



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y
Celular de Plantas

Control de la plasticidad ambiental por las proteínas DELLA

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Wu , Siyi

Tutor/a: Mulet Salort, José Miguel

Cotutor/a: Agusti Feliu, Javier

Director/a Experimental: BLAZQUEZ RODRIGUEZ, MIGUEL ANGEL

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

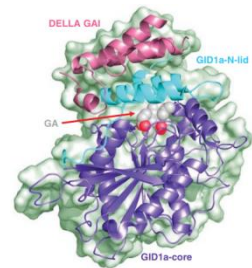


Trabajo de Fin de Máster

Control de la plasticidad ambiental por las proteínas DELLA



Siyi Wu



Director:
Miguel Ángel Blázquez



Enero 2023

Valencia



Control de la plasticidad ambiental por las proteínas DELLA

Trabajo de fin de Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

Autor:

Siyi Wu

Director:

Miguel Ángel Blázquez

Tutor UPV:

Javier Agustí Felú

Enero 2023

Valencia

Agradecimientos

Este trabajo no habría sido posible sin el apoyo y la ayuda de mucha gente. Quisiera aprovechar este espacio para expresar mi agradecimiento, en primer lugar, a mi director, Miguel Ángel Blázquez, por proporcionarme referencias y guiarme en todo momento. Mi gratitud a él también por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo como estudiante durante este año que, sin duda, ha sido decisivo en mi formación académica. No solo en mi carrera experimental, sino también en mi vida, ha agregado mucho color.

También quisiera mostrar mi agradecimiento igualmente a todos los compañeros de los laboratorios 2.07 y 2.08, que nunca han dudado en ayudarme y han hecho todo lo posible para ayudarme con cualquier solicitud. Entre ellos, especial mención a Paula Brunot Garau y Cristina Úrbez. Siempre me echan una mano cuando estoy perdida, y cuando les pido ayuda, dejan lo que tienen entre manos y hacen todo lo posible por ayudarme. Y a menudo me preguntan sobre mis resultados y el progreso experimental. Este trabajo no habría sido posible sin ellas. Del mismo modo, también quiero expresar mi agradecimiento a Laura, Cecilia y Alberto del laboratorio 2.08, quienes sacaron tiempo de sus apretadas agendas para enseñarme Western blot y microscopía confocal.

Por otra parte, también quisiera dar las gracias a mis compañeros de clase. Como no soy española, creo que mi Máster habría sido más difícil de lo que ha sido si no hubiera tenido su ayuda. Aquí, me gustaría agradecer especialmente a María González Bermúdez: no conocería la belleza del sur de España sin ella, lo que me permitió integrarme más rápidamente a España y experimentar las costumbres locales. También estoy muy agradecida a Marina, estudiamos juntas antes del examen y lo hemos pasado difícil pero feliz. También me gustaría agradecer a Eva y Laura por responder pacientemente a mis preguntas sobre el curso.

Finalmente, debo expresar solemnemente mi agradecimiento a mi familia. Sin su aliento y apoyo espiritual y económico, definitivamente no hubiera podido culminar esta difícil pero feliz carrera de Máster.

También tengo en cuenta las diversas sugerencias y recordatorios que he recibido durante el último año y medio. Por eso estoy agradecida a aquellos que han estado escuchando mis balbuceos interminables y dándome buenos consejos. Es realmente difícil resumir en unas pocas líneas a todas las personas que han sido decisivas en este trabajo a su manera y me han influido y animado en esta etapa y me han ayudado en mi vida sin querer quitarle el tiempo a nadie. Expreso todo mi agradecimiento a todos los mencionados aquí (directa e indirectamente) y a todos mis maravillosos amigos. Muchas gracias a todos.

He abrazado a muchas personas antes de esto, y también estoy muy agradecida a quienes me han abrazado.

RESUMEN

La plasticidad es la capacidad de un genotipo determinado de conferir fenotipos distintos según las condiciones ambientales. Entre las estrategias utilizadas por las plantas para adaptarse al entorno, las hormonas juegan un papel importante como integradoras de señales ambientales, y entre ellas la contribución de las giberelinas (y sus elementos principales de señalización, las proteínas DELLA) es la más extensa porque afecta a procesos a lo largo de toda la vida de la planta. Aunque se sabe que las giberelinas modulan la amplitud de la respuesta a distintas señales (luz, disponibilidad de nutrientes, temperatura...), no se ha estudiado si también ayudan a fijar el grado de plasticidad, entendido como el rango de intensidades de señales que una planta puede reconocer y a las que debe responder. En este trabajo hemos estudiado el comportamiento de distintos aspectos del desarrollo de mutantes de ganancia (*gai-1*, *rga-Δ17*) y pérdida de función (*dellaKO*) de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a gradientes de varias señales ambientales. Nuestros resultados indican que las giberelinas y las proteínas DELLA influyen en la plasticidad de las plantas frente a varias señales ambientales (intensidad de luz, disponibilidad de nutrientes, y disponibilidad de agua) al analizar el tamaño del hipocotilo y el crecimiento de la raíz. Por otra parte, el análisis de los niveles de proteínas DELLA en distintas intensidades de luz indica que su acumulación no correlaciona con su efecto en el crecimiento del hipocotilo, por lo que el mecanismo por el que las proteínas DELLA regularían la plasticidad es aún desconocido.

Palabras clave: DELLA, plasticidad ambiental, luz, señalización, giberelinas

ABSTRACT

Plasticity is the ability of a given genotype to confer distinct phenotypes depending on environmental conditions. Among the strategies used by plants to adapt to the environment, hormones play an important role as integrators of environmental signals, and among them the contribution of gibberellins (and their main signaling elements, the DELLA proteins) is the most extensive because it affects to processes throughout the life of the plant. Although it is known that gibberellins modulate the amplitude of the response to different signals (light, availability of nutrients, temperature...), it has not been studied whether they also help to set the degree of plasticity, understood as the range of signal intensities that a plant can recognize and to which it must respond. In this work we have studied the behavior of different aspects of the development of gain (*gai-1*, *rga-Δ17*) and loss-of-function (*dellaKO*) mutants of *Arabidopsis thaliana* in response to gradients of various environmental signals. Our results indicate that gibberellins and DELLA proteins influence plant plasticity under various environmental cues (light intensity, nutrient availability, and water availability) by analyzing hypocotyl size and root growth. On the other hand, the analysis of DELLA protein levels at different light intensities indicates that their accumulation does not

correlate with their effect on hypocotyl growth, so the mechanism by which DELLA proteins regulate plasticity is still unknown.

Keywords: DELLA, environmental plasticity, light, signaling, gibberellins

RESUM

La plasticitat és la capacitat d'un genotip determinat de conferir fenotips diferents segons les condicions ambientals. Entre les estratègies utilitzades per les plantes per a adaptar-se a l'entorn, les hormones juguen un paper important com a integradores de senyals ambientals, i entre elles la contribució de les giberelinas (i els seus elements principals de senyalització, les proteïnes DELLA) és la més extensa perquè afecta processos al llarg de tota la vida de la planta. Encara que se sap que les giberelinas modulen l'amplitud de la resposta a diferents senyals (llum, disponibilitat de nutrients, temperatura...), no s'ha estudiat si també ajuden a fixar el grau de plasticitat, entès com el rang d'intensitats de senyals que una planta pot reconèixer i a les quals ha de respondre. En aquest treball hem estudiat el comportament de diferents aspectes del desenvolupament de mutants de guany (*gai-1*, *rga-Δ17*) i pèrdua de funció (*dellaKO*) de *Arabidopsis thaliana* en resposta a gradients de diversos senyals ambientals. Els nostres resultats indiquen que les giberelinas i les proteïnes DELLA influeixen en la plasticitat de les plantes enfront de diversos senyals ambientals (intensitat de llum, disponibilitat de nutrients, i disponibilitat d'aigua) en analitzar la grandària del hipocotilo i el creixement de l'arrel. D'altra banda, l'anàlisi dels nivells de proteïnes DELLA en diferents intensitats de llum indica que la seua acumulació no correlaciona amb el seu efecte en el creixement del hipocotilo, per la qual cosa el mecanisme pel qual les proteïnes DELLA regularien la plasticitat és encara desconegut.

Paraules clau: DELLA, plasticitat ambiental, llum, senyalització, giberelinas

摘要

可塑性是给定基因型根据环境条件赋予不同表型的能力。在植物适应环境的策略中，激素作为环境信号的整合者发挥着重要作用，其中赤霉素（及其主要信号元件 DELLA 蛋白）的贡献最为广泛，因为它影响过程在植物的整个生命周期中。虽然已知赤霉素调节对不同信号（光、营养物质的可用性、温度...）的反应幅度，但尚未研究它们是否也有助于设定可塑性程度，理解为信号范围植物可以识别并必须做出反应的强度。在这项工作中，我们研究了拟南芥的增益（*gai-1*, *rga-Δ17*）和功能丧失（*dellaKO*）突变体的不同方面的行为，以响应各种环境信号的梯度。我们的结果表明，通过分析下胚轴大小和根系生长，赤霉素和 DELLA 蛋白会影响植物在各种环境因素（光照强度、养分有效性和水有效性）下的可塑性。另一方面，对不同光强下 DELLA 蛋白水平的分析表明，它们的积累与其对下胚轴生长的影响无关，因此 DELLA 蛋白调节可塑性的机制仍然未知。

关键词: DELLA, 环境可塑性, 光, 信号, 赤霉素

ÍNDICE

Página

1 . INTRODUCCIÓN	6
1.1 Regulación ambiental del desarrollo de las plantas	6
1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo	6
1.3 La ruta de señalización por luz en <i>A. thaliana</i>	7
1.4 La señalización por giberelinas	7
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	13
3 . RESULTADOS	16
3.1. Análisis del efecto de las DELLA sobre la respuesta a intensidad de luz.	16
3.2. Análisis del efecto de las DELLA sobre la respuesta a disponibilidad de nutrientes.	18
3.3. Análisis del efecto de las DELLA sobre la respuesta frente a la disponibilidad de agua.	20
3.4. Variación de la actividad molecular de las proteínas DELLA en un entorno cambiante.	21
3.5. Análisis de los niveles de DELLA en un entorno cambiante.	22
4. DISCUSIÓN	26
5 .CONCLUSIONES	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	32
6.1 Materiales	32
6.1.1 Material vegetal	32
6.1.2 Medio de cultivo	32
6.2 Métodos	32
6.2.1 Manipulación de <i>Arabidopsis</i>	32
6.2.2. Tratamientos de intensidades de luz.	33
6.2.3. Tratamientos de limitación de agua.	33
6.2.4. Tratamientos de respuesta a la disponibilidad de nutrientes.	33
6.2.5 Detección de fluorescencia GFP en hipocotilos de plántulas	34
6.2.6. Extracción de proteínas y western blot.	34
6.2.7. Microscopia confocal.	34
6.2.8 Análisis de expresión génica	35
7. BIBLIOGRAFÍA	37
8. ANEXOS	42

1. INTRODUCCIÓN

1 . INTRODUCCIÓN

1.1 Regulación ambiental del desarrollo de las plantas

Una característica determinante de las plantas es su incapacidad para moverse, lo que les ha obligado a priorizar otras estrategias de adaptación al entorno. Al contrario que los animales, el desarrollo de las plantas no se reduce al embrión, sino que tiene lugar durante toda la vida de las plantas, incluso en los organismos adultos. Esto hace que decisiones importantes sobre la forma, el crecimiento, el número de órganos producidos, e incluso el tipo de órganos dependen de manera muy importante de las condiciones ambientales¹.

Entre las estrategias de adaptación al entorno, la regulación de los niveles de varias hormonas se ha propuesto como una de las más extendidas. Varias hormonas se han relacionado con aspectos concretos de la interacción con el entorno. Por ejemplo, el ácido abscísico es importante para la adaptación a la baja disponibilidad de agua ² ; el ácido jasmónico y el ácido salicílico se han relacionado con la respuesta frente a patógenos ³⁻⁵; los brasinoesteroides parecen mediar parte de la regulación por luz del crecimiento⁶; y las auxinas son necesarias para la reorientación de los órganos con respecto a la luz y a la gravedad ⁷ . Por último, se ha propuesto que las giberelinas (GAs) modulan a todas las demás rutas de señalización en función de las condiciones ambientales (luz, temperatura, disponibilidad de nutrientes, presencia de patógenos)⁸. El que las GAs participen en tantos procesos biológicos ha llevado a pensar que estas hormonas tienen una función clave en proporcionar **plasticidad** al desarrollo vegetal ^{1,9}.

1.2 *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo

La mayor parte de los estudios genéticos y moleculares sobre la señalización ambiental y las hormonas vegetales se han llevado a cabo con *A. thaliana* como organismo modelo. Las razones por las que esta planta es un perfecto sujeto de estudio son su pequeño genoma (150 Mb), su corto tiempo de generación (alrededor de 2 meses) y la facilidad de manejo. Además, también se dispone de una gran cantidad de líneas mutantes de inserción de T-DNA.¹⁰

Además, *A. thaliana* cuenta con la ventaja de tener dos órganos fáciles de analizar, cuya velocidad de crecimiento es el resultado de la integración de múltiples señales ambientales: la raíz y el hipocótilo.

1.3 La ruta de señalización por luz en *A. thaliana*

Las plantas utilizan la luz de muchas maneras diferentes: no solo convierten la energía solar en energía química a través del proceso de fotosíntesis, sino que también utilizan la luz como señal de información para controlar múltiples respuestas fisiológicas a lo largo de su ciclo de vida. Estas reacciones se denominan colectivamente fotomorfogénesis ¹¹. Las respuestas diferenciales de las plantas a la luz requieren una alta versatilidad en la maquinaria de percepción y transmisión de la información de la luz, que deben recoger una compleja información sobre su intensidad, dirección, duración y longitud de onda.

Se han identificado cuatro clases de fotorreceptores en *Arabidopsis*: fitocromos, criptocromos, receptores de luz UV, y otras flavoproteínas. Los fotorreceptores son cromoproteínas compuestas por una apoproteína unida a una variedad de cromóforos ¹²⁻¹⁵. Los fotorreceptores modulan el crecimiento y desarrollo de las plantas a lo largo de su ciclo de vida; además, al monitorear el entorno de luz, contribuyen a fijar el momento en el que suceden las transiciones de desarrollo clave, como la germinación de las semillas y el inicio de la floración ¹⁶. Como consecuencia directa de la absorción de luz por parte de los fotorreceptores, se ha visto que éstos interactúan con otros elementos de señalización, lo que finalmente conduce a una serie de respuestas moleculares y morfológicas. Por ejemplo, al percibir la luz roja el fitocromo B pasa de su forma inactiva (P_R) a su forma activa (P_{FR}), que entonces interactúa con una pequeña familia de factores de transcripción de la familia bHLH (llamados PIF) y promueve su degradación. Dado que los PIF inducen la expresión de genes que promueven la expansión celular, esta degradación explica el freno en el crecimiento del hipocotilo que provoca la exposición de las plántulas a la luz¹⁷.

1.4 La señalización por giberelinas

Las GAs son una clase de ácidos diterpenoides que controlan los principales aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, incluida la latencia y germinación de las semillas, el

alargamiento de raíces y tallos, la inducción de la floración, el desarrollo de frutos y la maduración del polen. Todos estos procesos los controlan las GAs a través de una extensa regulación transcripcional^{18,19}.

La señalización por GAs comienza con la percepción de la hormona por un receptor soluble llamado GID1, que en Arabidopsis está codificado por tres genes parálogos. La unión de la hormona provoca un cambio conformacional que permite la unión del complejo GA-GID1 a la proteína DELLA, de la que en Arabidopsis existen cinco genes (*GAI*, *RGA*, *RGL1-3*). Gracias a esta interacción se recluta a una E3-ubiquitina ligasa a través de la proteína F-box llamada GID2/SLEEPY, que marca a la proteína DELLA para su degradación por el proteasoma (Fig.1)²⁰⁻²⁴.

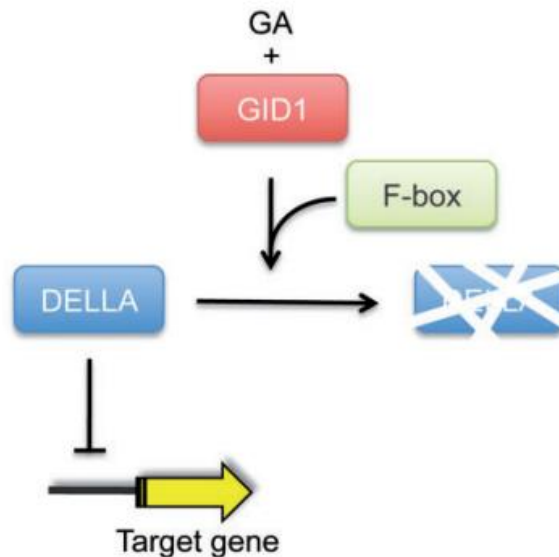


Fig. 1. Esquema simplificado de la señalización por giberelinas. La proteína F-box es la codificada por *SLY/GID2*, y es la que recluta al complejo E3-Ub ligasa para poliubiquitinar a la DELLA. (Imagen tomada de la Referencia 24)

Las proteínas DELLA son reguladores transcripcionales que no se unen al DNA, pero interactúan con más de 180 factores de transcripción (TFs) en Arabidopsis, alterando su actividad. Por esta razón, la degradación de DELLA inducida por GAs provoca cambios en la transcripción de numerosas dianas de dichos TFs (Fig.2)^{25,26}.

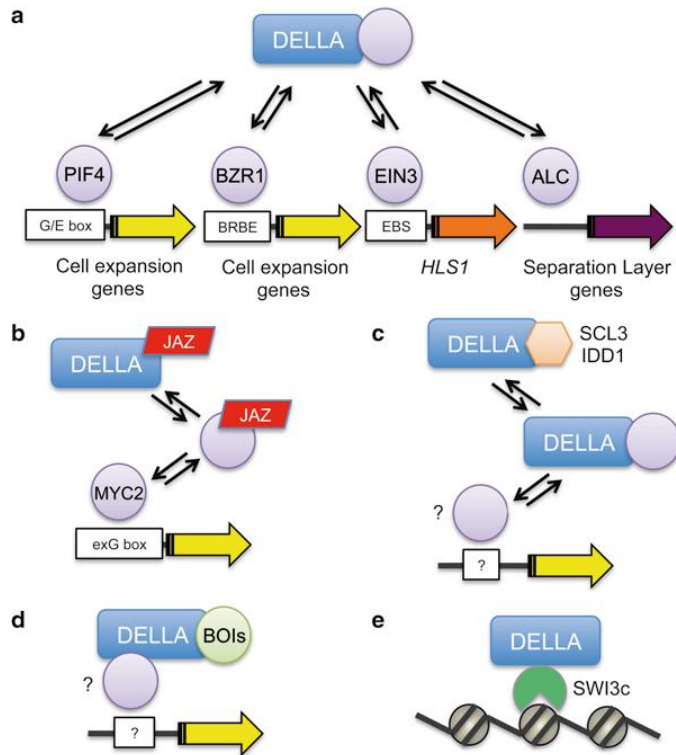


Fig. 2. Mecanismos por los que las DELLA controlan la transcripción. (a) Las DELLA inhiben la actividad de unión al DNA de los factores de transcripción tras la interacción (aquí representados como ejemplo por PIF4, BZR1, EIN3 y ALC). (b) Las DELLA inhiben la actividad de otros reguladores transcripcionales que no se unen directamente al DNA (como los JAZ, que tienen consecuencias en la actividad de otros factores de transcripción como MYC2). (c) Las DELLA interactúan con otros reguladores transcripcionales (SCL3 e IDD1) para formar parte de los complejos transcripcionales en los promotores diana, donde actúan como coactivadores. (d) La actividad de DELLA está modulada por la interacción con otros reguladores transcripcionales (BOI). (e) Las DELLA podrían modular la estructura de la cromatina interactuando con remodeladores de cromatina (SWI3C). (Imagen tomada de la Referencia 26)

Las proteínas DELLA tienen dos regiones bien diferenciadas. En su extremo N-terminal contiene los aminoácidos clave para la interacción con el receptor GID1, mientras que a través de la mitad C-terminal es por donde interactúa con todos los TFs conocidos. La delección del motivo “D-E-L-L-A” en el extremo N-terminal genera un alelo especial de la proteína DELLA que ya no interactúa con el receptor, por lo que es insensible a la degradación por GAs ²⁷. Es el caso de las mutaciones *gai-1* o *rga-Δ17* en los genes correspondientes de Arabidopsis (Fig. 3a,b).

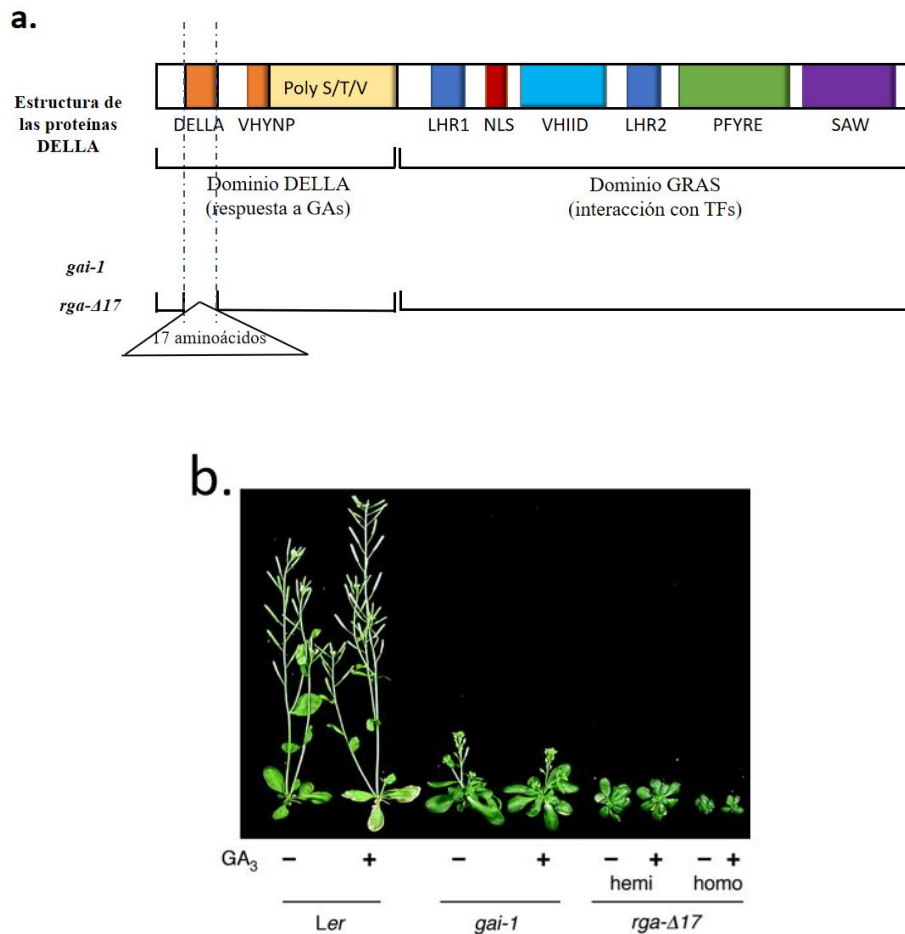


Fig. 3. Distintos dominios de las proteínas DELLA tienen funciones distintas. (a) Estructura de la proteína DELLA silvestre y de las versiones mutantes de ganancia de función. (b) Fenotipo de *Ler*, y de los mutantes de ganancia de función *gai-1* y *rga-Δ17* (Imagen tomada de referencia 57).

Dichas mutaciones generan una ganancia de función DELLA que se manifiesta en un tamaño más pequeño de las plantas incluso si éstas se tratan con GAs. A la vez, también se consigue una mayor resistencia al estrés. Es el mismo fenotipo que se obtiene al eliminar los receptores GID1a, b y c. También observamos ese enanismo si se limita la síntesis de GAs mediante mutación de genes de biosíntesis de GAs, o si se tratan las plantas con un inhibidor de la síntesis (el paclobutrazol, PAC). Sin embargo, en estos dos casos sí que se puede revertir el enanismo con la aplicación de GAs.

Por otra parte, la pérdida de función de DELLA (mediante la mutación de los cinco genes DELLA de Arabidopsis en el mutante *dellaKO*) provoca un fenotipo similar al del tratamiento exógeno con GAs: un aumento del tamaño de los órganos de la planta, y una reducción en la capacidad de tolerancia al estrés biótico y abiótico.

Los estudios transcriptómicos de mutantes de ganancia y de pérdida de función de DELLA muestran que las DELLA inducen la expresión de genes que codifican enzimas para la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno, retrasando así la senescencia y promoviendo la tolerancia al estrés ^{24,28}. De la misma forma, las DELLA reprimen la expresión de genes necesarios para la división y la expansión celular.

2. ANTECEDENTES

Y

OBJETIVOS

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La observación de que las DELLA interactúan con docenas de TFs y que estas interacciones afectan a muy diferentes procesos celulares²⁹ y rutas de señalización (Fig. 4) ha llevado a plantear que el papel biológico de la ruta GA-GID1-DELLA es coordinar la respuesta ambiental de las plantas, proporcionando el comportamiento óptimo en cada circunstancia. Sin embargo, el **papel clave de esta ruta en el aumento de la plasticidad vegetal** no está totalmente demostrado.

El **objetivo general** de este trabajo es **comprobar si la alteración de los niveles de DELLA provoca una reducción en la plasticidad de Arabidopsis**. En el contexto de este trabajo, definimos “plasticidad” como la capacidad de las plantas para responder a un rango determinado de intensidades de señales ambientales. Una planta tendrá más plasticidad si es capaz de modificar su comportamiento en un rango mayor de intensidades que otra.

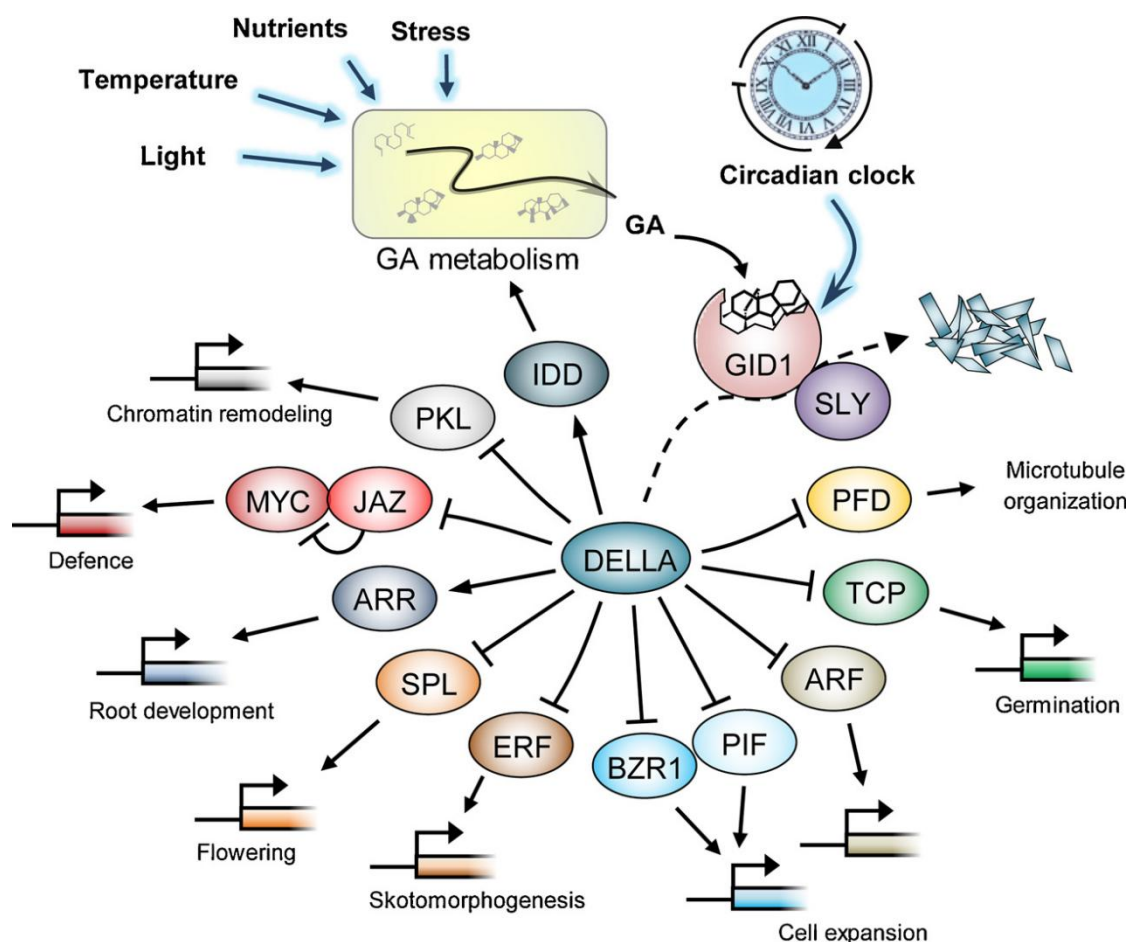


Fig.4 DELLA interactúan con docenas de TFs (Imagen tomado de referrencia 19)

Los **objetivos específicos** del trabajo son:

1. **Establecer el grado de plasticidad de Arabidopsis frente a distintas señales ambientales.** Analizaremos la respuesta de crecimiento del hipocotilo frente a distintas intensidades de luz blanca y distintas concentraciones de un nutriente como la sacarosa; y analizaremos el crecimiento de la raíz frente a distintas intensidades de limitación de agua.
2. **Investigar si ese grado de plasticidad está alterado en mutantes de ganancia y pérdida de función de DELLA.** Estudiaremos la respuesta a esos mismos factores en mutantes de ganancia (*gai-1*, *rga-Δ17*) y pérdida de función (*dellaKO*) y la compararemos con la de plantas silvestres.
3. **Averiguar si los niveles de DELLA varían con la intensidad de las señales ambientales.** Analizaremos los niveles de la proteína reportera YFP-RGA en distintas intensidades de luz, mediante microscopía confocal y western blot.

3 . RESULTADOS

3 . RESULTADOS

3.1. Análisis del efecto de las DELLA sobre la respuesta a intensidad de luz.

Se ha descrito que las proteínas DELLA influyen sobre la respuesta a luz en general^{30,31}. Para estudiar la influencia de las proteínas DELLA en la plasticidad frente a la intensidad de luz, examinamos el tamaño del hipocotilo de plántulas de cuatro genotipos de *A. thaliana* (*Ler* como silvestre parental del resto; *dellaKO* como mutante de pérdida de función de las cinco DELLA de esta especie; y los mutantes *gai-1* y *rga-Δ17* con ganancia de función de DELLA), cultivadas en día largo con distintas intensidades de luz entre 0 y 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$ (como se explica en Materiales y Métodos). Al cabo de 7 días, las plántulas presentaban tamaños, formas y colores muy distintas entre sí, dependiendo tanto del genotipo como de la intensidad de luz (Fig. 5). Al variar la intensidad de la luz, el hipocotilo de *Arabidopsis* mostró una correlación negativa con la intensidad de la luz, mientras que el tamaño de los cotiledones y el color causado por la acumulación de clorofila mostraron una correlación positiva. La reducción en el tamaño del hipocotilo se observó en los 4 genotipos durante varios valores de intensidad, hasta estabilizarse (Fig. 6).

Con el fin de determinar un valor relacionado con la plasticidad de este fenotipo (el crecimiento en respuesta a intensidad de luz), realizamos un análisis de regresión lineal por el que encontramos que, mientras en el silvestre la respuesta se daba entre 0.15 y 19 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$, este rango era menor en el mutante *dellaKO* (entre 0.6 y 19 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$), el mutante *gai-1* (entre 0.6 y 7 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$) y en el mutante *rga-Δ17* (entre 0.15 y 7 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$) (Fig. 6). Es decir, tanto la pérdida como la ganancia de función de DELLA tenía como resultado una reducción en la plasticidad de la respuesta a intensidad de luz blanca.

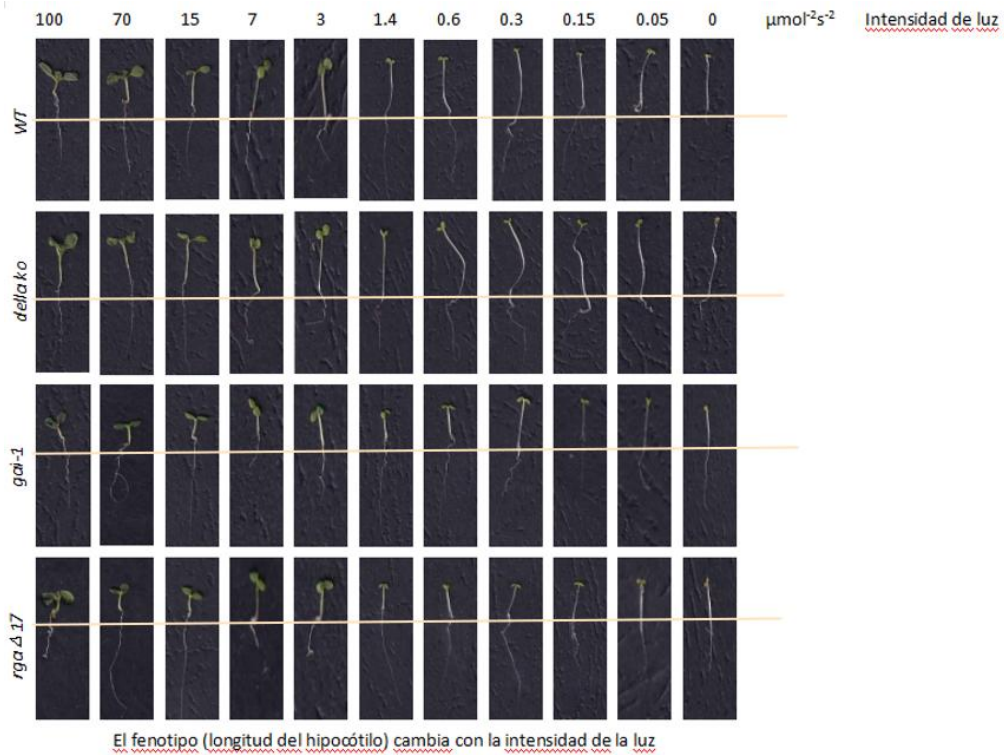


Fig. 5. El cambio fenotípico en arabis según las diferencias de la intensidad de la luz.

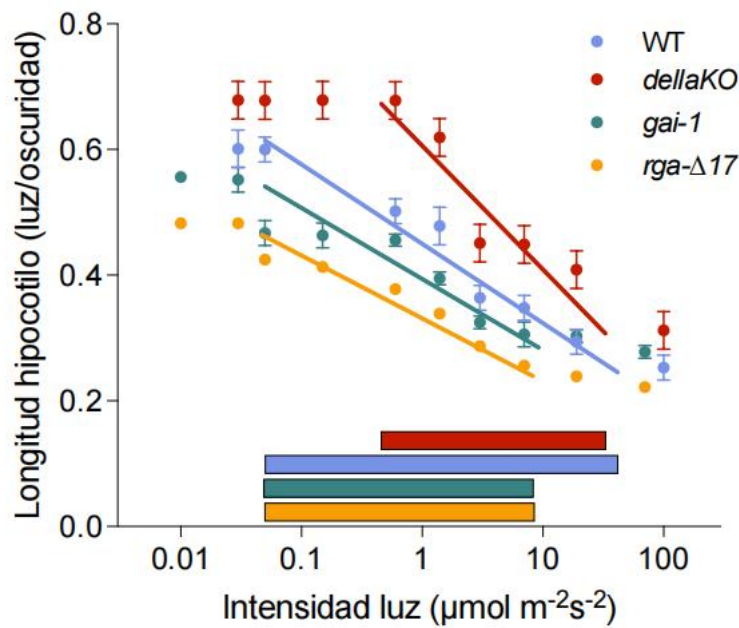


Fig. 6. El cambio de longitud de hipocotilo de Arabidopsis después de 7 días en distintas intensidades de luz. Las barras azul, roja, verde y amarilla indican el rango de señales en el que se produce variación de la respuesta en el crecimiento del hipocotilo del silvestre, *dellaKO*, *gai-1* y *rga-Δ17*, respectivamente.

3.2. Análisis del efecto de las DELLA sobre la respuesta a disponibilidad de nutrientes.

Para comprobar si el comportamiento de los mutantes en DELLA se extiende a otras condiciones ambientales, examinamos el tamaño del hipocotilo de los cuatro genotipos empleados anteriormente, creciendo en diferentes concentraciones de sacarosa –para simular el posible impacto de diferentes disponibilidades de nutrientes. Se ha descrito previamente que las giberelinas son importantes para la estimulación del crecimiento del hipocotilo por azúcares en la oscuridad ³², aunque no se han realizado estudios sobre su participación en presencia de luz. Por tanto, seleccionamos 10 concentraciones de azúcar y medimos la longitud del hipocotilo de *A. thaliana* después de 7 días de cultivo en días largos. Tanto el silvestre como los tres mutantes analizados mostraron mayor crecimiento a medida que aumentaba la concentración de sacarosa, apreciable a simple vista de forma general en todos los órganos (hipocotilos, cotiledones y raíces) (Fig. 7). Cuando medimos la longitud de los hipocotilos encontramos que, a medida que aumentaba la concentración de azúcar, el hipocotilo también mostraba una relación positiva con ella (Fig. 8). De forma equivalente al apartado anterior, un análisis de correlación nos permitió establecer que el rango de concentraciones entre las que varía el tamaño de un silvestre fue entre 0 y 0.6% de azúcar, mientras que este rango fue menor en el mutante *dellaKO* (0-0.5%) y en los mutantes de ganancia de función *gai-1* y *rga-Δ17* (0-0.3%). Por tanto, en comparación con el silvestre, tanto la pérdida como la ganancia de función de DELLA redujeron la plasticidad.

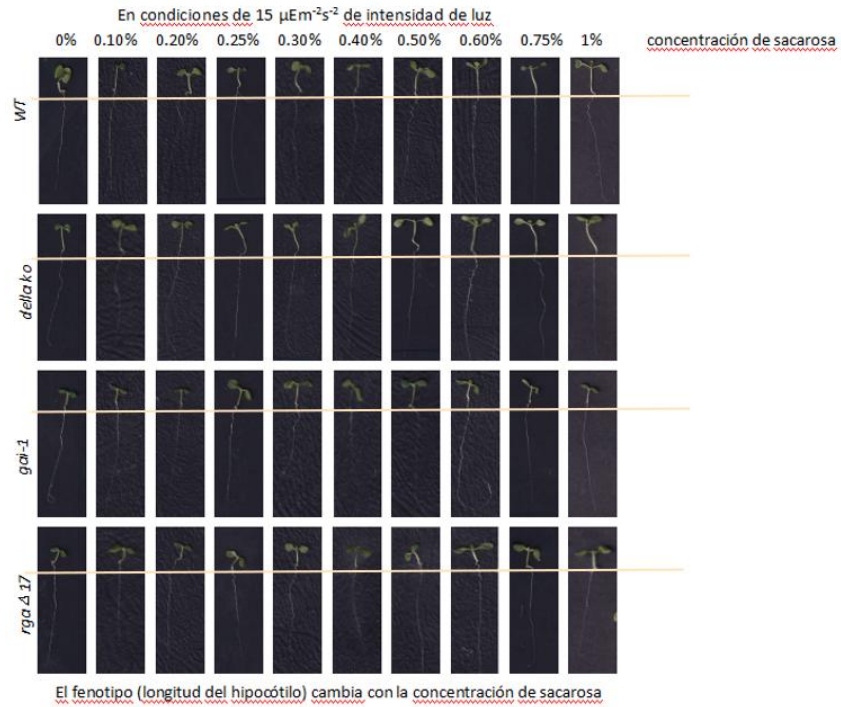


Fig. 7. El cambio fenotípico en *A. thaliana* según las diferentes concentraciones de sacarosa.

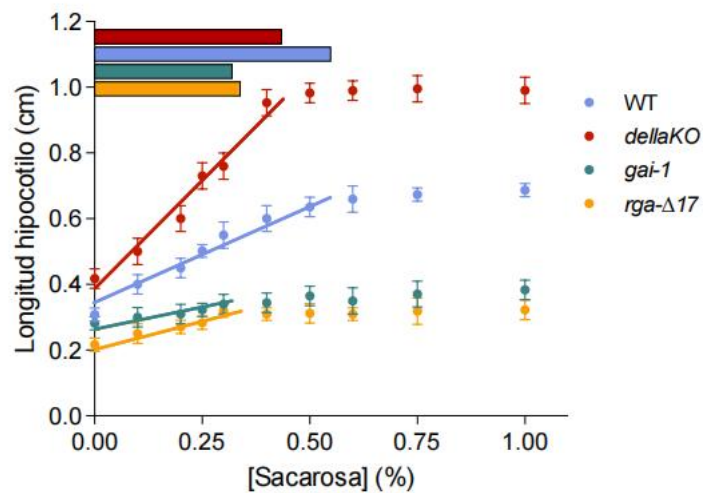


Fig. 8. El cambio de longitud de hipocotilo de *Arabidopsis* después de 7 días en distintas concentraciones de sacarosa. Las barras azul, roja, verde y amarilla indican el rango de señales en el que se produce variación de la respuesta en el crecimiento del hipocotilo del silvestre, *dellaKO*, *gai-1* y *rga-Δ17*, respectivamente

3.3. Análisis del efecto de las DELLA sobre la respuesta frente a la disponibilidad de agua.

Para completar el análisis fenotípico de los mutantes en DELLA en distintas condiciones ambientales decidimos la respuesta del crecimiento de la raíz de plántulas cultivadas en distintos niveles de disponibilidad de agua. La respuesta al estrés severo por falta de agua se ha descrito previamente que depende en parte de giberelinas en varias especies ³³⁻³⁵, pero no se han realizado estudios detallados sobre la relación entre los niveles de DELLA en distintos grados de limitación de agua. Por tanto, decidimos estudiar el efecto del potencial relativo de agua sobre el crecimiento de las plántulas de *A. thaliana*. Para ello se cultivaron durante 7 días bajo condiciones bien regadas (medio de agar nutriente, potencial de agua aproximadamente -0,10 MPa) y luego se trasplantaron a placas con potenciales de agua más reducidos. Para preparar medio con potencial de agua reducido, se usó el polietilenglicol de alto peso molecular (PEG 8000) como se indica en Materiales y Métodos.

Luego medimos la longitud de las raíces después de 8 días de crecimiento en diferentes potenciales hídricos (Fig. 9) y encontramos que el crecimiento de las raíces se frenaba a medida que disminuía el potencial hídrico. En general, cuando comparamos las cuatro especies de genotipo, encontramos que bajo diferentes condiciones de potencial hídrico, la ganancia o pérdida de la función DELLA también tuvo un cierto impacto negativo en la plasticidad de *A. thaliana*.

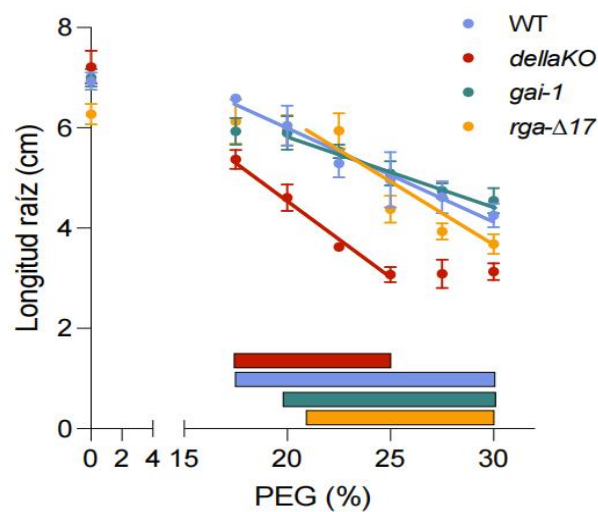


Fig. 9. El cambio de longitud de la raíz de *Arabidopsis* después de 7 días en distintas concentraciones de PEG 8000. Las barras azul, roja, verde y amarilla indican el rango de señales en el que se produce variación de la respuesta en el crecimiento del hipocotilo del silvestre, *dellaKO*, *gai-1* y *rga-Δ17*, respectivamente

3.4. Variación de la actividad molecular de las proteínas DELLA en un entorno cambiante.

Los resultados anteriores sugieren que existe un nivel óptimo de actividad DELLA -como el que presenta un silvestre- que permite ampliar el rango de señales ambientales a las que la planta es capaz de responder, pero no permiten conectar esa función con la actividad molecular de las DELLA (que es la interacción física sobre todo con factores de transcripción, para regular la expresión de determinados genes). Por tanto, decidimos utilizar la expresión de un gen diana de DELLA como testigo de los posibles cambios de la actividad DELLA en entornos cambiantes.

Entre los genes diana de DELLA más conocidos están los que codifican enzimas del metabolismo de GAs. Se ha descrito que las DELLA ejercen una regulación “feed-back” sobre los genes del metabolismo de GAs. A través de la interacción con el factor de transcripción GAI-ASSOCIATED FACTOR1 (GAF1), de la familia IDD, las DELLA promueven la expresión de los genes *AtGA20ox2*, *AtGA3ox1* de la biosíntesis de GAs, y del gen *AtGID1b* que codifica uno de los receptores de GAs de *A. thaliana* ³⁶. Cuando analizamos la expresión del gen *AtGA20ox1* en el plántulas silvestres creciendo en intensidades crecientes de luz encontramos una tendencia de mayor expresión a mayor intensidad de luz (Fig. 10). Este resultado encaja con la idea de que la luz estimula la actividad DELLA, al menos cuando se compara la actividad DELLA en ausencia vs presencia de luz ³⁷⁻³⁹. Sin embargo, la ausencia de DELLA (en el mutante *dellaKO*) no eliminó la inducción de *AtGA20ox1* por luz sino que sólo la redujo ligeramente, indicando que la inducción de *AtGA20ox1* por intensidad de luz opera por una ruta independiente de la regulación feed-back por DELLA, y que este efecto de las DELLA es aditivo al de la luz. Esta conclusión también encaja con la observación de que el mutante *gai-1* (con mayor actividad DELLA) presentaba una expresión aumentada de *AtGA20ox1* a baja intensidad de luz, pero no era suficiente para sortear completamente la falta de luz.

Estos resultados indican que las DELLA no actúan en esta respuesta como el mediador exclusivo de la señal ambiental, sino que seguramente modulan la respuesta a la luz por una ruta convergente.

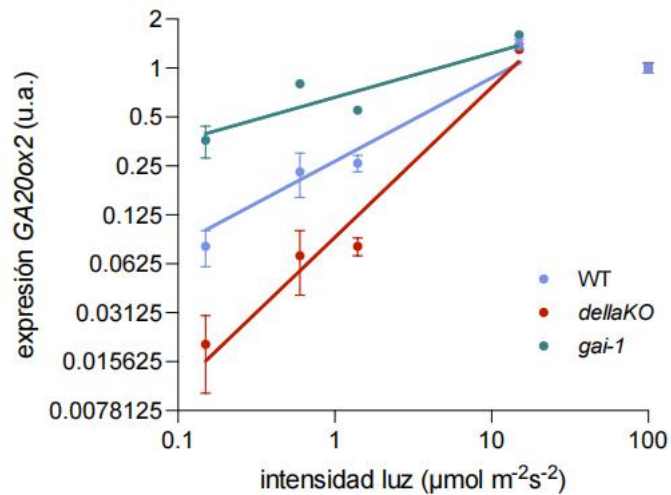


Fig. 10. Expresión del gen *AtGA20ox1* en plántulas de 7 días cultivadas en días largos a distintas intensidades de luz. La expresión se determinó mediante RT-qPCR según se indica en Materiales y Métodos, y se representan aquí los valores relativos respecto al valor de expresión a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$ para cada genotipo.

3.5. Análisis de los niveles de DELLA en un entorno cambiante.

Se ha descrito que los niveles de la proteína DELLA son un buen testigo de las condiciones ambientales, ya que se ha visto que se acumulan en distintas condiciones de estrés^{40,41}. Para saber si la acumulación de proteína DELLA varía también gradualmente en condiciones ambientales cambiantes, utilizamos una línea transgénica de *A. thaliana* que expresa la fusión GFP-RGA bajo el control del promotor de *RGA* (pRGA:GFP-RGA). Dichas plantas expresan muestran señal nuclear que se desaparece rápidamente en respuesta a tratamientos con GA^{42,43}. Cultivamos las plantas en condiciones de día largo durante 7 días en intensidades crecientes de luz, fijamos las células de la planta con paraformaldehído y obtuvimos imágenes de fluorescencia de los hipocotilos bajo un microscopio confocal (Fig. 11a; Fig. Suplementaria 1). Curiosamente, lo que encontramos es que los niveles de RGA fueron aumentando ligeramente con la intensidad de luz hasta cierto punto (alrededor de una intensidad de $1\text{-}2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$) tras lo cuál los niveles dejaron de crecer (Fig. 11b). Estos resultados chocan con observaciones previas en las que se comparaban los niveles de RGA entre plantas cultivadas en días largos frente a días cortos, y el fotoperíodo más

amplio (con más luz acumulada por superficie y tiempo al cabo de 24h) causaba una acumulación de RGA⁴⁴. No obstante, nuestros resultados no parecen ser un artefacto porque pudimos obtener un resultado parecido al examinar tres de las muestras mediante Western blot, y de nuevo obtuvimos menores niveles de RGA a una intensidad alta ($70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$) que a intensidades más bajas (Fig. 12).

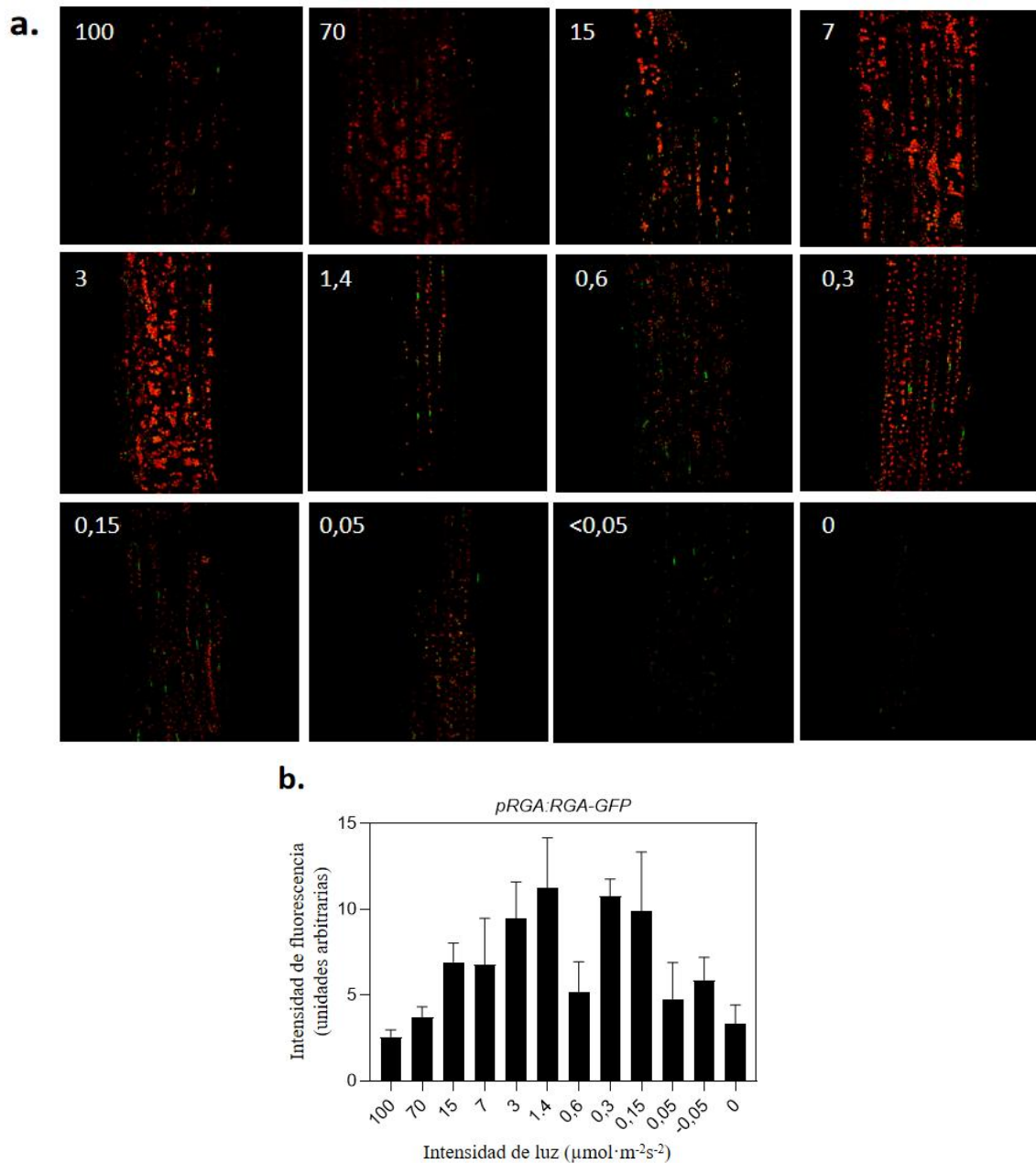


Fig. 11. Niveles de la proteína pRGA::GFP-RGA bajo diferentes intensidades de luz, determinados mediante microscopía confocal. (a) Imágenes representativas de fluorescencia, donde la proteína GFP-RGA aparece en verde y la clorofila en rojo. Las intensidades se indican en $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$. (b) Cuantificación de la fluorescencia de

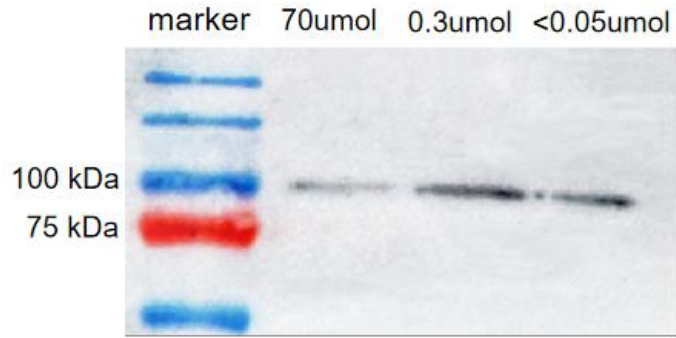


Fig. 12. Análisis de los niveles de GFP-RGA mediante inmunodetección con anticuerpos anti-GFP en plántulas cultivadas en distintas intensidades de luz.

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

La plasticidad ambiental es la capacidad que tiene un genotipo de conferir fenotipos distintos dependiendo de las condiciones ambientales ⁴⁵. El objetivo de este trabajo era evaluar la participación de las GAs y las proteínas DELLA en la plasticidad ambiental, entendida como el rango de intensidades de señales ambientales frente a las que una planta puede reaccionar⁴⁶.

Nuestros resultados indican que la ganancia o la pérdida de función de DELLA reduce esta capacidad de respuesta en *A. thaliana*. Por tanto, nuestro trabajo es una primera indicación de que las GAs y las DELLA son parte del mecanismo que utilizan las plantas para responder adecuadamente a los cambios ambientales. Esta conclusión profundiza en nuestro conocimiento del papel biológico de las DELLA: antes se sabía que la ruta de señalización de GAs modulaba la magnitud de la respuesta frente a los cambios ambientales; nosotros proponemos que esta ruta también determina el rango de señales reconocidas por las plantas frente a las que pueden modificar su comportamiento.

Aunque hemos estudiado el comportamiento de *A. thaliana* frente a varios factores ambientales (luz, disponibilidad de nutrientes, disponibilidad de agua) y en varios procesos biológicos (alargamiento del hipocotilo, crecimiento de la raíz), aún es necesario extender este análisis a otras especies vegetales para poder consolidar este papel de las DELLA. Por ejemplo, existen herramientas para estudiar el comportamiento de mutantes de pérdida y ganancia de función de DELLA en arroz y tomate⁴⁷⁻⁴⁹. Al contrario que en *A. thaliana*, estas angiospermas sólo tienen una DELLA codificada en su genoma, por lo que será interesante estudiar si la diversificación de genes DELLA en *A. thaliana* ha supuesto cambios en su modulación de la plasticidad. También será interesante estudiar la relación de las DELLA con la plasticidad en otras plantas terrestres como las briófitas (como *Physcomitrium patens* y *Marchantia polymorpha*), que cuentan con proteínas DELLA pero no con un mecanismo de síntesis ni de percepción de GAs^{50,51}. Así podremos investigar si la percepción de GAs es necesaria para aumentar la plasticidad vegetal, o si las DELLA ya pueden hacerlo por sí mismas sin estar regulados sus niveles por GAs.

Incluso si aceptamos que las DELLA participan en definir la plasticidad, también es necesario resolver la cuestión de si este papel lo cumplen en todas las etapas del ciclo de vida y frente a todos los factores ambientales, o si su papel es más importante dependiendo del contexto. El que los mutantes de DELLA estén afectados en procesos a lo largo de toda la vida de la planta parece sugerir que va a ser un papel bastante general, pero puede que en ciertos procesos las DELLA regulen la magnitud de la respuesta, y en otros el rango de intensidades a las que responder.

Un aspecto importante que no hemos podido resolver es el mecanismo por el que las DELLA regulan la plasticidad. En teoría existen al menos dos posibilidades: (1) que los niveles de DELLA estén regulados por el entorno de forma precisa y actúen de “reostato” (es decir, la capacidad de respuesta de la planta frente a una intensidad de señal queda fijada directamente por la cantidad de DELLA que hay en esa condición); o (2) que la presencia de cierta cantidad de DELLA fije los niveles umbral de sensibilidad frente a una determinada señal ambiental. Nuestras observaciones indican que la cantidad de DELLA no se correlaciona directamente al menos con el gradiente de intensidades de luz ambiental: aunque la intensidad de luz influye en la acumulación de RGA-YFP en los núcleos de células epidérmicas de los hipocotilos, los niveles de esta DELLA son muy parecidos al comparar las intensidades más altas y más bajas de luz. Este resultado es algo inesperado porque se ha visto que las plantas en la oscuridad acumulan mucha menos DELLA que en luz, y lo mismo pasa cuando se comparan plantas cultivadas en día corto, frente a las cultivadas en día largo ⁵². Sin embargo, no es lo mismo cultivar plantas en distintos fotoperíodos que en distintas intensidades de luz pero con el mismo fotoperíodo. Habrá que investigar si en respuesta a otras señales ambientales sí que existe esa correlación, pero para la respuesta a luz es necesario encontrar una explicación alternativa.

Una posibilidad es que los niveles de la proteína DELLA no cambian con la luz, pero sí que cambia su actividad. La actividad de las DELLA consiste en interactuar físicamente con factores de transcripción, y se ha encontrado que hay modificaciones postraduccionales que modifican la capacidad de las DELLA para ejercer esas interacciones⁵³. Por ejemplo, la fucosilación de RGA a través de SPINDLY favorece la interacción con PIF4 ⁵⁴, mientras que la modificación de residuos de serina con N-acetilglucosamina a través de SECRET

AGENT dificulta dicha interacción ⁵⁵ . Habría que investigar si la actividad de alguna de estas enzimas está regulada por intensidad de luz, por ejemplo.

La otra posibilidad es que, efectivamente, ni los niveles ni la actividad de DELLA realmente cambien con la intensidad de luz. ¿Cómo explicar entonces que las DELLA influyan en el tamaño del hipocotilo en respuesta a intensidad de luz? Hay que recordar que la expansión celular que causa el crecimiento del hipocotilo está promovida por al menos tres factores de transcripción (PIF4, ARF6 y BZR1), y que todos ellos son inhibidos por su interacción con las DELLA ⁵⁶ . Además, al menos PIF4 está fuertemente regulado por la intensidad de luz (la proteína se degrada cuando aumenta la intensidad de la luz). Nuestra hipótesis sería que a un nivel concreto de DELLA, el verdadero sensor de luz sería la cantidad de PIF4. Así, en un silvestre a bajas intensidades de luz la cantidad de PIF4 sería suficiente para eludir la inhibición por DELLA, mientras que a altas intensidades de luz la DELLA inhibiría considerablemente a PIF4. Y a cada intensidad de luz, aumentar o reducir los niveles de DELLA (con las mutaciones *dellaKO*, *gai-1* y *rga-Δ17*) alteraría la actividad de PIF4 en paralelo.

Los esfuerzos futuros en esta línea de trabajo deberían centrarse, por lo tanto, en estudiar los niveles de DELLA en otras condiciones ambientales, en extender los estudios a otras especies vegetales y otros procesos biológicos, y a comprobar la hipótesis de que las DELLA sólo marcan el nivel umbral de actividad de los factores de transcripción.

5 .CONCLUSIONES

5 .CONCLUSIONES

De este trabajo se obtienen las conclusiones que a continuación se enumeran:

- I. La alteración de los niveles de DELLA por encima o por debajo de lo normal reduce el rango de señales ambientales que pueden reconocer las plantas de *A. thaliana*, frente a las que modifican su comportamiento.

- II. El control de la plasticidad por DELLA no implica cambios en los niveles de proteína DELLA en respuesta al menos a la variación en la intensidad de la luz.

6. MATERIALES

Y

MÉTODOS

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1 Material vegetal

Todos los experimentos utilizaron *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) de 4 genotipos: Landsberg *erecta* (Ler) como silvestre (WT), *dellaKO* (pérdida de función de DELLA)⁵⁷⁻⁶⁰ (REF), *gai-1*, y *rga-Δ17* (ganancia de función de DELLA)^{60,61}. Las líneas pRGA::GFP-RGA^{43,60} se utilizaron para Western blot y microscopia confocal.

6.1.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado en todos los experimentos fue el de Murashige-Skoog (Duchefa). En algunos casos se suplementó con distintas concentraciones de sacarosa (SIGMA) o de polietilén-glicol de MW=8000 Da (PEG8000, SIGMA)

6.2 Métodos

6.2.1 Manipulación de *Arabidopsis*

Esterilización de semillas. Las semillas se esterilizaron superficialmente con una solución de etanol al 70% (v/v) y 0.05% (v/v) de Triton X-100 durante 10 minutos, después se transfirieron por otros 2 minutos en etanol al 100% (v/v), y se secaron al aire en cabina de flujo laminar.

Condiciones experimentales de crecimiento. Se sembraron en medio MS, 0.8% (w/v) de agar, sin sacarosa y se estratificaban a 4°C en oscuridad por 3-4 días. Para la inducción de la germinación las placas se transfirieron a luz blanca. Se cultivaron en condiciones de día largo (16 horas de luz, y 8 horas de oscuridad), con un rango de temperatura entre 22-24°C y una humedad de 50%. La fuente de luz fueron tubos fluorescentes que emiten luz blanca fría. Salvo en los experimentos con varias intensidades de luz, la luz empleada fue de 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-2}$ a partir de tubos fluorescentes estándar de la marca Sylvania (Referencia F58W/133-T8).

6.2.2. Tratamientos de intensidades de luz.

El tratamiento de luz se utilizaron con las intensidades de $0 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$ a $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$ ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$, $0.05 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$, $0.15 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$, $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$, $0.6 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$, $1.4 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$, $3 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$, $7 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$, $19 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$, $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$). Se cultivaron en el medio MS sin sacarosa durante 7 días. Para medir el tamaño del hipocotilo se utilizo el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

6.2.3. Tratamientos de limitación de agua.

El potencial hídrico se redujo mediante la adición de diversas cantidades de PEG 8000 al medio de cultivo en las siguientes concentraciones: 0 %, 17,5 %, 20 %, 22,5 %, 25 %, 27,5 %, 30 %, 17,5 % a -3.52 MPa , 20 % a -5.26 MPa , 22.5 % a -6.78 MPa , 25 % a -7.98 MPa y 30 % a -11.2 MPa).

El PEG no se podía mezclar con agar fundido porque a concentraciones más altas de PEG, el agar no se solidifica. Por ello, se añadía una vez solidificadas las placas de agar. De esta manera, los potenciales hídricos en el medio de agar pueden llegar tan bajos como queramos, y permanecieron aproximadamente constantes más de 8 días en la cámara de crecimiento.

Plántulas de 7 días cultivadas en el medio normal (MS) se transfirieron al medio que ya contenía el PEG, se marcó la longitud de la raíz en ese momento y después de 8 días de crecimiento, y se midió la diferencia entre la longitud final y la inicial con ImageJ(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

6.2.4. Tratamientos de respuesta a la disponibilidad de nutrientes.

El tratamineto de nutriente se usaron distintas concentraciones de sacarosa: 0%, 0.1%, 0.2%, 0.25%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.75%, 1%. Todo el exprimento bajo en la condición de la intensidad de luz de $15 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$. Y el tamaño del hipocotilo se midió con programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) después de 7 días de crecimiento .

6.2.5 Detección de fluorescencia GFP en hipocotilos de plántulas

La fluorescencia debida a GFP-RGA en los núcleos de las células de la zona de elongación de los hipocotilos de las plántulas (en un punto de aproximadamente un cuarto de la longitud de los hipocotilos por debajo de los cotiledones) se determinó como sigue. Las líneas que contenían pRGA:GFP-RGA se cultivaron en placas con medio de MS al 0.8% (w/v) de agar, sin sacarosa durante con estratificarse a 4°C en oscuridad por 3 días y posteriormente se transfirieron a luz blanca durante 7 días.

6.2.6. Extracción de proteínas y western blot.

Las proteínas totales de los hipocotilos de las líneas transgénicas pRGA:RGA-GFP se extrajeron homogeneizando tejido molido congelado en un volumen de 62 mm de 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (TRIS)-HCl pH 6,8, 25 % (v/v) glicerol, 2 % (p/v) de SDS, 0,02 % (p/v) de azul de bromofenol y DTT (20mg/ml⁻¹), hervido durante 5 min y centrifugado a máxima velocidad durante 10 min a temperatura ambiente la temperatura. La concentración de proteínas en los sobrenadantes se cuantificó mediante el ensayo de proteínas RC DC (Bio-Rad, <http://www.bio-rad.com/>). Se separaron de veinte a cuarenta microgramos de proteínas desnaturalizadas en gel Precise® 8% TRIS-HEPES-SDS (Pierce, <http://www.piercenet.com/>) y se transfirieron a membranas de PVDF (Bio-Rad). La señal de los anticuerpos unidos se detectó utilizando el kit de detección de transferencia Western ECL Advance (GE Healthcare, <http://www.gelifesciences.com/>). Las proteínas de fusión GFP se detectaron usando un anti-GFP(JL8, Clontec) y RGA se detectó usando un anti-GFP , anti-c-myc (9E10 Roche), respectivamente.

La cuantificación de la intensidad de las bandas de proteínas se llevó a cabo utilizando un analizador de imágenes de luminiscencia LAS-3000 (Fujifilm, <http://www.fujifilmlifescienceusa.com/>).

6.2.7. Microscopia confocal.

La señal fluorescente de la fusión *pRGA:RGA-GFP* fue detectada en un microscopio confocal Leica TCS SL (Leica Microsystems).

6.2.8 Análisis de expresión génica

Los hipocótilos muestreados para los análisis de expresión génica se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente tras su recolección, para luego ser almacenados a -80°C hasta su uso. El RNA se extrajo de los hipocótilos de *Arabidopsis* utilizando el kit de RNeasy Plant MiniKit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El protocolo incluye un paso de eliminación del DNA genómico en columna. La calidad del RNA se evaluó utilizando la relación de las absorbancias A260/A280 medida con el NanoDrop ND1000. La síntesis de DNAc se realizó utilizando el kit de síntesis de DNAc RevertAid H Minus First Strand (Thermo Scientific) según se indica en las instrucciones del fabricante. Las reacciones de RT-qPCR se realizaron con el sistema óptico de Applied Biosystems (AB7300) y usando SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) (Takara Bio) siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los casos, los niveles detectados de RNA mensajero de estado estacionario correspondientes a cada gen se normalizaron con los niveles del gen de referencia *ACTINA8*.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Shao, H. B. *et al.* Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids Surf B Biointerfaces* **54**, 37–45 (2007).
2. Kempa, S. *et al.* A Central Role of Abscisic Acid in Stress-Regulated Carbohydrate Metabolism. *PLoS One* **3**, e3935 (2008).
3. Gerardo, R. S., *et al.* El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas* 90–95 (2010).
4. Laredo Alcalá, E. I. *et al.* Aplicación de ácido jasmónico como inductor de resistencia vegetal frente a patógenos. *Rev Mex De Cienc Agric* **8**, 673–683 (2017).
5. Tamaoki, D. *et al.* Jasmonic acid and salicylic acid activate a common defense system in rice. *Plant Signal Behav* **8**, (2013).
6. Lv, M. *et al.* Molecular Mechanisms of Brassinosteroid-Mediated Responses to Changing Environments in Arabidopsis. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).
7. Vandenbrink, J. P. *et al.* Light and gravity signals synergize in modulating plant development. *Front Plant Sci* **5**, (2014).
8. Colebrook, E. H. *et al.* The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *Journal of Experimental Biology* **217**, 67–75 (2014).
9. Voesenek, L. A. C. J. *et al.* Plants and Hormones: An Ecophysiological View on Timing and Plasticity. *J Ecol* **84**, 111 (1996).
10. Zhang, J., Elo, A. *et al.* Arabidopsis as a model for wood formation. *Curr Opin Biotechnol* **22**, 293–299 (2011).
11. Kendrick, R. *et al.* Photomorphogenesis in plants. (2012).
12. Rockwell, N. C. *et al.* Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 837–858 (2006).
13. Lin, C. *et al.* Association of flavin adenine dinucleotide with the Arabidopsis blue light receptor CRY1. *Science (1979)* **269**, 968–970 (1995).
14. Imaizumi, T. *et al.* FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in Arabidopsis. *Nature* **426**, 302–306 (2003).
15. Christie, J. M. *et al.* Arabidopsis NPH1: A flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science (1979)* **282**, 1698–1701 (1998).
16. Kami, C. *et al.* Light-regulated plant growth and development. in *Current Topics in Developmental Biology* vol. 91 29–66 (Academic Press Inc., 2010).
17. Alabadí, D. *et al.* Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. *The Plant Journal* **53**, 324–335 (2008).
18. Blanco Touriñán, N. New mechanisms of DELLA protein regulation and activity in Arabidopsis. *Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València* (2020).
19. Hernández-García, J. *et al.* Origin and evolution of gibberellin signaling and metabolism in plants. *Semin Cell Dev Biol* **109**, 46–54 (2021).
20. Griffiths, J. *et al.* Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 3399–3414 (2006).
21. Willige, B. C. *et al.* The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 1209–1220 (2007).

22. Ueguchi-Tanaka, M. *et al.* GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**, 693–698 (2005).
23. Silverstone, A. L. *et al.* The New RGA Locus Encodes a Negative Regulator of Gibberellin Response in *Arabidopsis thaliana*. <https://academic.oup.com/genetics/article/146/3/1087/6053955>.
24. Locascio, A. *et al.* Genomic analysis of della protein activity. *Plant Cell Physiol* **54**, 1229–1237 (2013).
25. Sun, T.-P. *et al.* MOLECULAR MECHANISM OF GIBBERELLIN SIGNALING IN PLANTS. *Annu. Rev. Plant Biol* **55**, 197–223 (2004).
26. Minguet, E. G. *et al.* Gibberellin implication in plant growth and stress responses. in *Phytohormones: A Window to Metabolism, Signaling and Biotechnological Applications* vol. 9781493904914 119–161 (Springer New York, 2014).
27. Sun, T. P. The Molecular Mechanism and Evolution of the GA–GID1–DELLA Signaling Module in Plants. *Current Biology* **21**, R338–R345 (2011).
28. Borevitz, J. O. *et al.* Activation Tagging Identifies a Conserved MYB Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis. *Plant Cell* **12**, 2383–2393 (2000).
29. Hernández-García, J. *et al.* Origin and evolution of gibberellin signaling and metabolism in plants. (2020) doi:10.1016/j.semcd.2020.04.009.
30. de Lucas, M. *et al.* A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**, 480–484 (2008).
31. Feng, S. *et al.* Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* **451**, 475–479 (2008).
32. Zhang, Y. *et al.* Sucrose-induced hypocotyl elongation of *Arabidopsis* seedlings in darkness depends on the presence of gibberellins. *J Plant Physiol* **167**, 1130–1136 (2010).
33. Ptošková, K. *et al.* Changes in the concentrations and transcripts for gibberellins and other hormones in a growing leaf and roots of wheat seedlings in response to water restriction. *BMC Plant Biol* **22**, 1–19 (2022).
34. Shohat, H. *et al.* Inhibition of gibberellin accumulation by water deficiency promotes fast and long-term ‘drought avoidance’ responses in tomato. *New Phytologist* **232**, 1985–1998 (2021).
35. Wang, Z. *et al.* GAI Functions in the Plant Response to Dehydration Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).
36. Fukazawa, J. *et al.* DELLA-GAF1 complex is involved in tissue-specific expression and gibberellin feedback regulation of GA20ox1 in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **107**, 147–158 (2021).
37. Achard, P. *et al.* DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiol* **143**, 1163–1172 (2007).
38. Alabadí, D. *et al.* Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol* **134**, 1050–1057 (2004).
39. Alabadí, D. *et al.* Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent *Arabidopsis* seedling de-etiolation in darkness. *The Plant Journal* **53**, 324–335 (2008).
40. Thomas, S. G. *et al.* DELLA Proteins: Master Regulators of Gibberellin-Responsive Growth and Development. *Annual Plant Reviews: The Gibberellins* **49**, 189–228 (2016).

41. Claeys, H. *et al.* Gibberellins and DELLAs: central nodes in growth regulatory networks. *Trends Plant Sci* **19**, 231–239 (2014).
42. Achard, P. *et al.* DELLAs Contribute to Plant Photomorphogenesis. *Plant Physiol* **143**, 1163 (2007).
43. Silverstone, A. L. *et al.* Repressing a RepressorGibberellin-Induced Rapid Reduction of the RGA Protein in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 1555–1566 (2001).
44. Achard, P. *et al.* DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiol* **143**, 1163–1172 (2007).
45. Bradshaw, A. D. Unravelling phenotypic plasticity -- why should we bother? *New Phytol* **170**, 644–648 (2006).
46. Valladares, F. *et al.* Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. *Journal of Ecology* **94**, 1103–1116 (2006).
47. Jasinski, S. *et al.* PROCERA encodes a DELLA protein that mediates control of dissected leaf form in tomato. *Plant J* **56**, 603–612 (2008).
48. Bassel, G. W. *et al.* Procera is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. *J Exp Bot* **59**, 585–593 (2008).
49. Ikeda, A. *et al.* slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *Plant Cell* **13**, 999–1010 (2001).
50. Hernández-García, J. *et al.* Origin and evolution of gibberellin signaling and metabolism in plants. *Semin Cell Dev Biol* **109**, 46–54 (2021).
51. Hernández-García, J. *et al.* Coordination between growth and stress responses by DELLA in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Current Biology* **31**, 3678–3686.e11 (2021).
52. Achard, P. *et al.* DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiol* **143**, 1163–1172 (2007).
53. Blanco-Touriñán, N. *et al.* Regulation of DELLA Proteins by Post-translational Modifications. *Plant Cell Physiol* **61**, 1891–1901 (2020).
54. Zentella, R. *et al.* The Arabidopsis O-fucosyltransferase SPINDLY activates nuclear growth repressor DELLA. *Nature Chemical Biology* **2017 13:5** **13**, 479–485 (2017).
55. Zentella, R. *et al.* O-GlcNAcylation of master growth repressor DELLA by SECRET AGENT modulates multiple signaling pathways in Arabidopsis. (2016) doi:10.1101/gad.270587.
56. Davière, J. M. *et al.* A Pivotal Role of DELLAs in Regulating Multiple Hormone Signals. *Molecular Plant* vol. 9 10–20 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.011> (2016).
57. Cao, D. *et al.* Loss of function of four DELLA genes leads to light- and gibberellin-independent seed germination in Arabidopsis. *Planta* **223**, 105–113 (2005).
58. Tyler, L. *et al.* DELLA Proteins and Gibberellin-Regulated Seed Germination and Floral Development in Arabidopsis. *Plant Physiol* **135**, 1008–1019 (2004).
59. Cheng, H. *et al.* Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* **131**, 1055–1064 (2004).
60. Dill, A. *et al.* Synergistic Derepression of Gibberellin Signaling by Removing RGA and GAI Function in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **159**, 777–785 (2001).

61. Peng, J. *et al.* The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* **11**, 3194–3205 (1997).

8. ANEXOS

8. ANEXO I

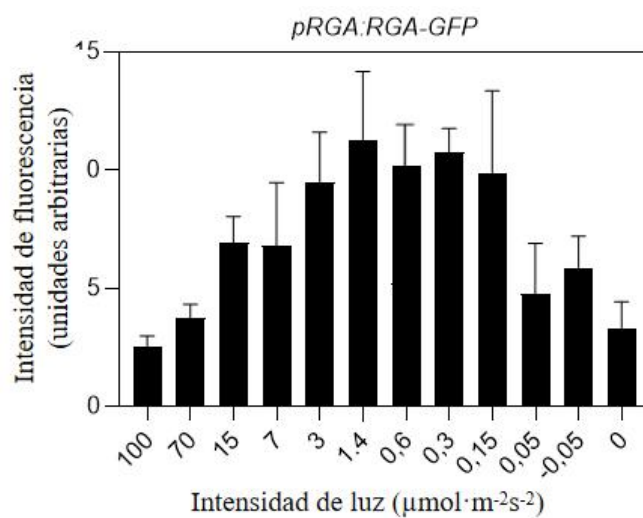
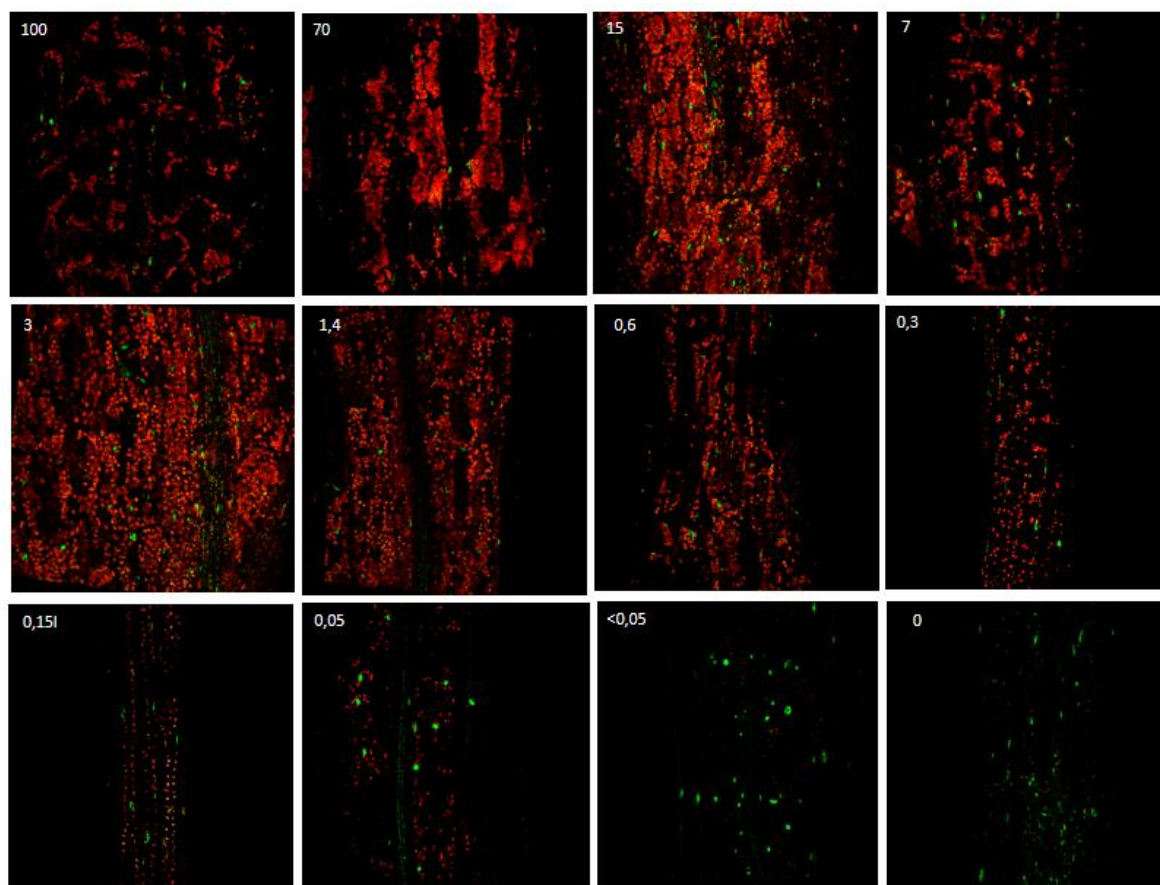


Figura suplementaria 1. Repetición del experimento de la microscopía confocal de *pRGA::GFP-RGA* frente diferentes tratamientos de luz. Niveles de la proteína *pRGA::GFP-RGA* bajo diferentes intensidades de luz, determinados mediante microscopía confocal. Imágenes representativas de fluorescencia, donde la proteína GFP-RGA aparece en verde y la clorofila en rojo. Las intensidades se indican en $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$. Cuantificación de la fluorescencia de GFP-RGA ($n \geq 20$ núcleos).

8. ANEXO II

RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Anexo al Trabajo de Fin de Grado y Trabajo de Fin de Máster: Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.				X
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.				X
ODS 13. Acción por el clima.	X			
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.			X	
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

Descripción de la alineación del TFG/TFM con los ODS con un grado de relación más alto.

***Utilice tantas páginas como sea necesario.