

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



REGULACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR POR LAS HORMONAS GIBERELINAS EN PLANTAS

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: LAURA FERRANDIS MARTÍNEZ

TUTOR: DIEGO ORZÁEZ CALATAYUD

Curso Académico: 2013-14

VALENCIA, 30 de Junio de 2014



TITLE: Regulation of cell differentiation by gibberellins in plants

ABSTRACT: The development of plants is mainly post-embryonic. After germination, new organs are originated in two opposite regions of the plant and they are called the shoot (SAM) and the root (RAM) apical meristems. These meristematic areas contain stem cells that are continuously in an undifferentiated state. The identity of the cells in the SAM is maintained by the activity of transcription factors (TFs) knotted1-LIKE homeobox (KNOX). By contrast, KNOX activity is repressed in the SAM flanks where new organs -leaves or inflorescences- are developed. This is because other TFs, the teosinte BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF (TCPs) and ASYMMETRIC LEAVES1 (*AS1*) promote cell differentiation.

The plant hormone gibberellin (GA) also plays an important role in promoting cell differentiation. However, the mechanism by which exercise this control is not known. It has been discovered that DELLA proteins, which are negative regulators of signaling by GAs and are degraded in response to the hormone, are capable of physically interact with TCPs in *Arabidopsis thaliana*. Here, we test the hypothesis that GAs induce differentiation in the shoot apical region by promoting activity of TCPs. For this reason, we have studied the expression of *AS1*, which is a direct target of TCPs, by histochemical GUS assay performed in mutant backgrounds which express GUS where *AS1* does and mutants with gain of function of TCPs.

Furthermore, RNA quantification assays by qRT-PCR technique were done in wild and mutant GAs altered signaling backgrounds. These studies revealed that DELLAs do not work as transcriptional regulators of *TCP* genes.

KEY WORDS: SAM, KNOX, cellular differentiation, GA, DELLA, TCP, *AS1*

Author of the TFG: Miss. Laura Ferrandis Martínez

Academic tutor: Prof. Mr. Diego Orzáez Calatayud

Cotutor contributor: Mr. David Alabadí Diego

June, 2014 Valencia

TÍTULO: Regulación de la diferenciación celular por las hormonas giberelinas en plantas

RESUMEN: El desarrollo de las plantas es en su mayoría post-embionario. Tras la germinación, los nuevos órganos se originan en dos zonas localizadas en los polos opuestos de la planta y que se denominan meristemos apicales, del tallo (SAM) y de la raíz (RAM). Los meristemos contienen las células madre, que se mantienen continuamente en un estado indiferenciado. La identidad de las células en el SAM se mantiene gracias a la actividad de los factores de transcripción (FTs) KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN (KNOX). Por el contrario, la actividad KNOX está reprimida en los flancos de SAM donde se originan los nuevos órganos – hojas o inflorescencias- gracias a la actividad de otros FTs, los TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF (TCPs) y ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1), que promueven diferenciación celular.

La hormona giberelina (GA) también juega un papel importante promoviendo diferenciación celular aunque no se conoce el mecanismo por el que ejerce este control. Se ha descubierto que las proteínas DELLA, que son los reguladores negativos de la señalización por GAs y son degradadas en respuesta a la hormona, son capaces de interactuar físicamente con los TCPs en *Arabidopsis thaliana*. En este trabajo se prueba la hipótesis de que las GAs inducen diferenciación en la zona apical del tallo promoviendo la actividad de los TCPs. Para ello se ha estudiado cómo se ve influenciada la expresión génica de AS1, una diana directa de los TCPs, mediante ensayo histoquímico GUS realizado en fondos mutantes capaces de expresar GUS allí donde se expresa AS1 y mutantes con ganancia de función de los TCPs.

Por otra parte, la realización de ensayos de cuantificación de RNA mensajeros mediante la técnica de qRT-PCR en fondos silvestres y mutantes con la señalización por GAs alterada, puso de manifiesto que las DELLAs no ejercen una regulación transcripcional sobre los genes TCPs.

PALABRAS CLAVE: SAM, KNOX, diferenciación celular, GA, DELLA, TCP, AS1

Autora del TFG: Dña. Laura Ferrandis Martínez

Tutor académico: Prof. D. Diego Orzáez Calatayud

Cotutor colaborador: D. David Alabadí Diego

Valencia, junio 2014

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer la acogida y ayuda proporcionada por todos los miembros del equipo de investigación de “Señalización Hormonal y Plasticidad Vegetal” del IBMCP. Gracias a Miguel Ángel Blázquez y David Alabadí por confiar en mí para realizar este proyecto en su laboratorio.

A Amelia, gracias por el tiempo dedicado, la ayuda prestada y las enseñanzas proporcionadas durante estos meses. A Noel, gracias por los ánimos y por amenizarnos a todos el trabajo.

Gracias a mis compañeras de aventuras durante estos cuatro años en esto de la Biotecnología. Sin vosotras las jornadas interminables no hubiesen sido tan divertidas ni la carrera tan enriquecedora.

Por último, gracias a mi familia y amigos por acompañarme, apoyarme y creer en mí no solo durante estos años, si no por hacerlo siempre.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. REGULACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR EN EL MERISTEMO APICAL DEL TALLO (SAM)	1
1.2. IMPLICACIÓN DE LOS TCPs EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR	1
1.2.1. AS1: INTERMEDIARIO DE LOS TCPs	2
1.2.2. miR319a: REGULADOR NEGATIVO DE LOS TCPs	3
1.3. PAPEL DE LAS GIBERELINAS EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR	3
1.3.1. PROTEÍNAS DELLA: REGULACIÓN NEGATIVA DE LA SEÑALIZACIÓN POR GAS	4
1.3.2. POSIBLE INTERACCIÓN DELLA-TCPs	4
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1. MATERIAL VEGETAL	7
3.2. CULTIVO DE ARABIDOPSIS THALIANA	7
3.2.1. ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS	7
3.2.2. CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO Y ESTRATIFICACIÓN	8
3.2.3. CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO	8
3.3. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DEL MATERIAL VEGETAL	8
3.3.1. ENSAYO HISTOQUÍMICO GUS	8
3.3.1.1. Tratamiento con distintas concentraciones de PAC	9
3.3.1.2. Tratamiento con PAC y GA ₃	9
3.3.1.3. Tinción GUS	9
3.3.1.4. Visualización al microscopio	10
3.3.2. ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE RNA MENSAJERO	10
3.3.2.1. Tratamiento de choque térmico	11
3.3.2.2. Extracción, purificación y cuantificación del RNA total	11
3.3.2.3. Tratamiento con DNasa y síntesis de cDNA	13
3.3.2.4. Realización de qRT-PCRs	14
3.3.2.4.1. Puesta a punto del cDNA	14
3.3.2.4.2. Preparación de las placas de qRT-PCR	15
3.3.2.4.3. Análisis de las placas de qRT-PCR	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1. LAS GAS REGULAN LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE AS1 EN EL SAM	16
4.1.1. ANÁLISIS DEL TRATAMIENTO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE PAC	16
4.1.2. ANÁLISIS DEL TRATAMIENTO CON PAC Y GA ₃	17

4.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE ARN MENSAJERO DE LOS GENES <i>TCP2</i>, <i>TCP4</i>, <i>AS1</i> Y <i>BP</i> EN <i>Col0</i> Y <i>pHS::gai-1</i>	18
5. CONCLUSIONES	21
6. BIBLIOGRAFÍA	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del modelo propuesto para el mecanismo de regulación de la diferenciación celular en el SAM.

Figura 2. RNA total extraído de plántulas enteras para las diferentes muestras ensayadas (Col0 y *pHS::gai-1D* a t0, t1, t2 y t3).

Figura 3. Ensayo de la actividad β -glucuronidasa. Efectos del PAC en la línea *pAS1::GUS* en distintas condiciones.

Figura 4. Ensayo de la actividad β -glucuronidasa. Efecto del tratamiento con PAC y GA3 en las líneas *pAS1::GUS* y *pAS1::GUS pTCP4::rTCP4-GFP* en distintas condiciones.

Figura 5. Niveles de expresión relativos en los genotipos Col0 y *pHS::gai-1*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. REGULACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR EN EL MERISTEMO APICAL DEL TALLO (SAM)

El desarrollo de las plantas es en su mayoría post-embrionario. Tras la germinación, los nuevos órganos se originan en dos zonas localizadas en los polos opuestos de la planta: el meristemo apical del tallo (SAM) y el meristemo apical de la raíz (RAM). Estas zonas meristemáticas están formadas por una población de células madre pluripotentes que se encuentran en continuo estado de indiferenciación (Galinha et al., 2009). En concreto, la identidad de estas células en el SAM se mantiene gracias a la actividad de los factores de transcripción KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN (KNOX). Estos factores de transcripción se encargan de regular la homeostasis hormonal en el meristemo y están presentes en todas las plantas. En el caso de *Arabidopsis thaliana*, se han descrito cuatro clases hasta el momento: STM, BREVIPEDICELLUS (BP), Kn1-like in *Arabidopsis thaliana*2 (KNAT2) y KNAT6 (Hay and Tsiantis, 2010).

Sin embargo, en los flancos del SAM, donde se originan los nuevos órganos – hojas o inflorescencias-, la actividad de los factores KNOX está reprimida por otro tipo de factores transcripcionales entre los que se encuentra la familia CINNAMOYL COYLIC ACID DEHYDROGENASE (CIN)-like TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF (TCP).

1.2. IMPLICACIÓN DE LOS TCPs EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR

La familia de los TCPs se divide en dos subclases atendiendo a la similitud de sus secuencias: clase I y clase II. En ambos casos, se sabe que estos factores poseen un dominio similar al bHLH que permite su unión a DNA así como interacciones proteína-proteína. En el caso de unión a DNA, los TCPs actúan como factores de transcripción activando o reprimiendo la expresión de ciertos genes (Martin-Trillo and Cubas, 2010).

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se han identificado 13 genes TCP de clase I y 11 de clase II. Estos genes están implicados en diversos aspectos del desarrollo de la planta debido a su

papel regulador en la proliferación y diferenciación celular. Por otra parte, se sabe que muchas de sus funciones son redundantes ya que la inactivación de un solo gen TCP no produce cambios significativos en el desarrollo de la planta (Schommer et al., 2008; Koyama et al., 2010). En el caso de los TCPs de clase II, estos a su vez se subdividen en dos grupos: el grupo CYC/TB1, implicado en el desarrollo de meristemas axilares, y el grupo CINCINNATA (CIN), encargado de promover la diferenciación celular en los primordios foliares. Este trabajo se va a centrar en los TCP tipo CIN, ya que uno de los objetivos que se pretende abordar es el estudio de la influencia de TCPs de este tipo sobre la expresión génica de una de sus dianas: *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)* (Koyama et al., 2010). En particular vamos a centrar nuestro trabajo en TCP2 y TCP4, para los que se dispone de varias herramientas en el laboratorio.

Por otra parte, los TCPs requieren de una estricta regulación para un buen control del tamaño y forma de la hoja. Uno de los mecanismos reguladores más estudiados en este sentido, implica al microRNA 319a (miR319a) que actúa a nivel post-transcripcional regulando la abundancia de algunos genes *TCP* de clase II (Palatnik et al., 2003).

1.2.1. AS1: INTERMEDIARIO DE LOS TCPs

En estudios previos, se ha observado que los genes AS1 y AS2 juegan un papel clave en la formación de las nuevas hojas ya que permiten que estas adopten un correcto plano de simetría. Los genes AS1 y AS2 codifican respectivamente, una proteína nuclear con un dominio myb de unión a DNA (Byrne et al., 2000), y otra proteína también nuclear específica de planta con un dominio AS2/LOB (Iwakawa et al., 2002). Estas dos proteínas forman un complejo cuya finalidad es promover la represión de los ya mencionados genes KNOX. De hecho, se ha visto que el complejo AS1-AS2 reprime de forma directa la transcripción de BP y KNAT2 (Guo et al., 2008). Por otra parte, se sabe que AS1 es diana directa de los TCPs, que actúan promoviendo su expresión y por tanto acentúan la actividad represora sobre los genes KNOX (Koyama et al., 2010). Así pues, los TCPs y el complejo AS1-AS2 actúan en el mismo sentido.

1.2.2. miR319a: REGULADOR NEGATIVO DE LOS TCPs

Los microRNAs son pequeños RNAs constituidos por 21-24 nucleótidos que tienen funciones reguladoras en diferentes aspectos como son el metabolismo de la planta, estreses bióticos y abióticos, señalización hormonal, desarrollo, transcripción o su propia regulación. Estudios con mutantes de análisis de expresión ponen de manifiesto que el microRNA 319a regula diferentes factores de transcripción de tipo TCP: *TCP2*, *TCP3*, *TCP4*, *TCP10*, y *TCP24*. Así pues, los niveles de expresión de RNA de estos *TCPs* se ven reducidos en el mutante *jaw-D*, donde se sobreexpresa de manera constitutiva el miR-319 (Palatnik et al., 2003) y por el contrario, el nivel de transcritos de diferentes *TCPs* aumenta en el mutante *mir319a* donde la expresión del microRNA está suprimida (Nag et al., 2009).

1.3. PAPEL DE LAS GIBERELINAS EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR

Las giberelinas (GAs) son hormonas vegetales que regulan muchos de los procesos relacionados con el crecimiento y desarrollo de las plantas como la germinación, elongación del tallo, expansión foliar, desarrollo floral, etc (Sun, 2010). Por ejemplo, se ha observado que el mutante *ga1*, que es deficiente en GAs, presentan un fenotipo enano de floración tardía que además, si es posteriormente tratado con GA, es capaz de desarrollarse normalmente (Koornneef and Van der Veen, 1980). Aunque hasta el momento se han descubierto más de 130 tipos de GAs, tan solo unas cuantas poseen actividad biológica y en este grupo se incluyen GA_1 , GA_3 , GA_4 y GA_7 (Hedden and Phillips, 2000). Varios estudios han demostrado que una baja actividad de la ruta de las GAs es necesaria para garantizar el correcto funcionamiento del SAM (Hay et al., 2002; Jasinski et al., 2005). En particular, se mostró que una señalización constitutiva de GAs iba en detrimento del correcto mantenimiento del meristemo, y que entre las funciones de STM, una proteína tipo KNOX, está mantener un nivel bajo de GAs en el SAM reprimiendo la expresión de genes implicados en la biosíntesis de la hormona, y por otro lado promover la degradación de la misma (Hay et al., 2002; Jasinski et al., 2005). De este modo, se considera que las GAs actúan en el mismo sentido que los TCPs promoviendo la diferenciación celular en las zonas adyacentes al SAM.

1.3.1. PROTEÍNAS DELLA: REGULACIÓN NEGATIVA DE LA SEÑALIZACIÓN POR GAs

Las DELLAs son un tipo proteico perteneciente a la familia de reguladores transcripcionales específicos de plantas conocida como GRAS. Estas proteínas se han descrito como represores de los procesos dependientes de GA y por tanto se consideran reguladores negativos de su vía de señalización (Sun, 2011). Las DELLAs, al igual que todas las proteínas pertenecientes a la familia GRAS, conservan el dominio C-terminal GRAS involucrado en la regulación transcripcional. Sin embargo, estas se distinguen del resto de proteínas de la familia GRAS por su secuencia N-terminal, en la que se diferencian dos dominios conservados: el dominio DELLA y el dominio TVHYNP (Sun and Gubler, 2004). Este dominio N-terminal media su interacción con los receptores de GAs, las proteínas GID1, en presencia de la hormona; lo que promueve la degradación de las DELLA por el proteosoma 26S (Sun, 2011), de tal manera que los niveles de DELLA disminuyen al aumentar los niveles de GA y viceversa. Estas proteínas se encuentran muy conservadas en diferentes especies vegetales. En el caso de *Arabidopsis*, son cinco: GA-INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF ga1-3(RGA), RGA-LIKE1 (RGL1), RGL2 y RGL3. Estas proteínas desempeñan distintas funciones aunque muestran cierto grado de redundancia (Cheng et al., 2004). Las distintas funciones que desempeñan vienen determinadas principalmente por los distintos patrones de expresión de sus genes, ya que las proteínas presentan la misma actividad bioquímica (Gallego-Bartolomé et al., 2010).

1.3.2. POSIBLE INTERACCIÓN DELLAs-TCPs

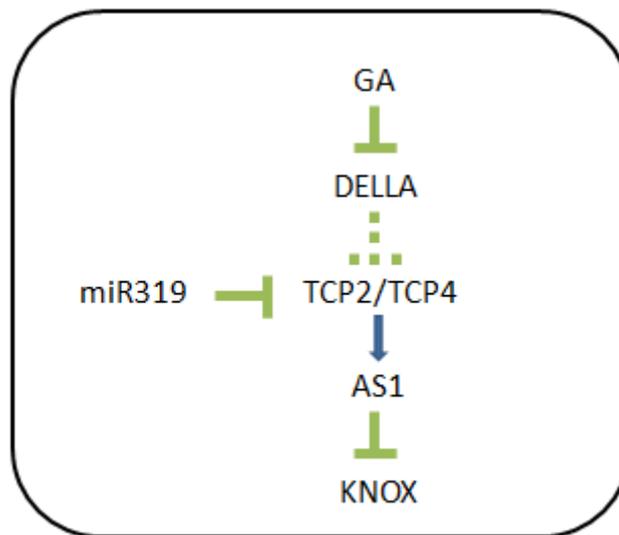
Trabajos recientes del laboratorio de Miguel Angel Blázquez y David Alabadí y de otros laboratorios, han mostrado que las proteínas DELLA controlan la expresión génica regulando la actividad de factores de transcripción (FTs) tras interactuar físicamente con ellos, en algunos casos los inactivan mientras que en otros casos los activan (Locascio et al., 2013). Entre los FTs con los que interactúan las DELLA se ha visto que la proteína DELLA GAI es capaz de interactuar con TCP2 y TCP4 en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

Puesto que las GAs y los TCPs promueven diferenciación celular y las GAs inducen la degradación de las proteínas DELLA, parece razonable pensar que las DELLA estarían regulando negativamente la actividad de los TCPs. Así pues, la hipótesis que queremos probar se

muestra en la Figura 1. De este modo, los genes KNOX, las proteínas DELLAs y el mir319a actúan en el mismo sentido promoviendo la actividad meristemática, mientras que las GAs, los TCPs y AS1 promueven la diferenciación celular en los flancos del SAM. De hecho, resultados no publicados del laboratorio de Miguel Ángel Blázquez y David Alabadí muestran que la expresión de *AS1* disminuye como consecuencia de la acumulación condicional de GAI, resultados que se enmarcan perfectamente en el contexto de la hipótesis planteada.

Figura 1. Esquema del modelo propuesto para el mecanismo de regulación de la diferenciación celular en el SAM.

Leyenda



2. OBJETIVOS

En este trabajo se pretenden abordar dos objetivos:

- El primer objetivo es estudiar la regulación de *AS1* por el módulo regulador DELLA-TCP.
- El segundo objetivo es estudiar si las GAs, a través de las proteínas DELLA, ejercen una regulación transcripcional sobre los genes *TCP*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Se han empleado semillas de *Arabidopsis thaliana* tanto del ecotipo Landsberg *erecta* (Ler) como del ecotipo Columbia-0 (Col-0). En el caso de Col-0, además de la línea silvestre, se emplearon otras dos líneas transgénicas: *pAS1::GUS*, esta línea permite que el gen de la β -glucoronidasa (*GUS*) se exprese en aquellos lugares donde lo hace *AS1* (Iwakawa et al., 2002); y *pHS::gai-1*, que expresa una versión dominante de GAI bajo el control de un promotor inducible por calor (Alabadí et al., 2008).

Por su parte, el genotipo en fondo *Ler* empleado fue el resultado del cruce entre la ya mencionada línea *pAS1::GUS* y la línea *pTCP4::rTCP4-GFP* generada en el laboratorio. Esta línea expresa la versión TCP4 resistente a la regulación negativa ejercida por el miR319, por tanto se trata de una versión mutante de ganancia de función. La línea se preparó con la construcción obtenida del laboratorio del Dr. Javier Palatnik (Instituto de Biología Molecular y Celular, Rosario, Argentina). Se empleó la línea homocigota *pAS1::GUS pTCP4::rTCP4-GFP*.

3.2. CULTIVO DE ARABIDOPSIS THALIANA

3.2.1. ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS

Para la esterilización de las semillas se siguió el siguiente protocolo:

1. Realizar un lavado con 1 ml de solución con etanol al 70% y el surfactante Tritón X-100 al 0.05% durante 10 minutos en agitación.
2. Eliminar la solución de etanol y Tritón X-100.
3. Realizar un lavado con etanol al 96% durante 5 minutos en agitación.
4. Eliminar el etanol y dejar secar.

3.2.2. CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO Y ESTRATIFICACIÓN

Una vez esterilizadas, las semillas se sembraron en placas Petri con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sólido cubierto con discos de papel de filtro estéril para facilitar su posterior manejo. El medio se preparó con agua milliQ suplementada con sales de MS al 0.44% (p/v), sacarosa al 1% (p/v) y agar bacteriológico al 0.8% (p/v). Este se llevó a un pH de 5.7 por adición de KOH y se autoclavó durante 20 min a 120°.

Tras la siembra, las semillas se dejaron a 4°C durante 3 días en condiciones de oscuridad permitiendo su estratificación y así, la sincronización en el proceso de germinación. Las placas, una vez estratificadas, se incubaron (7 o 10 días según el ensayo realizado) en una cámara en condiciones controladas: luz continua (100 μ E/m²/s), 22°C de temperatura y una humedad relativa del 50%.

3.2.3. CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO

Para llevar a cabo el ensayo histoquímico GUS se empleó medio MS líquido elaborado con agua milliQ suplementada con sales de MS al 0.44% (w/v) y sacarosa al 1% (w/v). Este se llevó a un pH de 5.7 por adición de KOH y se autoclavó durante 20 min a 120°.

El medio líquido ya esterilizado y enfriado, se suplementó, bien con el inhibidor de la síntesis de GAs, paclobutrazol (PAC) 10 μ M o bien con el volumen equivalente de acetona y se distribuyó en placas de 12 pocillos (CytoOne) siendo 2 mL el volumen final de cada pocillo. Las plántulas crecidas en MS sólido durante 7 o 10 días se pasaron a cultivo líquido (cuatro plántulas por pocillo).

3.3. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DEL MATERIAL VEGETAL

3.3.1. ENSAYO HISTOQUÍMICO GUS

Para el ensayo histoquímico se cultivaron semillas de las líneas *pAS1::GUS* y *pAS1::GUS pTCP4::rTCP4* en medio MS sólido. Una vez cultivadas las plántulas y para cada línea, se procedió a su tratamiento con PAC y GA3.

3.3.1.1. Tratamiento con distintas concentraciones de PAC

Este primer tratamiento se aplicó solamente a la línea *pAS1::GUS*. Para ello se sembró en MS sólido durante 7 días pasados los cuales se sometieron las plántulas a tres condiciones distintas (20 plántulas para cada condición):

- Condición 0 (control): MS líquido con acetona (mock) durante 1 día.
- Condición 1: MS líquido con PAC 0.1 μM durante 1 día.
- Condición 2: MS líquido con PAC 10 μM durante 18 horas.

3.3.1.2. Tratamiento con PAC y GA_3

Este tratamiento se aplicó a las líneas *pAS1::GUS* y *pAS1::GUS pTCP4::rTCP4-GFP* y consistió en someter a las plántulas cultivadas durante 10 días en MS sólido, a tres condiciones diferentes (20 plántulas para cada condición):

- Condición 0 (control): MS líquido con acetona (mock) durante 18 horas.
- Condición 1: MS líquido con PAC 10 μM durante 18 horas.
- Condición 2: MS líquido con PAC 10 μM durante 18 horas. Transcurridas las 18 horas, adición de GA_3 100 μM durante 3 horas.

3.3.1.3. Tinción GUS

El protocolo de tinción o GUS que se llevó a cabo para cada línea y condición del tratamiento con PAC a distintas condiciones se expone a continuación:

1. Sumergir 20 plántulas en un bote de plástico con tapa con acetona previamente enfriada a -20°C .
2. Pasados 3 minutos, aplicar 1 minuto de vacío.
3. Dejar a 4°C durante 45 minutos.
4. Cambiar la acetona y dejar otros 5 minutos a 4°C .

5. Retirar la acetona con la pipeta Pasteur y lavar con 2 ml de *Staining buffer* 0.5 mM para el primer tratamiento o 2 mM de ferro-ferri-cianato de potasio para el segundo. Dejar durante 15 minutos a 4°C.
6. Retirar la solución y adicionar otros 2 ml en cada bote. Dejar a 4°C durante 30 minutos.
7. Añadir 10 µl del sustrato de la reacción, X-Gluc, a una concentración final de 10 µM a cada bote.
8. Dejar a 37°C hasta ver tinción azul. En el caso del primer tratamiento las muestras se incubaron durante 24 horas; en el segundo las muestras estuvieron 72 horas a 37°C.
9. Parar la reacción retirando la solución y adicionar 2 ml de alcohol al 20%.
10. Realizar una serie de lavados de 1 hora con etanol a concentraciones crecientes (30, 40, 50, 60 y 70%) y dejar 2 días en etanol al 70%.
11. Retirar el etanol y añadir solución de *chlorhydrate* para que claree el tejido. Dejar 5 días antes de su visualización al microscopio (Este último paso no se aplicó en el caso del primer tratamiento).

3.3.1.4. Visualización al microscopio

Las plántulas se observaron con el microscopio Nikon EclipseE600. Para ello se colocaron 3-4 plántulas en un portaobjetos cubierto con H₂O estéril y el correspondiente cubreobjetos.

3.3.2. ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE RNA MENSAJERO

Para este ensayo se emplearon semillas del ecotipo Col-0; tanto las silvestres como las pertenecientes a la línea *pHS::gai-1*. Previamente a la aplicación del tratamiento, se sembraron 4 placas por línea en medio MS sólido y se crecieron durante 7 días en luz continua.

Como gen de referencia para la posterior normalización de los datos se empleó el gen de la *ACTINA8 (ACT8)*. Este se emplea habitualmente en ensayos de PCR cuantitativa en *Arabidopsis thaliana* ya que sus niveles de expresión no varían bajo distintas condiciones experimentales.

De este modo, determinando el ratio entre la cantidad de cDNA del gen de interés y la del gen control se obtiene la cuantificación relativa para cada muestra. El ratio obtenido se compara entonces entre las diferentes muestras.

Asimismo, se emplearon como controles positivos de expresión los genes de *AtGA20ox2* y *gai-1*, cuya expresión debe verse aumentada en la línea *pHS::gai-1* al ser tratado con calor.

3.3.2.1. Tratamiento de choque térmico

Una vez cultivadas las plántulas, se realizó el tratamiento de choque térmico. Este consistió en incubar ambas líneas a 37°C durante una hora en luz continua. Posteriormente se recogió el tejido vegetal a distintos tiempos (0, 2, 4 y 8 horas). Este se guardó a -80°C.

3.3.2.2. Extracción, purificación y cuantificación del RNA total

Con el material vegetal sometido al tratamiento de choque térmico se llevó a cabo la extracción y purificación de RNA siguiendo el manual de MACHEREY-NAGEL (NucleoSpin® RNA Plant). El protocolo se expone a continuación:

1. Homogeneización de la muestra. Machacar en torno a 100 mg del tejido en presencia de N₂ líquido.
2. Pasar el tejido ya homogeneizado a un eppendorf que contenga 350 µL de Buffer RA1 y 3.5 µL de β-mercaptoetanol.
3. Pasar la mezcla anterior por una columna de filtración colocada sobre un tubo de filtración de 2 mL (ambos proporcionados por NucleoSpin®). Centrifugar durante 1 minuto a 11.000 g.
4. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 mL.
5. Añadir 350 µL de etanol al 70% y mezclar pipeteando.
6. Sin dejar que se forme precipitado, pasar la mezcla por una columna de extracción de RNA colocada sobre un tubo de filtración de 2 mL (ambos proporcionados por NucleoSpin®) y centrifugar 30 segundos a 11.000 g.

7. Pasar la columna a un nuevo tubo de 2mL (proporcionado por NucleoSpin®) y añadir 350 µL de MDB (Membrane Desalting Buffer). Centrifugar 1 minuto a 11.000 g para secar la membrana, descartar el líquido sobrante y colocar de nuevo la columna sobre ese tubo.
8. Añadir 200 µL de Buffer RAW2 y centrifugar 30 segundos a 11.000 g. Cambiar la columna a un nuevo tubo de 2 mL (proporcionado por NucleoSpin®).
9. Adicionar 600 µL de Buffer RA3 y centrifugar 30 segundos a 11.000 g. Descartar el líquido sobrante y colocar la columna sobre ese mismo tubo.
10. Añadir 250 µL de Buffer RA3 y centrifugar 2 minutos a 11.000 g. Pasar la columna a un tubo de 1.5 mL libre de nucleasas (proporcionado por NucleoSpin®).
11. Adicionar 60 µL H₂O libre de RNasas y centrifugar 1 minuto a 11.000 g para eluir el RNA.

Tras la extracción, se cuantificó el RNA contenido en cada muestra y se corrió un gel de electroforesis para comprobar que el RNA no se hubiera degradado. Por ello, las muestras se mantuvieron en hielo una vez finalizada la extracción.

La cuantificación de RNA se realizó en el NanoDrop ND-1000. Tras comprobarse que en todas las muestras había una concentración aceptable de RNA, se pasó a elaborar el gel de electroforesis con un porcentaje de agarosa del 0,5%. Previamente, se lavó todo el material con el detergente dextrán para evitar la degradación del RNA. El gel se corrió a 90V durante media hora.

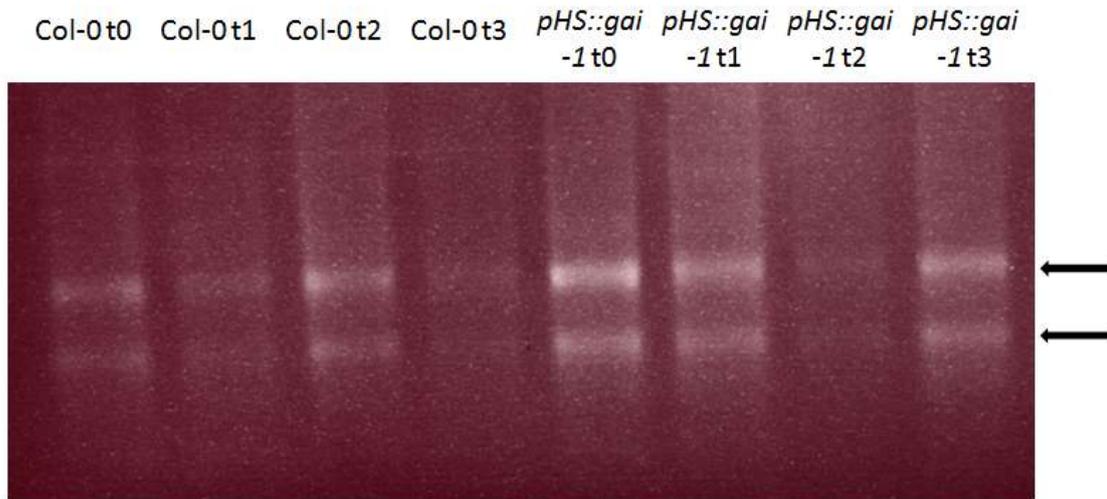


Figura 2. RNA total extraído de plántulas enteras para las diferentes muestras ensayadas (Col-0 y *pHS::gai-1* a t0, t1, t2 y t3). Las flechas señalan las bandas correspondientes a las dos subunidades ribosómicas propias del RNA extraído de tejido vegetal (25S y 18S).

Se puede comprobar que ninguna de las muestras estaba degradada ya que en todas las carreras se visualizaron las dos bandas pertenecientes a las dos subunidades ribosómicas mayoritarias (25S y 18S) del RNA vegetal (Fig. 2).

3.3.2.3. Tratamiento con DNasa y síntesis de cDNA

Para llevar a cabo el tratamiento con DNasa fue necesario en primera instancia llevar todas las muestras de RNA a un volumen de 20 μ l con una concentración de RNA de 100 ng/ μ L. Seguidamente se llevó a cabo el protocolo expuesto a continuación para cada muestra (kit comercial de Ambion):

1. Añadir 2 μ l de 10x DNasa Buffer.
2. Añadir 0.5 μ l de DNasa y mezclar suavemente. Dejar 30 minutos a 37°C.
3. Añadir 4.5 μ l de DNasa Tnactivation Reagent. Dejar 2 minutos a temperatura ambiente mezclando ocasionalmente.
4. Centrifugar 2 minutos a 15.000 rpm.
5. Recoger el sobrenadante donde se encuentra el RNA.

Tras el tratamiento con DNasa, se procedió a la síntesis de cDNA (kit comercial de TakaRa). Primeramente y para cada muestra, se preparó un tubo eppendorf con 8 µl de la muestra inicial tratada con DNasa, 1 µl de Oligo dT y 1 µl de dNTPs. A continuación se adicionaron 10 µl del mix necesario para llevar a cabo la reacción de síntesis, seguido de vórtex suave y un spin. Todo esto se realizó en hielo. Seguidamente, se incubó a 42°C durante 50 minutos para iniciar y llevar a cabo la síntesis del cDNA. Por último, se incubó durante 15 minutos a 70°C para parar la reacción de síntesis y se guardó a -20°C.

La composición de la mezcla para una reacción se muestra a continuación:

5x Prime Script Buffer.....	4 µl
RNasa inhibitor.....	0.5 µl
RTasa.....	0.8 µl
H ₂ O.....	4.7 µl

3.3.2.4. Realización de qRT-PCRs

El ensayo llevado a cabo para la cuantificación de RNA de los genes de interés tras ser sometidos al choque térmico se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Esta técnica permite determinar el número de ciclo en el que el producto de PCR, en este caso cDNA, es detectado por vez primera permitiendo de este modo su cuantificación.

3.3.2.4.1. Puesta a punto del cDNA

Para que las qRT-PCRs sean comparables y representativas es necesario que todas las muestras de cDNA estén a la misma concentración. Para ello, en primer lugar, se llevaron todas las muestras a un volumen de 100 µl por la adición de 80 µl de H₂O y se midieron en el NanoDrop ND-1000. Una vez medidas todas las muestras, se escogió como referencia aquella con menor concentración (134 ng/µl) y se llevaron el resto de muestras a dicha concentración.

3.3.2.4.2. Preparación de las placas de qRT-PCR

Para el análisis de todas las muestras se emplearon 2 placas de PCR (Applied Biosystem). En la primera, se analizaron las muestras correspondientes a los dos primeros tiempos (0 y 2 horas) para ambos genotipos. Por su parte, en la segunda placa se analizaron las muestras tomadas a 4 y 8 horas, también para los dos genotipos.

En cuanto a la preparación de las placas, se realizaron 3 réplicas técnicas por cada par de oligos y muestra. En cada pocillo se pipetearon 20 μ l: 9 μ l del mix de oligos correspondiente (1.2 μ l oligoF 5 μ M, 1.2 μ l oligoR 5 μ M y 6.6 μ l H₂O), 1 μ l de cDNA y 10 μ l de SYBR Green (TakaRa).

El SYBR Green es capaz de unirse a las moléculas de doble cadena de cDNA y emitir fluorescencia cuando es excitado a 494 nm permitiendo de ese modo la detección de los ácidos nucleicos.

3.3.2.4.3. Análisis de las placas de qRT-PCR

Las placas se analizaron mediante el software Applied Biosystem 7500 Fast Real-Time PCR System, configurándolo en las opciones de *Quantitation-comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$), SybrGreen Reagents, Standard PCR (2 hours)*.

En primer lugar, para que los datos correspondientes a ambas placas fueran comparables, se ajustó el valor de *Threshold* de tal modo que en ambas placas dicho valor fuera el mismo para cada gen. A continuación, los datos crudos se sometieron a un primer tratamiento en el mismo programa para eliminar las curvas anómalas que pudieran distorsionar el posterior análisis estadístico.

Una vez obtenidos los datos sometidos al primer tratamiento, estos fueron exportados a la herramienta de Microsoft Office Excel 2010 para su tratamiento estadístico y su conversión a un formato gráfico. Para ello, primeramente se calculó el ratio entre el control de *ACT8* y el gen de interés con los valores correspondientes a la media de las 3 réplicas técnicas ensayadas para cada muestra; se calculó además la desviación típica en cada caso. Una vez normalizados los datos y para cada gen, se tomó como referencia el valor de la muestra Col-0 a t₀ y se igualó a 1. Ya relativizados, los datos se representaron como los niveles relativos de expresión entre Col-0 y *pHS::gai-1* en función del tiempo para cada gen y referenciados a la muestra Col-0 t₀.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. LAS GAs REGULAN LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE *AS1* EN EL SAM

Con el fin de desafiar la hipótesis sobre la implicación de las GAs en la regulación de la diferenciación celular en el SAM (Fig. 1), se llevó a cabo el ensayo histoquímico GUS en material vegetal sometido a dos tipos de tratamiento como se describe el apartado 3.3.1.1 de Material y métodos.

Sabiendo que el PAC actúa como inhibidor de la síntesis de GAs, el tratamiento de las plántulas con esta sustancia provoca la acumulación de proteínas DELLAs en todos aquellos tejidos donde se expresen sus genes. La predicción si nuestra hipótesis es correcta, es que las DELLAs regularán negativamente la actividad de los TCPs y por tanto disminuirá la expresión de *AS1*, por lo que esperaríamos ver una disminución de la señal GUS en la zona apical del tallo, debida a la mencionada menor expresión de *AS1*.

Por su parte, la posterior aplicación de GA₃ en un segundo tratamiento debería revertir el efecto provocado por el PAC, ya que la hormona promueve la degradación de las DELLAs.

4.1.1. ANÁLISIS DEL TRATAMIENTO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE PAC

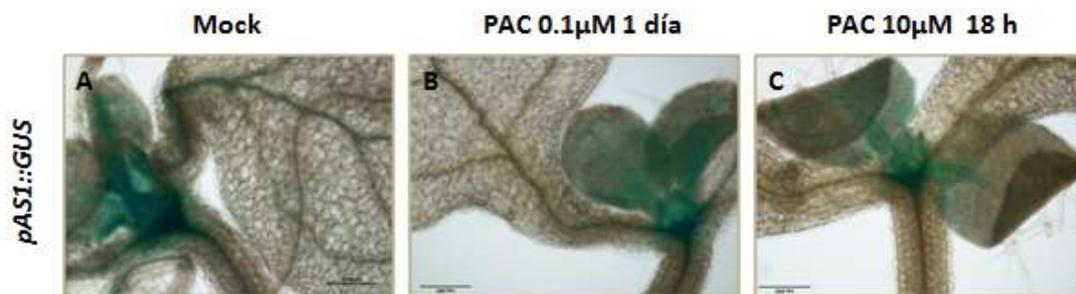


Figura 3. Ensayo de la actividad β -glucuronidasa. Efectos del PAC en la línea *pAS1::GUS* en distintas condiciones. Control (A), PAC 0.1 μ M durante 1 día (B) y PAC 10 μ M durante 18 horas (C).

El ensayo histoquímico permitió corroborar nuestra hipótesis (Fig. 2). Así pues, vemos que la señal de tinción azul propia de la actividad GUS disminuye conforme aumenta la concentración de PAC aplicada a las plántulas. De este modo, los resultados obtenidos respaldan la hipótesis de partida y así, la acumulación de DELLAs en la zona apical del tallo debida al efecto inhibitorio del PAC sobre la biosíntesis de GAs, estaría a su vez inhibiendo la expresión de *AS1*, probablemente como consecuencia de su efecto negativo sobre los TCPs.

4.1.2. ANÁLISIS DEL TRATAMIENTO CON PAC Y GA₃

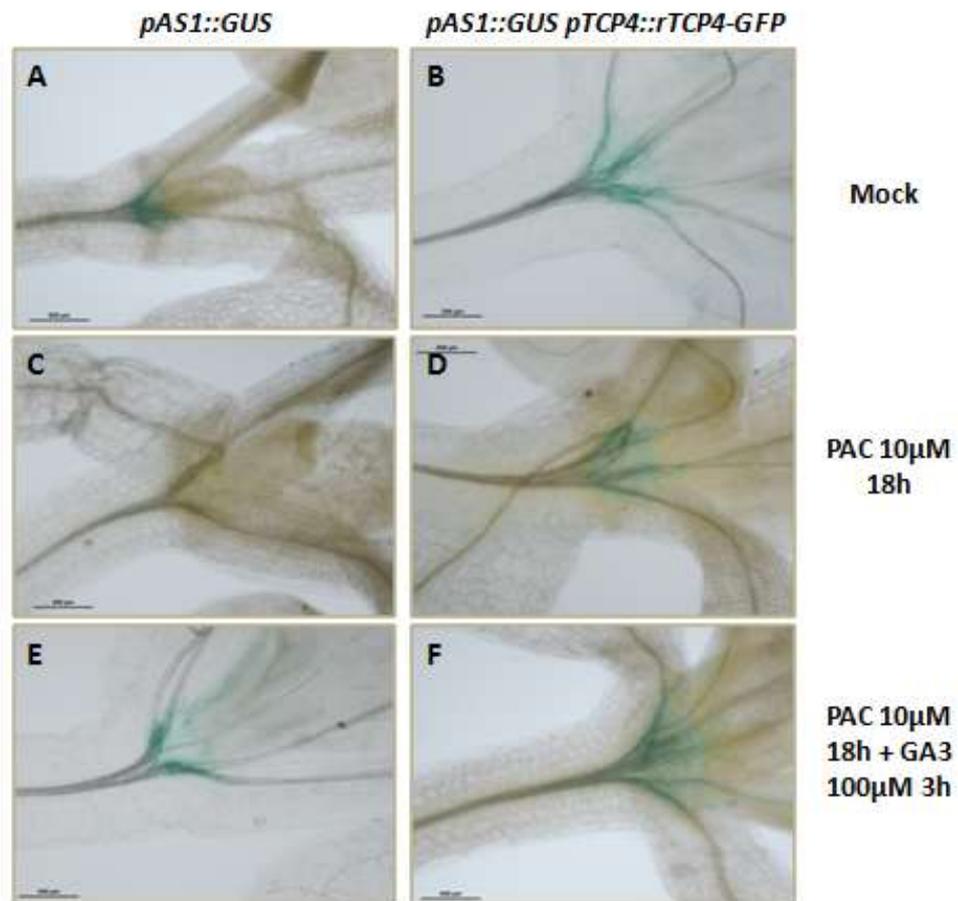


Figura 4. Ensayo de la actividad β -glucuronidasa. Efecto del tratamiento con PAC y GA₃ en las líneas *pAS1::GUS* y *pAS1::GUS pTCP4::rTCP4-GFP* en distintas condiciones.

(A) y (B) control

(C) y (D) PAC 10 μ M durante 18 horas

(E) y (F) PAC 10 μ M durante 18 horas + GA₃ 100 μ M durante 3 horas

Los resultados del segundo ensayo histoquímico parecen apuntar en la misma dirección que los resultados obtenidos en el primero ya que, para la línea *pAS1::GUS* (Fig. 4A, C y E) los efectos del PAC también provocan una disminución de la señal de GUS (Fig. 4C), lo que significa una menor expresión de *AS1*, como hemos mostrado anteriormente. Por su parte, el posterior tratamiento con GA_3 produce también los efectos esperados ya que las plántulas sometidas a esa condición recuperan el color azul en la zona meristemática (Fig. 4E). Estos resultados son muy interesantes, ya que nos indican claramente que la represión de *AS1* es una consecuencia, muy probablemente directa, de la acción de las proteínas DELLA ya que el tratamiento es suficiente para degradarlas y así aliviar la represión ejercida sobre *AS1*. En cuanto a la línea *pAS1::GUS pTCP4::rTCP4-GFP*, no parece que haya diferencias significativas entre la condición control (Fig. 4B) y el tratamiento con PAC (Fig. 4D). Este hecho puede deberse a la presencia del transgen *pTCP4::rTCP4-GFP* que confiere resistencia al miR-319, habiendo de esta manera mayor actividad de TCP4 y por tanto no siendo tan sensible a la acumulación de DELLAs como en un fondo silvestre, lo que hace que la expresión de *AS1* no se vea afectada.

Por otra parte, si se compara la expresión de *AS1* en las dos líneas ensayadas para la condición control (Fig. 4A y B), el tratamiento con PAC (Fig. 4C y D) y el tratamiento con PAC y GA_3 (Fig. 4E y F), se puede apreciar una señal más extendida en la línea *pAS1::GUS pTCP4::rTCP4-GFP* en todos los casos. Esto estaría en consonancia con lo descrito en el párrafo anterior ya que la ganancia de función de TCP4 conferida por la resistencia al miR319 permitiría a la planta (i) acumular TCP4 en dominios donde normalmente no se expresaría como consecuencia de la regulación negativa ejercida por el microRNA, y (ii) ser menos susceptible a la inhibición por las proteínas DELLA.

4.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE ARN MENSAJERO DE LOS GENES *TCP2*, *TCP4*, *AS1* Y *BP* EN Col-0 Y *pHS::gai-1*

Como se ha mencionado anteriormente, ensayos realizados en el laboratorio de Miguel Ángel Blázquez y David Alabadí, han puesto de manifiesto la interacción física entre las proteínas GAI y TCP2 y TCP4. Por su parte, el ensayo histoquímico GUS llevado a cabo en el presente trabajo parece indicar que en dicha interacción, GAI actúa como regulador negativo de los TCPs. Es decir, las proteínas DELLA regulan la actividad de los TCPs a nivel post-traducciona

Sin embargo, hasta el momento no se ha determinado si las DELLAs ejercen algún tipo de regulación transcripcional sobre los *TCPs*. Es por esto que en este trabajo se ha planteado el ensayo mediante qRT-PCR de los niveles de RNA mensajero de los genes *TCPs* en respuesta a la acumulación de DELLAs, así como de genes regulados aguas abajo de los mismos, como son *AS1* y *BP* (Figura 1).

Los resultados obtenidos para este ensayo se muestran en la Figura 5. Las gráficas obtenidas representan los niveles de expresión relativos entre el genotipo silvestre y el mutante de los distintos genes analizados y fueron obtenidas según el procedimiento descrito en el apartado 3.3.2.4.3 de Material y métodos.

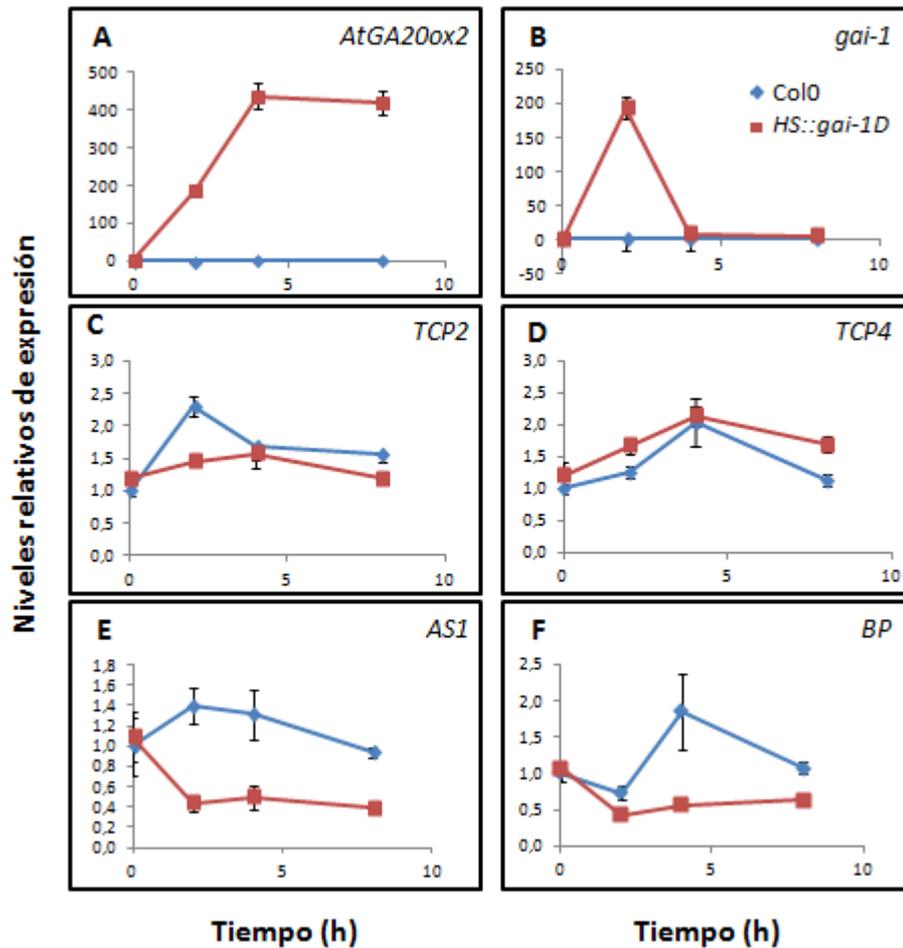


Figura 5. Niveles de expresión relativos en los genotipos Col-0 y *pHS::gai-1* en función del tiempo transcurrido tras un tratamiento de una hora de choque térmico (37°C) para los genes (A) *AtGA20ox2* (B) *gai-1* (C) *TCP2* (D) *TCP4* (E) *AS1* y (F) *BP*. Para cada muestra se realizaron tres réplicas técnicas. Los datos empleados corresponden a la media \pm SD.

Se puede comprobar que la reacción de qRT-PCR funcionó correctamente ya que los controles positivos (Fig. 5A y B) se comportaron según lo esperado en la línea *pHS::gai-1* en respuesta a choque térmico, ya que se indujo eficientemente la expresión de *gai-1* y la de una de sus dianas primarias, *AtGA20ox2*. En cuanto a la posible regulación transcripcional de los genes *TCP* por parte de las DELLAs, los resultados obtenidos en este ensayo, parecen indicar que dicha regulación no tiene lugar ya que, tanto *TCP2* como *TCP4* (Fig. 5C y D) no ven alterada su expresión tras la acumulación de GAI.

En cambio, en el caso de *AS1* sí se observa una alteración en sus niveles de expresión (Fig. 5E). Parece ser que el módulo regulador DELLA-TCP sí regula de algún modo la transcripción de *AS1* de modo que sus niveles de expresión se ven disminuidos. Este comportamiento concuerda con la hipótesis de partida en la que las DELLA promueven la actividad meristemática y regulan negativamente la actividad del factor *AS1*, el cual contribuye a la diferenciación celular en los flancos del SAM. Además, en estudios previos basados en “microarrays” (Gallego-Bartolomé et al., 2011) también se observó una disminución de la expresión de *AS1* debida a la acumulación de *gai-1* en ensayos realizado con la línea *pHS::gai-1*.

Por su parte, los niveles de expresión de *BP* también parecen verse alterados en el ensayo (Fig. 5E). Según el modelo propuesto, lo esperable sería que la expresión de *BP* se viera aumentada ya que, si la actividad de *AS1* disminuye la expresión de *BP* debería verse favorecida al ser *AS1* su regulador negativo. Sin embargo, lo que se observa en la gráfica correspondiente es una disminución de la expresión de este gen. En el laboratorio se ha encontrado que la proteína DELLA GAI interacciona físicamente con *BP* y se baraja la hipótesis de que esta interacción favorece la actividad de la propia *BP*. Entre otras funciones, *BP* reprime su propia expresión, por lo que una sobre acumulación de *gai-1* en la línea inducible por calor podría promover la actividad de *BP* en este sentido y por tanto causar la disminución en los niveles de expresión de *BP* que se observan en la gráfica. Si esto ocurriera, contrarrestaría el aumento debido a la disminución del regulador negativo *AS1*.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo con el análisis de los resultados obtenidos en los distintos ensayos realizados se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Las DELLAs parecen actuar como reguladores negativos de los TCPs, y como consecuencia la expresión de *AS1* disminuye en la zona apical del tallo.
- Las DELLAs no ejercen una regulación a nivel transcripcional sobre los genes *TCPs*.
- Las DELLA regulan negativamente la expresión de BP probablemente por un mecanismo que no incluye el módulo TCP-AS1.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alabadí D, Gallego-Bartolomé J, Orlando L, García-Cárcel L, Rubio V, Martínez C, Frigerio M, Iglesias-Pedraz JM, Espinosa A, Deng XW, Blázquez MA** (2008) Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. *Plant J* **53**: 324-335
- Byrne ME, Barley R, Curtis M, Arroyo JM, Dunham M, Hudson A, Martienssen RA** (2000) Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature* **408**: 967-971
- Cheng H, Qin L, Lee S, Fu X, Richards DE, Cao D, Luo D, Harberd NP, Peng J** (2004) Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* **131**: 1055-1064
- Galinha C, Bilsborough G, Tsiantis M** (2009) Hormonal input in plant meristems: A balancing act. *Semin Cell Dev Biol* **20**: 1149-1156
- Gallego-Bartolomé J, Alabadí D, Blázquez MA** (2011) DELLA-induced early transcriptional changes during etiolated development in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE* **6**: e23918
- Gallego-Bartolomé J, Minguet EG, Marín JA, Prat S, Blázquez MA, Alabadí D** (2010) Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in Arabidopsis. *Mol Biol Evol* **27**: 1247-1256
- Guo M, Thomas J, Collins G, Timmermans MC** (2008) Direct repression of KNOX loci by the ASYMMETRIC LEAVES1 complex of Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 48-58
- Hay A, Kaur H, Phillips A, Hedden P, Hake S, Tsiantis M** (2002) The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr Biol* **12**: 1557-1565
- Hay A, Tsiantis M** (2010) KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity. *Development* **137**: 3153-3165
- Hedden P, Phillips AL** (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* **5**: 523-530
- Iwakawa H, Ueno Y, Semiarti E, Onouchi H, Kojima S, Tsukaya H, Hasebe M, Soma T, Ikezaki M, Machida C, Machida Y** (2002) The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of Arabidopsis thaliana, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. *Plant Cell Physiol* **43**: 467-478
- Jasinski S, Piazza P, Craft J, Hay A, Woolley L, Rieu I, Phillips A, Hedden P, Tsiantis M** (2005) KNOX action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr Biol* **15**: 1560-1565

- Koornneef M, Van der Veen JH** (1980) Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor Appl Genet* **58**: 257-263
- Koyama T, Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M** (2010) TCP Transcription Factors Regulate the Activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as Well as the Auxin Response, during Differentiation of Leaves in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**: 3574-3588
- Locascio A, Blázquez MA, Alabadí D** (2013) Genomic Analysis of DELLA Protein Activity. *Plant Cell Physiol* **54**: 1229-1237
- Martin-Trillo M, Cubas P** (2010) TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends Plant Sci* **15**: 31-39
- Nag A, King S, Jack T** (2009) miR319a targeting of TCP4 is critical for petal growth and development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 22534-22539
- Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D** (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425**: 257-263
- Schommer C, Palatnik JF, Aggarwal P, Chetelat A, Cubas P, Farmer EE, Nath U, Weigel D** (2008) Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biol* **6**: e230
- Sun TP** (2010) Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development. *Plant Physiol* **154**: 567-570
- Sun TP** (2011) The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. *Curr Biol* **21**: R338-345
- Sun TP, Gubler F** (2004) Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 197-223