* **69**, 409-417.
- Alabadi, D., Gil, J., Blazquez, M.A., and Garcia-Martinez, J.L.** (2004). Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol* **134**, 1050-1057.
- Alabadi, D., Gallego-Bartolome, J., Orlando, L., Garcia-Carcel, L., Rubio, V., Martinez, C., Frigerio, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Espinosa, A., Deng, X.W., and Blazquez, M.A.** (2008). Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. *Plant J* **53**, 324-335.
- Alonso-Blanco, C., Mendez-Vigo, B., and Koornneef, M.** (2005). From phenotypic to molecular polymorphisms involved in naturally occurring variation of plant development. *Int J Dev Biol* **49**, 717-732.
- Boss, P.K., and Thomas, M.R.** (2002). Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature* **416**, 847-850.
- Casal, J.J., Fankhauser, C., Coupland, G., and Blazquez, M.A.** (2004). Signalling for developmental plasticity. *Trends Plant Sci* **9**, 309-314.
- Dill, A., Jung, H.S., and Sun, T.P.** (2001). The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14162-14167.
- Dill, A., Thomas, S.G., Hu, J., Steber, C.M., and Sun, T.P.** (2004). The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* **16**, 1392-1405.
- Fu, X., Richards, D.E., Fleck, B., Xie, D., Burton, N., and Harberd, N.P.** (2004). The Arabidopsis mutant *sleepy1gar2-1* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF^{SLEEPY1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell* **16**, 1406-1418.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T.P., and Thomas, S.G.** (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 3399-3414.
- Harberd, N.P., Belfield, E., and Yasumura, Y.** (2009). The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an "inhibitor of an inhibitor" enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell* **21**, 1328-1339.
- Holm, M., and Deng, X.W.** (1999). Structural organization and interactions of COP1, a light-regulated developmental switch. *Plant Mol Biol* **41**, 151-158.
- Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sato, Y., Ashikari, M., and Matsuoka, M.** (2002). The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *Plant Cell* **14**, 57-70.
- Li, J., Nagpal, P., Vitart, V., McMorris, T.C., and Chory, J.** (1996). A role for brassinosteroids in light-dependent development of Arabidopsis. *Science* **272**, 398-401.
- Ma, L., Gao, Y., Qu, L., Chen, Z., Li, J., Zhao, H., and Deng, X.W.** (2002). Genomic evidence for COP1 as a repressor of light-regulated gene expression and development in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 2383-2398.
- Magliano, T.M., Botto, J.F., Godoy, A.V., Symonds, V.V., Lloyd, A.M., and Casal, J.J.** (2005). New Arabidopsis recombinant inbred lines (Landsberg erecta x Nossen) reveal natural variation in phytochrome-mediated responses. *Plant Physiol* **138**, 1126-1135.
- McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.P., and Steber, C.M.** (2003). The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **15**, 1120-1130.

- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y.C., Park, S.H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., Maeda, T., Matsuoka, M., and Yamaguchi, I.** (2006). Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *Plant J* **46**, 880-889.
- Ni, M., Tepperman, J.M., and Quail, P.H.** (1998). PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* **95**, 657-667.
- Peng, J., and Harberd, N.P.** (1993). Derivative Alleles of the Arabidopsis Gibberellin-Insensitive (*gai*) Mutation Confer a Wild-Type Phenotype. *Plant Cell* **5**, 351-360.
- Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N., and Sun, T.** (1998). The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10**, 155-169.
- Somers, D.E., Sharrock, R.A., Tepperman, J.M., and Quail, P.H.** (1991). The *hy3* Long Hypocotyl Mutant of Arabidopsis Is Deficient in Phytochrome B. *Plant Cell* **3**, 1263-1274.
- Yadav, V., Kundu, S., Chattopadhyay, D., Negi, P., Wei, N., Deng, X.W., and Chattopadhyay, S.** (2002). Light regulated modulation of Z-box containing promoters by photoreceptors and downstream regulatory components, COP1 and HY5, in Arabidopsis. *Plant J* **31**, 741-753.