





## **RESUMEN.**

La disminución en la cantidad y calidad de la luz es un estrés al que las plantas están sometidas en ambientes densamente poblados por otras plantas, ya que se ensombrecen unas a otras. Para enfrentarse a la sombra, aumentar su eficiencia fotosintética y en definitiva competir con sus vecinas, muchas especies vegetales han desarrollado una estrategia denominada respuesta de evasión a sombra (SAR), caracterizada por la elongación de hipocótilos o la hiponastia de las hojas entre otros fenotipos (Casal 2012). La SAR es un proceso regulado por distintos mecanismos, siendo el reloj circadiano uno de ellos (Sellaro et al. 2012). Este consiste en un oscilador endógeno, presente en múltiples organismos, que controla todo tipo de procesos metabólicos, fisiológicos y de comportamiento, siguiendo ritmos oscilatorios de aproximadamente 24 horas (Más 2005). En este trabajo se muestra una vía de la regulación circadiana de la SAR no descrita anteriormente, a través de la interacción entre el factor de transcripción PHYTOCROME INTERACTING FACTOR 7 (PIF7) y la proteína del reloj central GIGANTEA (GI). El mecanismo consiste en la represión a nivel de proteína ejercida por GI sobre PIF7, evitando que este último pueda activar la transcripción de genes implicados en la SAR, mediante lo que parece un mecanismo de secuestro independiente de la degradación de PIF7.

**Palabras clave:** *Respuesta de evasión a sombra (SAR), PHYTOCROME INTERACTING FACTOR 7 (PIF7), GIGANTEA (GI), reloj circadiano, luz, Arabidopsis thaliana.*

## **ABSTRACT.**

Quantity and quality light reduction is a stress for plants that live in densely populated environments, as they shade each other. To cope with shade, increase their photosynthetic efficiency and ultimately compete with their neighbors, many plant species have developed a strategy called shade avoidance response (SAR), characterized by hypocotyl elongation or leaf hyponasty among other phenotypes (Casal 2012). SAR is a process regulated by different mechanisms and the circadian clock is one of them (Sellaro et al. 2012). The circadian clock consists of an endogenous oscillator that is present in multiple organisms, which controls all kinds of metabolic, physiological and behavioral processes, following oscillatory rhythms of approximately 24 hours (More 2005). In this work we show a previously undescribed pathway of SAR circadian regulation, through the interaction between the transcription factor PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 7 (PIF7) and the central clock protein GIGANTEA (GI). The mechanism involves protein-level repression of PIF7 by GI, preventing the latter from activating the transcription of genes involved in SAR, by what appears to be a degradation-independent sequestration mechanism of PIF7.

**Key words:** *Shade avoidance response (SAR), PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 7 (PIF7), GIGANTEA (GI), circadian clock, light, Arabidopsis thaliana.*

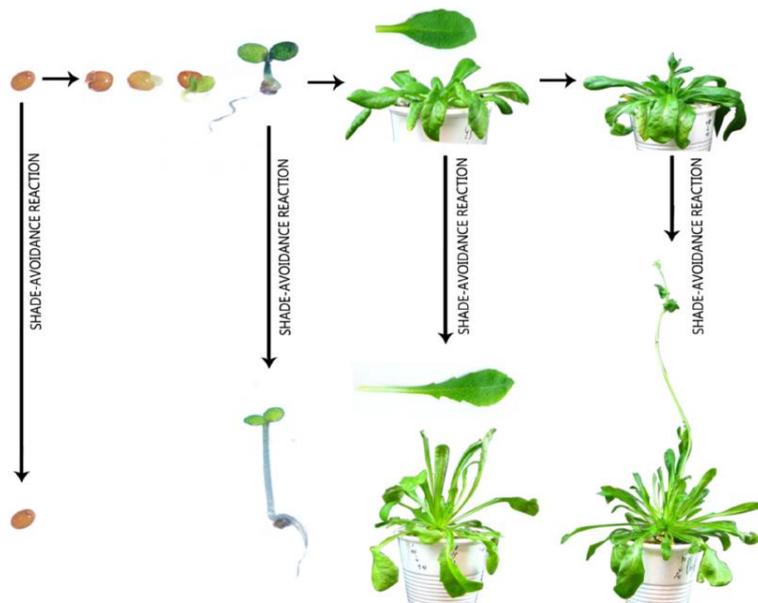
## ÍNDICE.

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>1.1. La respuesta a sombra</b> .....	6
<b>1.2. El reloj circadiano</b> .....	9
<b>1.3. La intersección entre el reloj circadiano y la respuesta a sombra</b> .....	11
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	13
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	14
<b>3.1. Material vegetal utilizado y condiciones de cultivo</b> .....	14
<b>3.2. Construcción de los vectores utilizados</b> .....	14
<b>3.3. Análisis fenotípico</b> .....	15
<b>3.4. Análisis de genes regulados por GI y PIF7</b> .....	15
<b>3.5. Análisis de interacción proteica por doble híbrido</b> .....	16
<b>3.6. Extracción de ARN, retrotranscripción y análisis de expresión génica por RT-qPCR</b> .....	16
<b>3.7. Expresión proteica por TNT® y ensayo de co-inmunoprecipitación (CoIP)</b> .....	17
<b>3.8. Agroinfiltración de Nicotiana benthamiana y ensayo de transactivación</b> ..	17
<b>3.9. Extracción proteica y cuantificación por Western blot</b> .....	19
<b>3.10. Análisis estadístico</b> .....	19
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	19
<b>4.1. GI regula negativamente la respuesta de evasión a sombra</b> .....	19
<b>4.2. GI y PIF7 regulan conjuntamente la respuesta de evasión a sombra</b> .....	21
<b>4.3. GI y PIF7 regulan la expresión de genes comunes participantes en la respuesta de evasión a sombra</b> .....	23
<b>4.4. GI y PIF7 interaccionan entre sí</b> .....	29
<b>4.5. GI afecta la actividad de PIF7</b> .....	31
<b>4.6. GI no afecta a la estabilidad de PIF7</b> .....	32
<b>5. CONCLUSIÓN</b> .....	34
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	35
<b>7. MATERIAL SUPLEMENTARIO</b> .....	39

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. La respuesta a sombra.

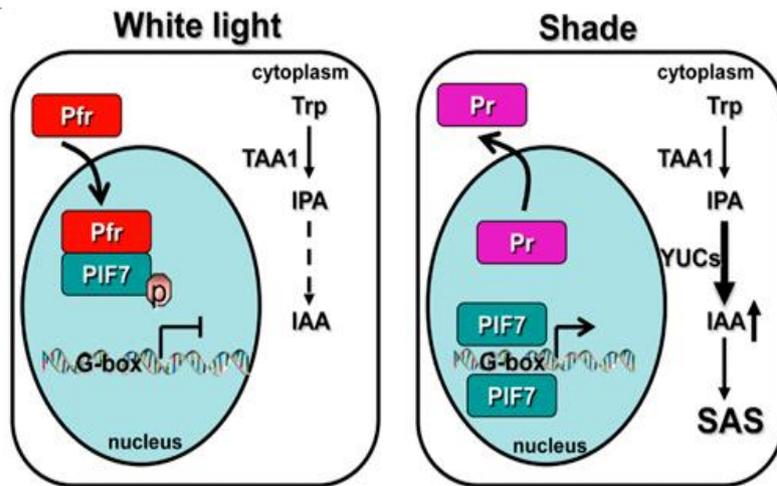
La luz es un factor imprescindible para la vida de las plantas, ya que la necesitan para realizar la fotosíntesis y así producir los compuestos orgánicos necesarios para su supervivencia. Se denomina radiación fotosintéticamente activa (PAR), a aquella fracción de la luz que se sitúa entre los 400 nm y los 700 nm que puede ser aprovechada por las plantas. Una reducción de la PAR influye negativamente en el desarrollo vegetal, siendo la sombra uno de los factores más importantes que provocan este detrimento. Así, cuando las plantas crecen rodeadas de vegetación que compromete la cantidad y el tipo de luz recibida, son capaces de responder a través de dos tipos de estrategias: la tolerancia a sombra y la evasión de esta (SAR). Esta última, es la más común, se da en plantas que crecen en ambientes luminosos y consiste en un conjunto de cambios con los que en definitiva las plantas pretenden reducir la cantidad de sombra recibida. Entre estos cambios, destacan la represión en la germinación de las semillas, la elongación de hipocótilos y la elevación de los cotiledones y hojas de roseta en las plántulas, así como la hiponastia de las hojas y una floración temprana en las plantas adultas (Figura 1) (Gommers et al. 2013, Casal, 2012).



**Figura 1. Respuesta de Evasión a Sombra (SAR) en *A. thaliana*, caracterizada por (de izquierda a derecha en la figura): retraso en la germinación de las semillas, mayor elongación de los hipocótilos en plántulas, hiponastia de las hojas y adelanto de la floración en plantas adultas. Casal, 2012.**

La luz que llega a las plantas tras ser filtrada por la vegetación de alrededor o por sus propias hojas se caracteriza por contener una relación entre rojo (R) y rojo lejano (FR) inferior a 1 ( $R:FR < 1$ ), al contrario que cuando incide de manera directa, donde la ratio  $R:FR$  es mayor que 1 ( $R:FR > 1$ ). Esto es debido a que el rojo lejano incrementa al ser reflejado por las paredes celulares, mientras que el rojo disminuye al ser absorbido por la clorofila. Además, se produce una gran reducción en la cantidad de luz azul percibida, al ser absorbida también por las plantas vecinas, generándose en definitiva un tipo de luz que las plantas detectan como sombra y en consecuencia actúan para evitarla (Li et al. 2012; Keuskamp et al. 2012). Por último, la sombra también se caracteriza por una disminución de la luz verde y la ausencia de luz UV-B, que queda totalmente absorbida por la vegetación circundante, aunque la influencia de estas longitudes de onda en la SAR es menos importante que la de las dos anteriores (Buti et al. 2020).

A nivel molecular, cuando no hay sombra y la ratio  $R:FR > 1$ , la luz roja es percibida por los fotorreceptores fitocromos (PHY). En *Arabidopsis* hay cinco: PHYA, PHYB, PHYC, PHYD y PHYE. En cuanto a PHYB, la luz roja excita su forma citosólica captadora de esta (Pr,  $\lambda_{max} = 600nm$ ) y la convierte en la forma captadora de la luz roja-lejana (Pfr,  $\lambda_{max} = 730nm$ ). En esta última conformación, PHYB se transloca al núcleo donde interacciona con una serie de factores de transcripción tipo bHLH (basic helix-loop-helix) denominados PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs), e induce su fosforilación y degradación. Sin embargo, en presencia de sombra, cuando la ratio  $R:FR < 1$ , Pfr se convierte en Pr, quedando PHYB retenido en el citoplasma y permitiendo a los PIFs acumularse y promover la expresión de los genes que provocan el fenotipo típico de SAR (Figura 2) (Li et al. 2012). El mecanismo por el que funciona PHYA es bastante similar, pero al contrario que PHYB, es poco estable y su forma Pfr es rápidamente ubiquitinada y degradada por el proteasoma 26S. Además, para desplazarse del citosol al núcleo requiere la participación de las proteínas FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL 1 (FHY1) y FAR-RED-ELONGATED HYPOCOTYL1-LIKE (FHL), y su pico de actividad se encuentra en el rojo lejano, de forma que, en condiciones moderadas de sombra, la actividad de PHYA no incrementa, sólo lo hace si la vegetación de alrededor es muy densa y por lo tanto la sombra generada muy severa (Casal et al. 2012). PHYC, PHYD y PHYE actúan de forma parecida y sus roles son similares, pero son sin duda PHYA y PHYB los que más influencia tienen en la SAR, siendo el último el que predomina sobre el resto (Buti et al. 2020).



**Figura 2. Modelo molecular de la percepción de la sombra por PHYB y su transducción a la expresión de genes de señalización, transporte y síntesis de auxinas en respuesta a esta:** la forma de PHYB Pfr se transforma en su forma Pr, saliendo del núcleo celular y liberando a PIF7 que es capaz de unirse a las secuencias G-box de los promotores de genes como TAA1 y YUCs que incrementan la concentración de auxinas (IAA) en la planta. Li et al., 2012.

En cuanto a la luz azul, esta es percibida por los fotorreceptores criptocromos (CRY). En concreto, son CRY1 y CRY2 los que perciben una reducción en la cantidad de luz azul en situaciones de sombra en *Arabidopsis*. Al igual que los fitocromos, CRY1 y CRY2 perciben la luz azul e inactivan a una serie de factores de transcripción, de manera que, en presencia de sombra, los criptocromos no se activan y en consecuencia no reprimen a dichos factores (Buti et al. 2020). Muchos de los factores de transcripción que interaccionan con los CRYs son los mismos que interaccionan con los fitocromos, como PIF4 y PIF5. Sin embargo, el mecanismo por el que los criptocromos reclutan e interaccionan con los PIFs u otros factores de transcripción implicados en la SAR está menos estudiado (Keuskamp et al. 2012, Casal, 2012).

Por otro lado, dentro de los factores de transcripción que participan en la respuesta a sombra, PIF4 y PIF5 fueron los primeros en describirse. Sin embargo, los últimos estudios en este campo sugieren a PIF7 como el máximo responsable de activar los procesos que se traducen en la SAR (Mizuno et al. 2015). Al contrario que el resto de PIFs, que se degradan al ser fosforilados por PHYB durante la exposición a luz directa, PIF7 es fosforilado pero no se produce esta degradación, sino que es más estable. En cualquier caso, tal y como describen Li y sus colaboradores, PIF7 se desfosforila en respuesta a sombra, permitiendo su unión a las secuencias G-box presentes en los promotores de genes responsables de la síntesis, transporte y señalización de auxinas, como son *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1 (TAA1)* o los genes *YUCCA (YUCs)*. Así, el incremento en la expresión de estos genes promovido

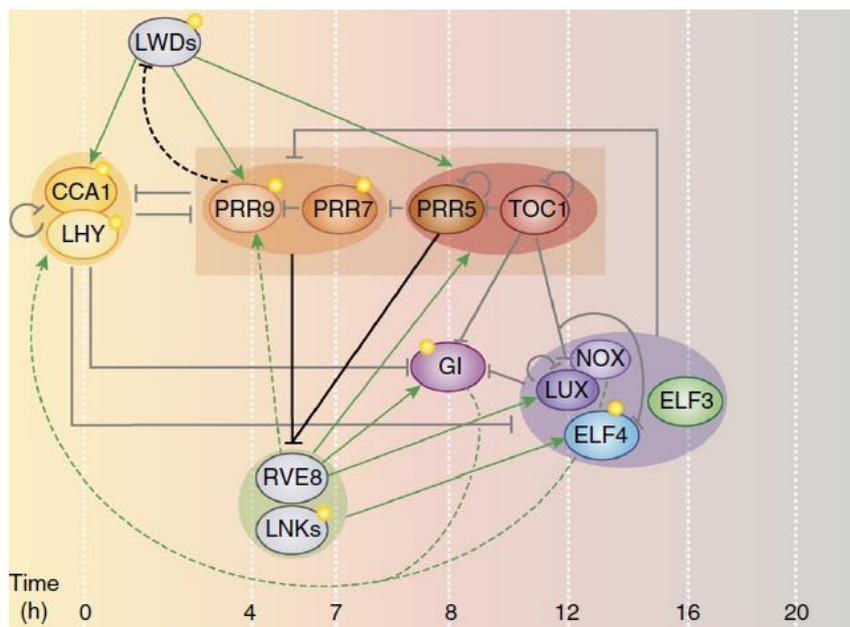
por PIF7, se traduce en una acumulación de ácido indolacético (IAA) en los cotiledones, que se transporta a los tejidos meristemáticos y otros tejidos adyacentes, provocando la elongación típica de la SAR (Figura 2) (Li et al. 2012).

Por último, a pesar de que las auxinas son las hormonas que juegan un papel mayoritario en la respuesta a sombra, no son las únicas que participan en la SAR, ya que se ha demostrado que un tratamiento de sombra incrementa también la síntesis de giberelinas, etileno o brasinoesteroides, siendo en algunos casos también regulados por los PIFs (Yang & Li 2017).

## **1.2. El reloj circadiano.**

La rotación de la Tierra es la responsable de los fenómenos del día y la noche, que genera además un conjunto de oscilaciones predecibles en las condiciones ambientales, lo que ha promovido en los seres vivos el desarrollo de unos dispositivos biológicos que les permiten anticiparse y adaptarse a estas. Se conocen como relojes circadianos, cuyo funcionamiento consiste en la generación de ritmos oscilatorios (ciclos circadianos) de aproximadamente 24 horas, implicados en diversos procesos como el metabolismo, la fisiología, o el comportamiento (Más, 2005; Nohales & Kay 2016). Los relojes circadianos se encuentran en animales, plantas, hongos y algunos microorganismos, y a pesar de que han evolucionado de forma diferente en cada uno de ellos, en eucariotas el mecanismo central de funcionamiento es muy similar, pues se basa en bucles de retroalimentación que regulan la transcripción y traducción de las proteínas implicadas en el reloj. Sin embargo, mientras que en animales y hongos los componentes del reloj suelen ser factores de transcripción, que actúan como elementos positivos y promueven la expresión de sus propios represores, en plantas prevalecen los elementos negativos (Bell-Pedersen et al. 2005, Nohales & Kay, 2016). Así, en la figura 3 se muestra un esquema-resumen de cuáles son y cómo se reprimen unos a otros a nivel transcripcional en *Arabidopsis thaliana*. Tal y como se puede observar, al amanecer CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) y LATE ELONGATED HYPOCOTIL (LHY) reprimen la expresión de los genes *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR (PRRs)*, *TIMMING OF CAB EXPRESSION (TOC1)*, *GIGANTEA (GI)* y los miembros del complejo EVENING COMPLEX (EC): *LUX ARRHYTHMO (LUX)*, *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* y *EARLY FLOWERING 4 (ELF4)*. Para ello, deben primero fosforilarse y formar heterodímeros que se unen a las regiones llamadas Evening Element (EE) de los promotores de los genes a los que reprimen. Además, CCA1 y LHY también se reprimen entre ellos. Por otro lado, PRR9, PRR7, PRR5 y TOC1 se expresan consecutivamente a lo largo del día y reprimen la expresión de CCA1 y LHY, así como

la de ellos mismos. Por la tarde, TOC1 reprime también a *GI*, *LUX* y *ELF4*, y por último, el complejo EC se expresa al anochecer y reprime la expresión de *GI*, *PRR9* y *PRR7*. Por otro lado, aunque son minoritarios, también existen componentes activadores del sistema que inducen la expresión de otros. Es el caso de las proteínas LIGHT REGULATED WD (LWDs), que se expresan por la mañana e inducen la expresión de *CCA1*, *PRR9* y *PRR5*, que probablemente están reprimidas por *PRR9*. También, REVEILLE 8 (*RVE8*) y los NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED (*LNKs*) se expresan por la tarde e inducen la expresión de *PRR5*, *TOC1* y *ELF4*. *RVE8* también induce a *PRR9*, *GI* y *LUX*, y *GI* parece ser necesario para la activación de *CCA1* y *LHY* al igual que *ELF4*. Por otro lado, además de la regulación a través del control de la transcripción, el reloj circadiano también está regulado post-transcripcionalmente mediante fenómenos de splicing alternativo sobre todo y, a nivel post-traduccionale, por medio de interacciones proteína-proteína y de mecanismos de fosforilación o degradación proteica (Nohales & Kay 2016).



**Figura 3. Esquema del reloj central en *A.thaliana*.** Tal y como se explica en el texto, está conformado principalmente por proteínas expresadas a distintos tiempos a lo largo del día que evitan la expresión de otras proteínas implicadas en el reloj. También existen elementos que activan la transcripción de otros componentes del reloj, pero estos son minoritarios (Nohales & Kay 2016).

En plantas, la existencia de un reloj central que permita anticiparse a los cambios ambientales es fundamental para su supervivencia, ya que debido a su naturaleza sésil, no son capaces de huir si se tienen que enfrentar a los estreses abióticos o bióticos, que con frecuencia, se dan en un determinado momento del día (Greenham & McClung, 2015). De esta manera, el reloj ha evolucionado con estos estreses para que la planta

pueda responder adecuadamente a ellos. Así, aunque las oscilaciones rítmicas del reloj sean constantes a lo largo del tiempo, el funcionamiento del reloj circadiano es también sensible a las condiciones ambientales, como la luz y la temperatura (Más, 2005), y no solo eso, sino que también afecta a cómo estas señales son percibidas (Nohales & Kay, 2016). Sin embargo, el estudio de cómo las señales ambientales son integradas por el reloj, es un campo mucho menos estudiado que el reloj en sí, y aún queda mucho por descubrir (Nohales, 2019).

En referencia a la luz, la señal ambiental que influye mayoritariamente en el funcionamiento del reloj, se sabe que la transición lumínica producida al amanecer sirve como punto de partida para que el reloj inicie su ciclo. De esta forma, una oscuridad prolongada provoca en muchos de los componentes del reloj una oscilación arrítmica, siendo por ello los fotorreceptores unos elementos imprescindibles para el correcto funcionamiento del reloj (Oakenfull & Davis, 2017). Existen más de 10 fotorreceptores asociados a los ritmos circadianos que se pueden dividir en 4 grupos: fitocromos, criptocromos, miembros de la familia ZTL/FKF1/LKP2 y UVR8 (ULTRAVIOLET RESISTANCE LOCUS 8), siendo los dos primeros los más importantes (Oakenfull & Davis, 2017). Cómo los fotorreceptores transmiten la información percibida al reloj no está totalmente claro, aunque existen estudios que empiezan a aportar cierta información sobre este fenómeno. Por ejemplo, se sabe que PHYB interacciona físicamente con el componente del reloj central ELF3, proporcionando una entrada directa de la información lumínica al reloj (Kolmos et al. 2011). También PIF3, un factor de transcripción cuya función es fotodependiente, es capaz de unirse a las regiones promotoras de los genes de *CCA1* y *LHY* y afectar su expresión (Martínez-García et al. 2000). Además, los propios componentes del reloj regulan la actuación de estos fotorreceptores, ya que se ha demostrado que sus niveles de transcripción, su acumulación a nivel de proteína, o la dimerización de estos varía a lo largo del día de forma rítmica (Oakenfull & Davis, 2017).

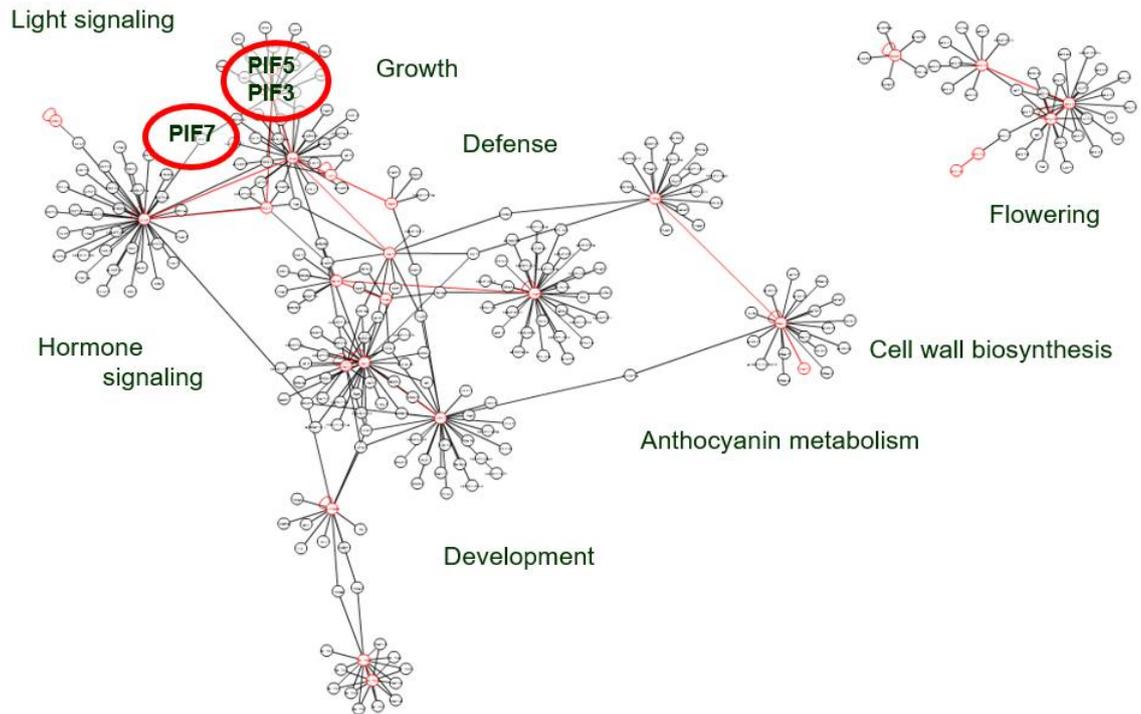
### **1.3. La intersección entre el reloj circadiano y la respuesta a sombra.**

La regulación circadiana del crecimiento fotodependiente en las plantas es ampliamente conocida. Por ejemplo, se sabe que el crecimiento de los hipocótilos de *Arabidopsis thaliana* está regulado mayoritariamente por los factores de transcripción PIF4 y PIF5, cuyos niveles de expresión siguen ciclos circadianos que presentan su pico máximo de expresión por la mañana, en ciclos de día largo (16h luz/8h de oscuridad), y por la noche, antes del amanecer, en ciclos de día corto (8h luz/16h oscuridad). Estos patrones de expresión están regulados por las proteínas del reloj LUX, ELF3 y ELF4, que ejercen

una modulación negativa (Nusinow et al. 2011). Así, el reloj circadiano regula la expresión de los genes de respuesta a auxinas, responsables de la elongación de los hipocótilos, mediante el control de PIF4 y PIF5, de forma que estos se elongan en determinados momentos del día. Además, esta regulación no se da solo por PIFs, sino que se han descrito otros factores de transcripción como RVE1, regulado a nivel circadiano, que también son capaces de modular el crecimiento de hipocótilos dependiente de auxinas (Farré, 2012).

Por otro lado, aunque está menos estudiada, la respuesta a sombra también ofrece una regulación de este tipo (Farré, 2012), tal y como se demuestra en la investigación llevada a cabo por Sellaro y colaboradores (Sellaro et al. 2012), en la que se comprobó cómo, al aplicar un tratamiento de 2 horas de sombra a distintos tiempos del día, en plantas de *A.thaliana* crecidas bajo un fotoperiodo de 10h luz/14h oscuridad, únicamente pasadas las 8 horas de luz las plantas eran capaces de responder y elongar sus hipocótilos. Es decir, aunque se aplicara sombra por la mañana, las plantas no respondían a esta, sino que sólo lo hacían por la tarde. A continuación, repitieron los experimentos con distintos mutantes, observando que en el doble mutante *lhy;cca1* las plantas eran también capaces de elongar sus hipocótilos por la mañana, indicando que de alguna manera este fenómeno está reprimido a este tiempo por el reloj circadiano.

Sin embargo, existen toda una serie de proteínas integrantes del reloj central cuya implicación en la respuesta a sombra no ha sido estudiada. Una de estas es GIGANTEA (GI), una proteína específica de plantas cuya expresión se da por la tarde-noche y que se ha descrito como fundamental para mantener la periodicidad de los ritmos circadianos y la sincronización del reloj con el ambiente. Además de su rol en el reloj central, se ha demostrado que GI regula respuestas coordinadas por este, como al estrés abiótico, la floración fotoperiódica o la señalización por luz. Sin embargo, cómo GI afecta a todas estas respuestas ha empezado a ser estudiado de forma reciente. Se sabe que es capaz de interactuar con múltiples proteínas de diversas redes celulares, que tiene un papel como co-chaperona y que es capaz de modular la transcripción de los genes responsables del tiempo de floración mediante la interacción con sus reguladores transcripcionales (Nohales et al. 2019). En referencia a esto último, usando la colección de factores de transcripción de *A.thaliana* generada por el investigador Pruneda-Paz y sus colaboradores (Pruneda-Paz et al. 2014), mediante un ensayo masivo de doble híbrido, se estudió con cuáles de estas proteínas es capaz de interactuar GI (Figura 4).



**Figura 4.** Red de interacción de Gl con factores de transcripción de *A.thaliana*, Red de interacción generada a partir de datos obtenidos de un ensayo masivo de interacción de doble híbrido entre Gl y los factores de transcripción de *A.thaliana* descritos por Pruneda Paz y colaboradores (Pruneda Paz et al. 2014) realizado en el Chory Lab.

Así, de los 1956 factores de transcripción examinados (Figura 4), Gl es capaz de interactuar con multitud de ellos implicados en respuestas de todo tipo, entre los que se encuentran PIF4, PIF5 y PIF7, que están implicados en la respuesta de evasión a sombra.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

Dado que la SAR está regulada a nivel circadiano, que la literatura existente atribuye a Gl un papel de intermediario entre el reloj central y la respuesta a múltiples procesos, y visto que los estudios previos a la realización de este proyecto apuntan a que esta proteína es capaz de interactuar con factores de transcripción clave en la respuesta de evasión a sombra, se hipotetizó que Gl podría regular la SAR a través de su interacción con PIF7, ya que este último es el factor de transcripción más importante en ella. Así, los objetivos de esta investigación son:

- Comprobar si Gl participa en la modulación de la respuesta a sombra.

- Estudiar si esta modulación la realiza a través de factores de transcripción tipo PIF y verificar si lo hace principalmente a través de PIF7.
- Caracterizar el mecanismo por el que GI y los PIFs regulan conjuntamente la respuesta a sombra.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1. Material vegetal utilizado y condiciones de cultivo.

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron las siguientes líneas de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*: la línea silvestre Columbia-0 (Col-0); las líneas mutantes de pérdida de función *gi-2* (Kim et al. 2012), *pif7-1* (Leivar et al. 2008), *gi-2;pif7-1* (línea obtenida por cruce genético previamente a la realización de este proyecto), *pif5-1* (Fujimori et al. 2004), *pif3-1* (Kim et al. 2003), *pif4-101;pif5-1* (Lorrain et al. 2008), *gi-2;pif5-1*, *gi-2;pif3-1* y *gi-2;pif4-101;pif5-1* (Nohales et al. 2019) y las líneas transgénicas pGI::GI-YPET-FLAG;*gi-2* (pGI) y 35S::GI-YPET-FLAG;*gi-2* (GIOx) (Nohales et al. 2019). Las semillas fueron esterilizadas, cultivadas en medio MS (Murashige & Skoog) y estratificadas durante 2 días en oscuridad a 4°C. Tras inducir germinación durante 1 día en luz continua, se cultivaron en cámaras de cultivo según las condiciones indicadas para cada experimento. En aquellos que requerían de la aplicación de un tratamiento de sombra, esta fue imitada aplicando luz con las siguientes propiedades: Rojo (R) 13  $\mu$ E, Azul (B) 1,23  $\mu$ E, Rojo Lejano (FR) 20,2  $\mu$ E; Ratio R:FR 0,7, mientras que la luz blanca se caracterizaba por: 30-50  $\mu$ E de luminancia y R:FR 1,2.

#### 3.2. Construcción de los vectores utilizados.

La construcción de cada uno de los vectores utilizados a lo largo de este proyecto se realizó con el sistema Gateway® (Invitrogen). Para clonar *PIF7* se encargó un gBlock™ (IDT) con la secuencia codificante de este gen flanqueada por los sitios *attB1* en el extremo 5' y *attB2* en el extremo 3'. A continuación, se clonó en el vector pDONR207 por medio de la reacción de recombinación BP (Gateway®, Invitrogen) y posteriormente se subclonó por recombinación LR (Gateway®, Invitrogen) en los vectores pGADT7, pTNT-HA y pEG201 utilizados en los ensayos de doble híbrido, co-inmunoprecipitación y expresión transitoria, respectivamente.

En el caso de *GI* y *GFP* se emplearon las construcciones disponibles pTNT-FLAG-GI (generada previamente a la realización de este proyecto) para los experimentos de co-inmunoprecipitación y pEG202-GI y pEG201-GFP (Nohales et al. 2019) para los de expresión transitoria. La construcción pDONR207-GI+ (Nohales et al. 2019) se utilizó para subclonar GI en el vector de doble híbrido pGBKT7 por reacción LR

(Gateway<sup>®</sup>, Invitrogen). Por último, en los ensayos de luminiscencia se utilizó la construcción reportera pPIL1::LUC en el vector pGreenII 0800-LUC (pGLUCpPIL1) ya descrita por otros investigadores (Nohales et al. 2019, Hellens et al. 2005).

Tanto *PIF7* como *GFP* llevaban asociada la etiqueta HA en los experimentos de expresión transitoria y co-inmunoprecipitación, mientras que *GI* llevaba asociada la etiqueta FLAG en estos mismos.

### **3.3. Análisis fenotípico.**

Para los experimentos de análisis fenotípico (Figuras 5B, C y 6), se crecieron los genotipos oportunos en las condiciones indicadas más adelante y se midió la longitud de los hipocótilos o el ángulo de los petiolos con el software de edición y tratamiento de imagen ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Las imágenes utilizadas para las mediciones se obtuvieron escaneando las muestras con un escáner CanonScanLide400 (Canon) y las fotografías de la figura 5A se realizaron con un Macroscopio Leica DMS 1000.

### **3.4. Análisis de genes regulados por GI y PIF7.**

Con el fin de identificar genes regulados comúnmente por GI y PIF7, se compararon datos disponibles de secuenciación masiva de RNA (RNASeq) y de cromatina inmunoprecipitada (ChIPSeq) tanto para GI (Nohales et al. 2019) como para PIF7 (Chung et al. 2020). En el caso del análisis transcriptómico por RNASeq de los mutantes *gi-2*, se trata de un experimento no publicado. Dicho experimento fue realizado a partir de líneas mutantes *gi-2* cultivadas durante 7 días bajo condiciones de día corto (8h luz/ 16h oscuridad) de las que se recogieron muestras a 4 tiempos: 0h tras el inicio del período de luz (Zeitgeber Time ZT0), ZT4, ZT10 y ZT16. Los datos de expresión fueron comparados con los del ecotipo silvestre Col-0 cultivado bajo las mismas condiciones, considerándose genes diferencialmente expresados (DEGs) a aquellos que tenían un p-valor significativo ( $p < 0,05$ ) a cualquier tiempo. Estos datos se compararon con los DEGs en un mutante de *PIF7* obtenidos por Chung y colaboradores por medio de RNASeq (Chung et al. 2020). Con ambas listas de DEGs se realizó un Diagrama de Venn para identificar los genes en común (<https://www.biovenn.nl/>) y con estos se realizó un análisis de sobrerrepresentación de categorías de ontología génica (GO) usando como parámetros: “Text Type: Fisher’s Exact” y “Correction: Calculate Fisher Discovery Rate” en la plataforma PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>).

En cuanto al análisis de los datos de ChIPSeq, los datos de asociación de GI (Nohales et al. 2019) se compararon con los datos del ChIPSeq de PIF7 publicados por Chung y colaboradores (Chung et al. 2020). El análisis se realizó de la misma manera que en el

caso del RNAseq, comparándose finalmente las potenciales dianas comunes entre GI y PIF7 obtenidas del RNASeq y del ChIPSeq.

Por último, se realizó un diagrama de Venn entre los genes comunes diferencialmente expresados en mutantes de *GI* y *PIF7* y los genes comunes obtenidos del solapamiento entre los ChIPSeq de GI y PIF7. A los genes resultantes también se les realizó un análisis de sobrerrepresentación de categorías de ontología génica (GO) como en los dos casos anteriores.

### **3.5. Análisis de interacción proteica por doble híbrido.**

Se utilizaron las construcciones pGADT7-PIF7, pGADT7- $\theta$  y pGBKT7-GI que fueron transformadas en levaduras de la cepa AH109 cultivadas previamente en medio YPDA. Se co-transformó por un lado pGADT7-PIF7 y pGBKT7-GI, y por otro pGADT7- $\theta$  y pGBKT7-GI. Para llevar a cabo la transformación, se extrajo con un asa de siembra una cantidad considerable de células de levaduras previamente crecidas en medio YPDA sólido durante 48h a 28 °C. Se mezclaron con una solución de ADN compuesta por 1,5  $\mu$ g de cada construcción y 5  $\mu$ L de 1% de ssDNA precalentado a 90 °C en un volumen final de 50  $\mu$ L de agua, además de con 0,5 mL de solución de transformación (40% PEG 400, 100 mM de acetato de litio, 10 mM de Tris pH 7,5 y 0,4 mM de EDTA). Cada una de las mezclas con las construcciones pertinentes se incubaron durante la noche a temperatura ambiente y al día siguiente se mezclaron de nuevo y se incubaron 15 min a 42 °C, se centrifugaron 4 min a 8000 rpm y el precipitado se resuspendió en 200  $\mu$ L de agua. A las 2-3h de incubación a 28 °C, se cultivaron en medio SD sólido sin leucina ni triptófano. A los 3-4 días, cuando las levaduras hubieron crecido, se traspasaron a medio SD de selección sin leucina, ni triptófano ni histidina, y con distintas concentraciones de 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) (2,5; 5 y 10 mM), un inhibidor de la síntesis de histidina. A los 3-4 días se evaluó si las colonias habían crecido en el medio de selección y cómo de fuerte era la interacción entre las proteínas dependiendo de si eran capaces de crecer en las concentraciones superiores de 3-AT.

### **3.6. Extracción de ARN, retrotranscripción y análisis de expresión génica por RT-qPCR.**

Para la extracción de ARN, las muestras se cosecharon, se congelaron rápidamente en N<sub>2</sub> líquido y se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su procesamiento. A continuación, se trituraron evitando su descongelación por medio de un molino de bolas (Retsch 400 MM) y la extracción de ARN se llevó a cabo con un kit de extracción de ARN de plantas (Macherey-Nagel). La conversión a cDNA se hizo a partir 0,5 o 1  $\mu$ g de ARN total de partida, dependiendo de la concentración obtenida en la extracción,

empleando el kit de retrotranscripción “NZY First-Strand cDNA Synthesis” (Nzytech). El análisis de expresión génica se hizo por PCR cuantitativa (qPCR) usando el kit “TB Green® Premix EX Taq™ (Tli RNaseH Plus)” (Takara) diluyendo 1/8 o 1/4 el cDNA, dependiendo de si se generó respectivamente a partir de 1 o 0,5 µg de RNA total, y el sistema de Applied Biosystems™ QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System. La normalización de la expresión de los distintos genes se realizó respecto a la expresión del gen de referencia *ISOPENTENYL PYROPHOSPHATE:DIMETHYLALLYL PYROPHOSPHATE ISOMERASE 2 (IPP2)*.

### **3.7. Expresión proteica por TNT® y ensayo de co-inmunoprecipitación (CoIP).**

Por cada reacción, se usaron 1,5 µg de las construcciones pTNT-FLAG-GI, pTNT-HA-PIF7 y pTNT-HA-θ diluidas en un volumen final de 20 µL al que se le añadieron 30 µL del reactivo del sistema TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System (Promega). Se incubaron a 25 °C durante 3 horas, y tras la reacción, se extrajeron 5 µL del volumen final para usarlo como input de la CoIP (5 µL muestra, 15 µL agua, 5 µL de Laemmli 5X (Laemmli 1X (LB 1X): 60 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10 mM DTT, 10% glicerol y 0,01% de azul de bromofenol). Para la inmunoprecipitación, se mezclaron los extractos proteicos de pTNT-Flag-GI y pTNT-HA-PIF7 por un lado y pTNT-FLAG-GI y pTNT-HA-θ por otro, para posteriormente realizar la inmunoprecipitación de manera similar a la descrita por Pedmale y sus colaboradores (Pedmale et al. 2016). Concretamente, se mezclaron 45 µL de cada reacción de TNT y se añadieron 105 µL de tampón de inmunoprecipitación: (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 25 µM de MG-132, 1X cóctel inhibidor de proteasas Complete (Roche), 1X cóctel inhibidor de fosfatasa 2 y 3 (Sigma)). Los extractos fueron incubados 1h con 1 µg de anticuerpo anti-HA 3F10 (Roche) a 4 °C bajo rotación moderada. Posteriormente se añadieron 10 µL de bolas magnéticas de proteína G (Invitrogen) prelavadas con el tampón de inmunoprecipitación, sin inhibidores, suplementado con BSA al 0,1% durante 1h a 4°C. Por último, las muestras fueron lavadas 6 veces con tampón de inmunoprecipitación, resuspendidas en 40 µL de LB 2X y calentadas 5 min a 95°C. 10 y 30 µL de las muestras fueron cargadas y analizadas por Western blot para detectar la inmunoprecipitación y la co-inmunoprecipitación respectivamente, tal y como indican Nohales y sus colaboradores (Nohales et al. 2019). En cuanto a los inputs, de estos se cargaron también 10 µL.

### **3.8. Agroinfiltración de *Nicotiana benthamiana* y ensayo de transactivación.**

Para los experimentos de expresión transitoria en *N. benthamiana*, se crecieron cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* de la cepa GV3101 transformados con las

construcciones pertinentes, en medio líquido, con los antibióticos de selección apropiados y a 28°C toda una noche. Las construcciones empleadas fueron: pEG201-PIF7, pEG201-GFP, pEG202-GI, el supresor del silenciamiento génico p19 y pGLUCpPIL1, esta última utilizada únicamente en los ensayos de transactivación. A continuación, se midió la OD<sub>600</sub> de cada cultivo y se extrajo el volumen necesario para tener una OD<sub>600</sub> final de 0,5 en el volumen requerido para infiltrar todas las plantas con cada construcción. Los volúmenes extraídos se centrifugaron 10 min a 8000 rpm, seguidamente los precipitados se resuspendieron en los volúmenes requeridos con solución de infiltración (10 mM de MES-KOH pH 5,6, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y 150 µM de acetosiringona) y se incubaron 2h en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezclaron las soluciones con las construcciones requeridas en cada experimento y se infiltraron 3 hojas por planta de *N.benthamiana* de 4 semanas de edad a una OD<sub>600</sub> final de 0,1 para cada construcción, a excepción de p19 cuya OD<sub>600</sub> final fue de 0,05. Tres días después de la infiltración, se recolectaron muestras de cada hoja infiltrada y se procesaron de la forma adecuada para cada experimento.

En los ensayos de cuantificación proteica, las mezclas infiltradas fueron pEG201-GFP, pEG201-PIF7 y p19 por un lado y pEG201-GFP, pEG201-PIF7, pEG202-GI y p19 por otro, siendo las muestras rápidamente congeladas en N<sub>2</sub> líquido y almacenadas -80° hasta llevar a cabo la extracción proteica que se indica más adelante. Por otro lado, en los ensayos de transactivación, las mezclas de infiltración utilizadas fueron pGLUCpPIL1, pEG201-GFP y p19; pGLUCpPIL1, pEG201-PIF7 y p19; pGLUCpPIL1, pEG201-PIF7, pEG202-GI y p19. En este caso las muestras se extrajeron y procesaron usando el kit "Dual-Glo Luciferase Assay System" de Promega y el luminómetro GloMax®-Multi Detection System. Para la extracción, se trituraron con un molino de bolas (Restch 400 MM) tras haber sido congeladas en N<sub>2</sub> líquido y se les añadió 150 µL del tampón de lisis incluido en el kit. Posteriormente, se mezclaron por medio de vórtex y se centrifugaron 5 min a 13000 rpm. En una placa de luminiscencia de 96 pocillos Greiner MicroLon® se añadieron 5 µL del extracto y 40 µL de luciferina (Dual-Glo® Reagent), se incubó 10 minutos la placa en oscuridad y se midió luminiscencia. A continuación, se añadieron 40 µL de renilla (Dual-Glo® Stop & Glo® Reagent) a cada pocillo, se incubó nuevamente 10 min en oscuridad y se midió la luminiscencia. Los datos de luminiscencia obtenidos tras añadir luciferina fueron normalizados con los obtenidos para el control interno (luminiscencia emitida por renilla).

### **3.9. Extracción proteica y cuantificación por Western blot.**

Para extraer las proteínas de *N.benthamiana*, las muestras fueron trituradas con un molino de bolas (Restch 400 MM), posteriormente se les añadió un volumen igual al del tejido machacado del tampón ExB (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% Tritón X-100, 1X Complete (Roche), 1 mM DTT, 1 mM PMSF y 50 µM MG132) y se centrifugaron 2 veces a >13000 rpm a 4 °C. Los extractos se cuantificaron con el kit “DC Protein Assay” (BioRad) y por cada muestra se resuspendieron 50 ug de proteína total en LB. A continuación, se hirvieron a 95 °C 5 min y se cargaron en geles desnaturalizantes SDS-PAGE de acrilamida al 12,5%, para finalmente ser transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Amersham). Una vez transferidas, fueron detectadas con dos anticuerpos dependiendo de la etiqueta que llevasen conjugada: 3F10 anti HA-HRP (1:2000, Roche) o M2 anti FLAG-HRP (1:2000, Sigma) disueltos en una solución al 2% de suero de leche. Por último, la quimioluminiscencia generada por la peroxidasa HRP junto los substratos que se le adicionaron (Supersignal West Pico, Dura o Atto, Thermofisher) fue detectada con el equipo Amersham ImageQuant 800, mientras que la cuantificación de las proteínas detectadas en se realizó mediante el software de imagen ImageJ (Schneider et al., 2012).

Las muestras generadas en la co-inmunoprecipitación fueron analizadas por Western blot de la misma forma que las de los experimentos de expresión transitoria descritos en el párrafo anterior.

### **3.10. Análisis estadístico.**

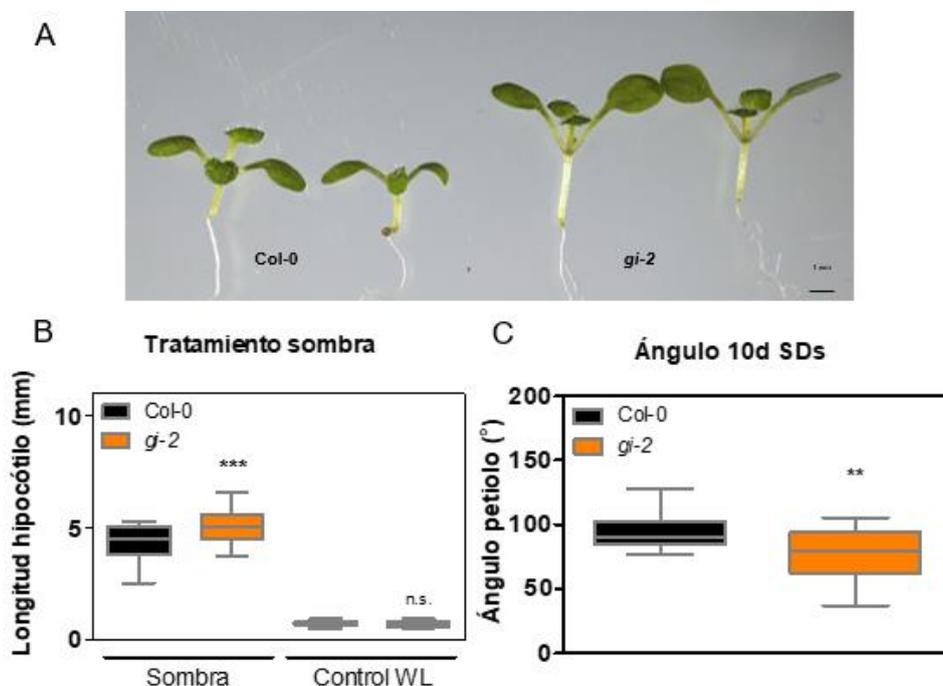
Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el programa informático GraphPad Prism 5. El cálculo de la significancia entre los resultados de todos ellos se realizó mediante un análisis ANOVA si se daban más de dos variables, o t-test si eran dos.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **4.1. GI regula negativamente la respuesta de evasión a sombra.**

Con el fin de establecer la posible implicación de GI en la respuesta de evasión a sombra, lo primero que se hizo fue comparar fenotípicamente a un mutante de este gen (*gi-2*) con el ecotipo silvestre Col-0 en condiciones de día corto (SD: 8 h luz/16 h oscuridad) (Figura 5A y C). El mutante presentó un fenotipo claramente diferente al silvestre, que destacó por una elongación del hipocótilo (Figura 5A) y una elevación de los petiolos, esta última calculada a partir del ángulo que estos forman entre sí en estas

condiciones (Figura 5C). Por otro lado, al aplicar un tratamiento de sombra (Figura 5B), tanto en las plántulas silvestres como en las mutantes se produjo una elongación de los hipocótilos muy superior a la producida en los controles tratados con luz blanca. Sin embargo, la elongación producida en *gi-2* fue significativamente mayor que en Col-0.

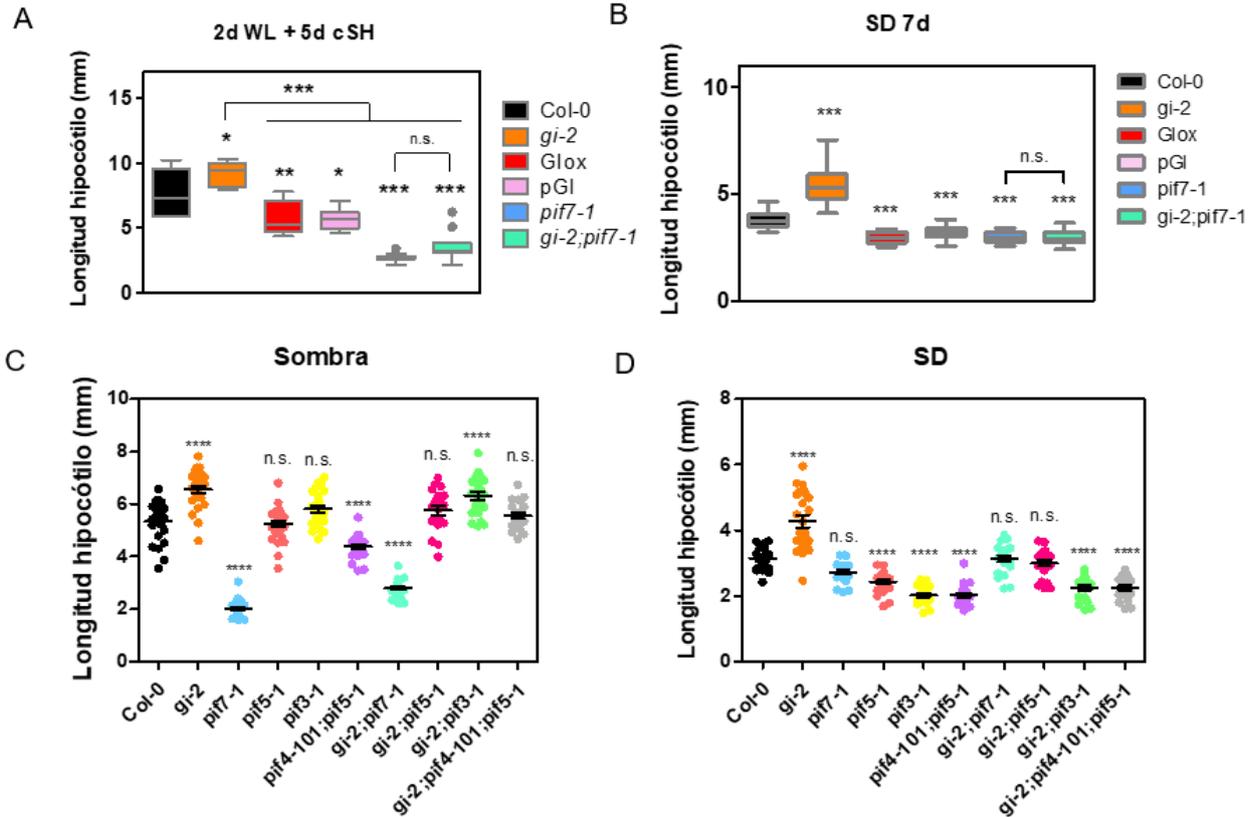


**Figura 5. GI regula negativamente la respuesta a sombra.** (A) Fenotipo de Col-0 y *gi-2* crecidas *in vitro* 10 días en día corto (8h luz/16h oscuridad) a 22°C. (B) Longitud de hipocótilos de Col-0 y *gi-2* tras un tratamiento de sombra (4 días en luz blanca continua y 7 días en sombra continua (R 13  $\mu$ E, B 1.23  $\mu$ E, FR 20.2  $\mu$ E; R:FR 0.7) o 11 días en luz blanca continua (WL, 30-50  $\mu$ E; R:FR 1.2) a 22°C. (C) Ángulo entre los petiolos de Col-0 y *gi-2* crecidas *in vitro* 10 días en día corto (8h luz/16h oscuridad) a 22°C. Los asteriscos indican la presencia de diferencias significativas (analizadas con un t-test, \*\**p*-valor<0,01, \*\*\**p*-valor<0,001) entre los dos genotipos, mientras que n.s. indica la ausencia de estas.

Tal y como se ha descrito anteriormente, ambos fenotipos son característicos de la SAR (Casal, 2012), lo que indica que, en ausencia de GI, las plántulas ejercen la respuesta de evasión a sombra a pesar de que no se den las condiciones que la requieran. Además, en presencia de sombra, la SAR es mayor en ausencia de GI que estando presente, sugiriendo así que GI es un regulador negativo esta. GI se sumaría por tanto a otros componentes del reloj que también la regulan negativamente, como por ejemplo, PRR5, que funciona como un inhibidor de la SAR ejerciendo su función por la tarde (Takase et al. 2013), o ELF3, que inhibe la SAR por la noche (Jiang et al. 2019). Además, GI se ha descrito como un regulador de las redes de respuesta a la luz (Nohales et al. 2019) y también se ha estudiado su implicación en la inducción de la floración temprana en respuesta al bajo ratio R/FR característico de la sombra (Sessa et al. 2018), evidencias que también apoyan la implicación de GI en la represión de la SAR.

#### 4.2. GI y PIF7 regulan conjuntamente la respuesta de evasión a sombra.

Continuando con los análisis fenotípicos, se midieron los hipocótilos de una línea sobreexpresante de GI (GIOx) y otra expresante de GI bajo su promotor endógeno, ambas generadas en el fondo *gi-2*. Al igual que en el experimento anterior, fueron crecidas en condiciones de día corto y bajo un tratamiento de sombra (Figura 6A y B). En este caso, la elongación de los hipocótilos fue menor que en la línea Col-0 en ambos tratamientos, de forma similar a como ocurre con el mutante *pif7-1*, cuya implicación positiva en la SAR está ampliamente demostrada (Li et al. 2012), sugiriendo de nuevo que GI regula negativamente esta respuesta. Por otro lado, se analizó también la elongación de los hipocótilos en el doble mutante *gi-2;pif7-1* bajo ambas condiciones, e interesantemente la respuesta fue la misma que en el mutante *pif7-1* (Figura 6A y B), es decir, la elongación de los hipocótilos en ambos mutantes no presentó diferencias significativas entre ellos ni en día corto ni en condiciones de sombra, lo que parece indicar que ambas proteínas intervienen en la misma vía responsable de controlar este fenómeno. Además, de estos datos se deduce que *PIF7* es epistático a *GI*, por lo que este último se encontraría aguas arriba en la vía de la regulación de la SAR, sugiriendo que GI modula negativamente la respuesta a sombra a través de su relación aguas abajo con el factor de transcripción PIF7. Esta regulación podría darse tanto a nivel transcripcional como post-traducciona, ya que se ha descrito que GI regula la señalización por luz a través del control de la transcripción, degradación y accesibilidad a la cromatina de los PIFs (Nohales et al. 2019).



**Figura 6. Implicación de GI y los PIFs en la respuesta a sombra.** (A) y (B) Longitud de los hipocótilos de las líneas Col-0, *gi-2*, *pif7-1*, *Glox*, *pGI* y *gi-2;pif7-1*, (A) tras 2 días de luz blanca (WL: 30-50  $\mu$ E; R:FR 1.2) y 5 de sombra (c SH:R 13  $\mu$ E, B 1.23  $\mu$ E, FR 20.2  $\mu$ E; R:FR 0.7) (B) o 7 días en día corto (8h luz/16h oscuridad a 22°C). (C) y (D) Longitud de los hipocótilos de las líneas Col-0, *gi-2*, *pif7-1*, *pif5-1*, *pif3-1*, *pif4-101;pif5-1*, *gi-2;pif7-1*, *gi-2;pif5-1*, *gi-2;pif3-1* y *gi-2;pif4-101;pif5-1* (C) tras 2 días de luz blanca (30-50  $\mu$ E; R:FR 1.2) y 5 de sombra (R 13  $\mu$ E, B 1.23  $\mu$ E, FR 20.2  $\mu$ E; R:FR 0.7) o (D) 7 días en día corto (8h luz/16h oscuridad) a 22°C. Los asteriscos indican la presencia de diferencias significativas respecto a Col-0 (salvo en los casos indicados) mientras que n.s. indica la ausencia de estas (analizadas mediante una ANOVA y un test de comparación múltiple de Tukey; \**p*-valor<0,05, \*\**p*-valor<0,01, \*\*\**p*-valor<0,001), \*\*\*\**p*-valor<0,0001).

Teniendo en cuenta que GI interacciona con otros PIFs como PIF1, PIF3, PIF4 o PIF5 regulando su acción (Nohales et al. 2019), y que además PIF4 y PIF5 están también implicados en la SAR (Mizuno et al. 2015, Li et al. 2012, Buti et al. 2020), se decidió estudiar si la regulación de la SAR mediada por GI es a través de PIF7 o si hay otros PIFs implicados. Se repitió por tanto el experimento de medición de hipocótilos en condiciones de día corto y sombra usando las líneas mutantes *pif7-1*, *pif5-1*, *pif3-1* y las dobles y triples mutantes *pif4-101;pif5-1*, *gi-2;pif7-1*, *gi-2;pif5-1*, *gi-2;pif3-1* y *gi-2;pif4-101;pif5* (Figura 6C y D). En este caso, en condiciones de sombra (Figura 6C), *pif7-1* fue el genotipo que presentó una menor elongación del hipocótilo, tal y como cabía esperar al ser el principal implicado en esta respuesta. El doble mutante *gi-2;pif7-1*

también presentó una menor elongación del hipocótilo que Col-0, al igual que en el experimento anterior. Sin embargo, aunque el doble mutante *pif4-101;pif5-1* también experimentó un menor crecimiento, al combinar las mutaciones en *PIF4* y *PIF5* con la mutación de *GI* en la línea *gi-2;pif4-101;pif5*, la longitud de los hipocótilos no varió respecto a la línea silvestre, indicando que ambas mutaciones se contrarrestan entre sí y que por tanto no participan en la misma vía de regulación de la SAR. Al contrario, en condiciones de día corto (Figura 6D), vemos como las muestras *pif4-101;pif5-1* y *gi-2;pif4-101;pif5* presentan una menor elongación de los hipocótilos que las muestras silvestres, mientras que *pif7-1* y *gi-2;pif7-1* no. En cuanto a los mutantes *pif3-1* y *pif5-1*, así como *gi-2;pif3-1* y *gi-2;pif5-1*, en condiciones de sombra no presentan diferencias significativas con respecto a Col-0, o la elongación de los hipocótilos es mayor que en este, mientras que en día corto presentan el mismo comportamiento que los mutantes de *PIF4* y *PIF5*, a excepción de *gi-2;pif5-1* que no presenta diferencias significativas respecto a Col-0. De esta forma, se deduce que la regulación de *GI* en respuesta a sombra es a través de *PIF7*, cuando la actuación de este último se hace más evidente (Fiorucci et al. 2020, Paulišić et al. 2021), mientras que en día corto la regulación del crecimiento la ejerce a través de otros PIFs más relevantes en este proceso como *PIF3*, *PIF4* y *PIF5* (Leivar & Monte, 2014).

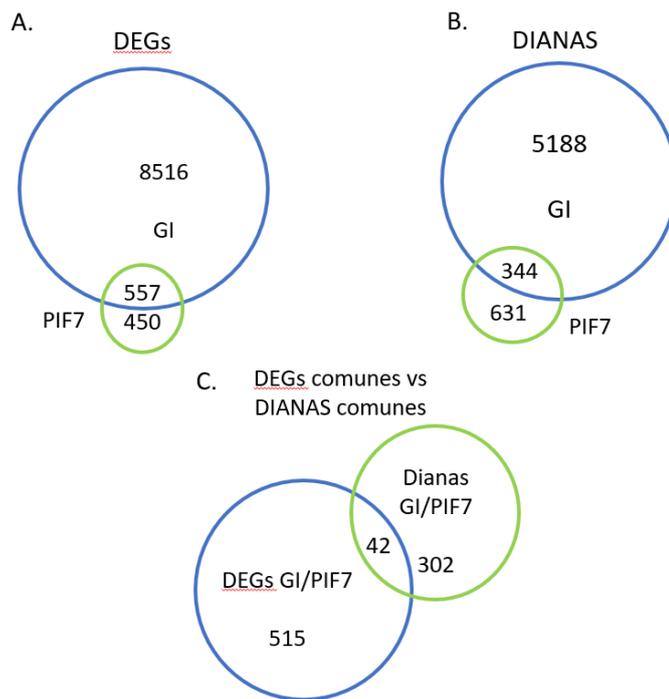
Existe cierta discordancia con los datos de elongación de hipocótilos en día corto de los mutantes *pif7-1* y *gi-2;pif7-1*, pues en la figura 6A presentan diferencias significativas respecto a Col-0, mientras que en la figura 6B no, a pesar de haber sido sometidos al mismo tratamiento. En cualquier caso, la bibliografía consultada trata siempre a *PIF7* como un factor de transcripción que actúa eminentemente en respuesta a sombra (Fiorucci et al. 2020, Paulišić et al. 2021, Mizuno et al. 2015, Li et al. 2012, Buti et al. 2020), siendo su efecto sobre el crecimiento en día corto casi despreciable en comparación con otros PIFs, provocando que en ocasiones se aprecie su efecto y en otras no, de manera que la diferencia entre ambas figuras podría explicarse por este fenómeno.

#### **4.3. *GI* y *PIF7* regulan la expresión de genes comunes participantes en la respuesta de evasión a sombra.**

La SAR se caracteriza por la expresión de una serie de genes causantes de los distintos fenotipos que se inducen en respuesta a sombra. Por ello, para confirmar que *GI* y *PIF7* regulan conjuntamente la SAR e investigar el mecanismo por el cual lo hacen, se estudió si ambas proteínas afectan a la expresión de genes comunes y en que procesos están implicados. Tras comparar los datos de RNASeq del mutante *gi-2* disponibles (datos no

publicados) y los mismos obtenidos de un mutante de *PIF7* publicados por Chung y colaboradores (Chung et al. 2020), se observó que existen 557 genes comunes que están diferencialmente expresados en ambos mutantes (Figura 7). La representación estadística de la ontología génica (*Gene Ontology*, GO) del proceso biológico en el que están implicados estos genes reveló que se trata de genes relacionados con el crecimiento, las hormonas, la luz, otros procesos relacionados con el desarrollo, estrés, transporte y otros (Tabla Suplementaria S1). Dentro de los genes englobados en la categoría luz, aquellos que presentaron un enriquecimiento mayor son los implicados en la evasión de la sombra, estando el resto también relacionados con esta, pues son: fototropismo, respuesta a la luz roja lejana o respuesta a la luz azul, que tal y como se ha comentado anteriormente son consecuencia o desencadenantes de la SAR. También aparecieron genes relacionados con la señalización, el transporte o la homeostasis de auxinas, siendo estas unas hormonas imprescindibles para la SAR, pues permiten fenómenos como la elongación de hipocótilos o la hiponastia de los petiolos (Casal, 2012; Mizuno et al. 2015).

Por otro lado, *PIF7* es capaz de unirse al ADN para regular la transcripción génica (Li et al. 2012), mientras que *GI* no es capaz de unirse directamente pero está en el entorno de la cromatina, probablemente asociado a esta a través de otras proteínas (Nohales et al. 2019). De esta forma, si ambos participan en la SAR podrían ser capaces unirse a la cromatina directa o indirectamente en regiones reguladoras de genes implicados en esta. Por ello, se compararon datos de ChIPSeq obtenidos para *GI* (Nohales et al., 2019) con los publicados por Chung y sus colaboradores a partir de líneas expresantes de *PIF7-MYC* de forma nativa (Chung et al. 2020), dándose un solapamiento de 344 (Figura 7) regiones de la cromatina a las que se encuentran asociadas *GI* y *PIF7* (dianas comunes). Al realizar el mismo análisis de GO que en el RNAseq usando los genes más cercanos a estas regiones, se obtuvieron categorías similares a las obtenidas en el análisis anterior, siendo la evasión a sombra la segunda categoría con un enriquecimiento mayor, después de la lipidación proteica (Tabla Suplementaria S2). Por último, se compararon los datos de ambos análisis realizando un diagrama de Venn con los 577 genes comunes obtenidos del RNASeq y los 344 del ChIPSeq, quedando patente que *GI* y *PIF7* regulan conjuntamente y de manera directa genes comunes de SAR, ya que, de los 42 genes resultantes de la comparación, los GOs más enriquecidos fueron los relacionados con auxinas y la respuesta a la luz del espectro del rojo lejano (Figura 7) (Tabla 1).



**Figura 7. Diagramas de Venn.** (A) Genes diferencialmente expresados (DEGs) en líneas mutantes de GI y PIF7 obtenidos por RNASeq. (B) Genes próximos a regiones (Dianas) a las que se asocian GI y PIF7 obtenidos por ChIPSeq. (C) Solapamiento de los DEGs y Dianas comunes entre PIF7 y GI obtenidos de los dos análisis anteriores.

GO de proceso biológico	Enriquecimiento	P-valor	FDR
Eflujo de auxinas	>100	1,97E-06	2,34E-03
Transporte de auxinas	33,17	1,15E-04	3,27E-02
Respuesta a hormonas	6,18	3,00E-06	2,97E-03
Respuesta a la luz roja lejana	69,35	4,62E-07	6,87E-04
Crecimiento celular	9,88	1,49E-04	4,02E-02
Respuesta a lípidos	6,84	6,25E-05	1,96E-02
Detección de estímulos	35,76	9,32E-05	2,77E-02

**Tabla 1. Categorías GO de proceso biológico.** Enriquecimiento en categorías GO de proceso biológico de los genes diferencialmente expresados en mutantes de PIF7 y GI que además poseen regiones dianas para estas dos proteínas próximas a ellos. Asociados al enriquecimiento (sobrerepresentación de categorías de ontología génica (GO) usando como parámetros: "Text Type: Fisher's Exact" y "Correction: Calculate Fisher Discovery Rate" en la plataforma PANTHER) de cada categoría, se encuentran en las columnas de la derecha los datos del p-valor y el FDR (False Discovery Rate), que indican la fiabilidad de los datos obtenidos.

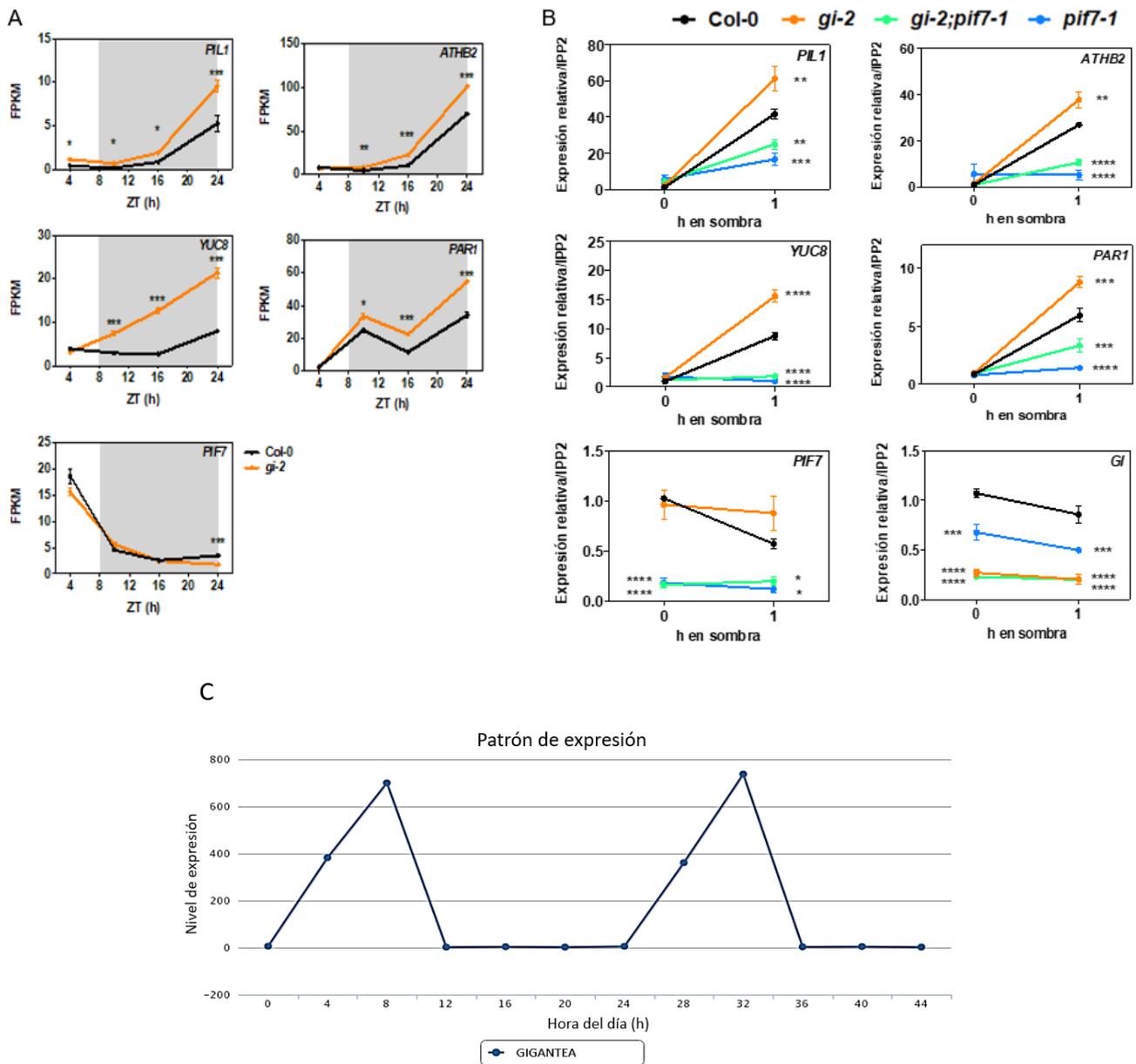
Así, las categorías de ontología génica presentes en la tabla 1 engloban a los genes diferencialmente expresados en mutantes de *GI* y *PIF7* que además poseen regiones próximas a las que se unen ambas proteínas, lo que sumado a los datos obtenidos en los análisis de RNASeq y ChIPSeq individuales entre ambas proteínas (Tablas Suplementarias S1 y S2), indican que *GI* y *PIF7* participan en la SAR mediante la modulación de genes comunes y que además este proceso es quizás el que tiene un mayor peso entre todos en los que participan conjuntamente.

A continuación, a partir de los datos de ChIPSeq, con ayuda de la bibliografía consultada y con el objetivo de estudiar cómo modulan *GI* y *PIF7* conjuntamente la expresión de genes implicados en la SAR, se seleccionaron una serie de genes que son dianas comunes de *GI* y *PIF7* (solapamiento de ChIPSeq), que además han sido descritos como genes clásicos de respuesta a sombra activados por *PIF7* (Li et al. 2012). Estos fueron: *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 1 (PIL1)*, *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN PROTEIN 2 (ATHB2)*, *PHY RAPIDLY REGULATED 1 (PAR1)* y *YUCCA 8 (YUC8)*. Una vez seleccionados, se usaron los datos de RNAseq disponibles para estudiar cómo se ve afectada su expresión en el mutante *gi-2* respecto a Col-0 en condiciones de día corto. Como se puede observar en la figura 8A, la expresión de todos ellos se indujo en el mutante *gi-2*, especialmente durante la noche, lo que sugiere que *GI* funciona reprimiendo su expresión principalmente en este periodo de tiempo debido a que tiene su máximo de expresión por la tarde-noche, siendo principalmente entre ZT8 y ZT24 cuando ejercería su función (Figura 8A) (Greenham & McClung, 2015). El mecanismo por el que *GI* reprime estos genes sería independiente de la transcripción de *PIF7*, pues como se puede apreciar, la expresión de *PIF7* no varía en el mutante *gi-2* respecto al silvestre, a excepción de a ZT24 cuando los niveles en Col-0 son significativamente superiores. A pesar de esto último, todo parece indicar que en día corto *GI* regula negativamente la transcripción de genes diana de *PIF7* implicados en la SAR sin reprimir la expresión de *PIF7*, por lo que la menor activación de estos genes es probable que ocurra por una represión a nivel de proteína.

Teniendo en cuenta estos resultados y con el objetivo de saber cómo se produce esta regulación en respuesta a sombra, se analizó también la expresión de los genes seleccionados tras un tratamiento de sombra en los mutantes *gi-2*, *pif7-1* y *gi-2;pif7-1* (Figura 8B), comparándose, al igual que en el caso anterior, con la expresión de los mismos en Col-0. Para ello, una vez que las plántulas fueron crecidas 5 días en un fotoperiodo de 10h luz/14h oscuridad, al sexto día, transcurridas 8 horas (ZT8) se recolectaron muestras de todos los genotipos y seguidamente se aplicó un tratamiento de sombra, tras el que se recolectó muestra transcurrida 1 hora (ZT9). En este caso, se

empleó un fotoperiodo de día corto distinto al habitual (10h luz/14h oscuridad en lugar 8h luz/16h oscuridad), ya que se ha demostrado que los tratamientos de sombra son inefectivos por la mañana, por lo que para realizar este experimento hubo que alargar la fase diurna repitiendo las condiciones empleadas por Sellaro y colaboradores (Sellaro et al. 2012). De esta forma, tal como refleja la figura 8B y al contrario que de lo que ocurre en condiciones control con luz blanca (Figura suplementaria S1), en respuesta a sombra los genes estudiados se inducen y lo hacen de manera significativamente mayor en el mutante *gi-2* respecto a Col-0, al contrario que en el caso del mutante *pif7-1*, ya que, como se ha mencionado anteriormente, estos genes se expresan en respuesta a sombra mayoritariamente gracias a su activación vía PIF7. Interesantemente, en el doble mutante *gi-2;pif7-1* la expresión en respuesta a sombra sigue siendo significativamente menor que en el silvestre, lo que concuerda con los datos fenotípicos de crecimiento de hipocotilo presentados anteriormente. Así, en ambos casos se puede concluir que PIF7 es epistático a GI y que por lo tanto GI funciona aguas arriba de PIF7. Además, al igual que en día corto, se observa que en respuesta a sombra GI afecta la regulación de las dianas de PIF7 sin alterar la transcripción de este último, pues los niveles de expresión de *PIF7* en *gi-2* no se alteran tampoco en este caso y por tanto GI debe actuar sobre PIF7 postraduccionalmente.

Por último, atendiendo al patrón de expresión que tiene *GI* en condiciones de día corto (Figura 8C), cuyo máximo de expresión se da a ZT8, todo parece indicar que la represión de la expresión de los genes implicados en la SAR ocurriría por la tarde-noche en el fotoperiodo 10h luz/14h oscuridad, tiempo en el que se midió la expresión en este caso. Esto concordaría con los datos presentes en el laboratorio obtenidos previamente a la realización de este proyecto, que es extrajeron mediante la medición de la longitud del hipocótilo en mutantes *gi-2* sometidos a tratamientos de sombra a distintas horas del día, de forma parecida a como lo hicieron Sellaro y colaboradores (Sellaro et al. 2012). Dichos datos muestran que los hipocótilos del genotipo *gi-2* elongan más respecto a Col-0 cuando la sombra se aplica entre ZT8 y ZT10 (datos no publicados). Así, dado que la SAR ocurre por la tarde (Sellaro et al. 2012), podría deducirse que GI evita una respuesta de evasión a sombra exacerbada.

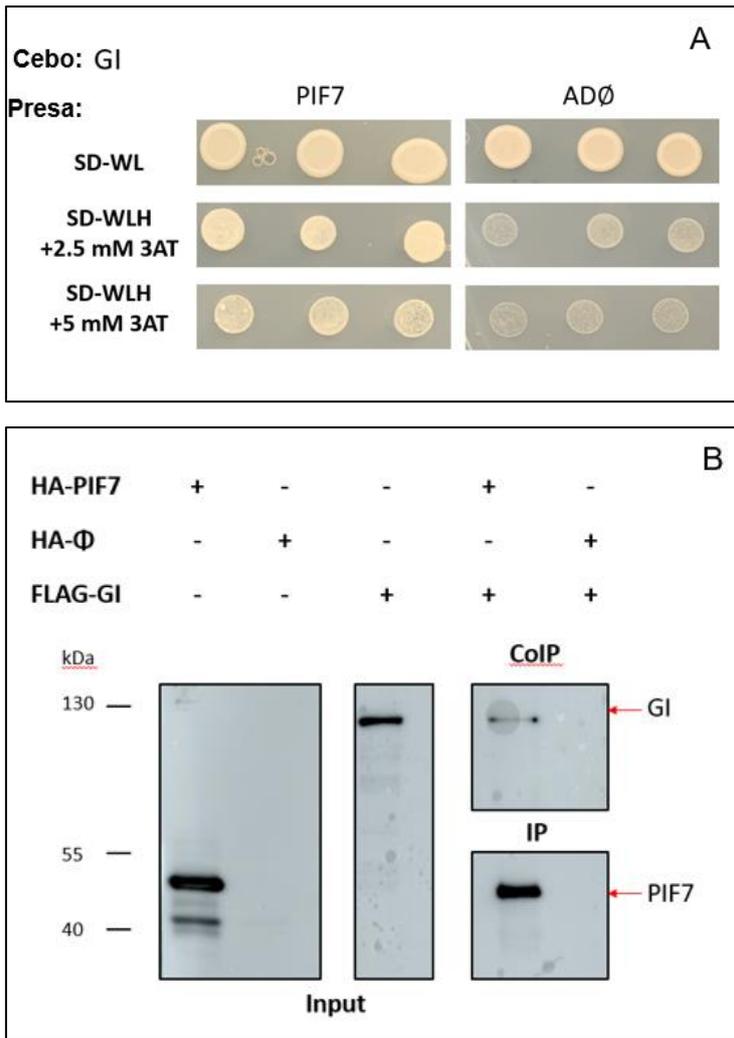


**Figura 8. Expresión de genes de respuesta a sombra y GI en día corto y/o respuesta a sombra.** (A) Expresión de los genes *PIL1*, *ATHB2*, *PAR1*, *YUC8* y *PIF7* en plántulas crecidas en condiciones de día corto (8h luz/16h oscuridad) a 22°C en el mutante *gi-2* respecto a *Col-0*. Muestras tomadas al sexto día a 4 tiempos distintos a lo largo del día: ZT4, 10, 16 y 24. (B) Expresión relativa de los genes *PIL1*, *ATHB2*, *PAR1*, *YUC8*, *GI* y *PIF7* respecto al gen *IPP2* en *Col-0* y los mutantes *gi-2*, *pif7-1* y *gi-2;pif7-1* tras un tratamiento de sombra. Las muestras se cosecharon a ZT8, antes de realizar el tratamiento de sombra, y a ZT9, tras el inicio del tratamiento de sombra (R 13  $\mu$ E, B 1.23  $\mu$ E, FR 20.2  $\mu$ E; R:FR 0.7). Los asteriscos en ambas figuras indican la presencia de diferencias significativas entre los mutantes y *Col-0* (analizadas mediante una ANOVA y un test de comparación múltiple de Tukey; \*p-valor<0,05, \*\*p-valor<0,01, \*\*\*p-valor<0,001, \*\*\*\*p-valor<0,0001). (C) Patrón de expresión de *GI* en condiciones de día corto; datos extraídos de la base de datos *DIURNAL* ([http://diurnal.mocklerlab.org/diurnal\\_data\\_finders](http://diurnal.mocklerlab.org/diurnal_data_finders)).

#### 4.4. GI y PIF7 interactúan entre sí.

Dado que GI no regula transcripcionalmente a *PIF7*, que interactúa a nivel de proteína con otros PIFs como PIF4 o PIF5 regulando su actuación (Nohales et al. 2019), e incluso se ha visto que es capaz de interactuar con el propio PIF7, tal y como muestra el ensayo masivo de doble híbrido presentado en la introducción, se quiso estudiar si la regulación mediada por GI y PIF7 de la SAR podría ocurrir por medio de la interacción entre ambas. Para ello, primero se realizó un ensayo de complementación de doble híbrido (Y2H), co-transformando levaduras con los vectores pGADT7-PIF7 y pGBKT7-GI, que llevaban fusionados respectivamente los dominios de activación y de unión de un factor de transcripción que se une al gen *HIS3*, responsable de la síntesis del aminoácido histidina en las levaduras utilizadas. Estas se cultivaron en un medio auxótrofo para histidina y un inhibidor de la síntesis de este aminoácido (3-AT) a diferentes concentraciones. Como resultado (Figura 9A), se observó que PIF7 y GI eran capaces de interactuar, pues las levaduras transformadas con ambas construcciones proliferaron aún en concentraciones de 5 mM 3-AT. Sin embargo, las levaduras con pGBKT7-GI transformadas también con el vector pGADT7- $\theta$  (control vacío) no proliferaron a estas concentraciones, creciendo también en menor medida a concentraciones de 2,5 mM 3-AT. De esta manera, se corroboraron los resultados obtenidos en la red de interacción de GI con todos los factores de transcripción de *A.thaliana* ya comentada.

Por otro lado, para confirmar esta interacción mediante un método adicional, se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación *in vitro*. Para ello, se llevó a cabo la transcripción y traducción *in vitro* (TNT®) de las proteínas etiquetadas HA-PIF7 y FLAG-GI, usando respectivamente los vectores pTNT-HA-PIF7 y pTNT-FLAG-GI. En la inmunoprecipitación se usó el anticuerpo monoclonal anti-HA de rata para precipitar HA-PIF7, así como la etiqueta HA sin proteína conjugada (HA- $\theta$ ) en el caso del control negativo, sintetizada a partir del vector pTNT-HA- $\theta$ . De esta forma, y tal y como muestra la figura 9B, al precipitar HA-PIF7, FLAG-GI co-inmunoprecipita también, a diferencia del control negativo en el que esta última no lo hace, indicando por tanto que GI y PIF7 son capaces de interactuar específicamente *in vitro*.



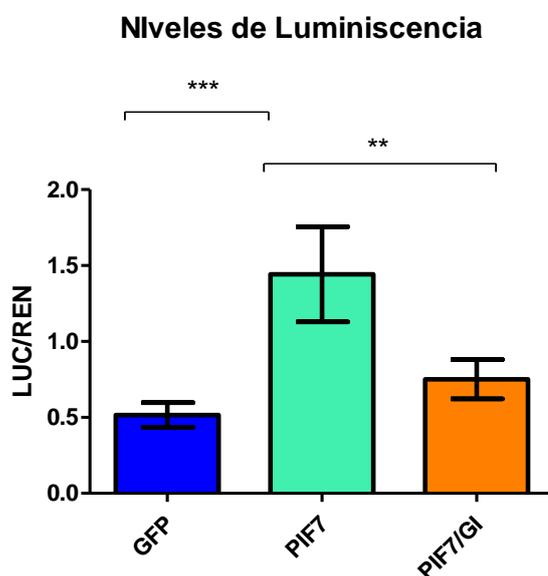
**Figura 9. Interacción entre GI y PIF7.** (A) Ensayo de complementación de doble híbrido (Y2H). Levaduras transformadas con pGBKT7-GI y pGADT7-PIF7 o pGBKT7-GI y pGADT7-Ø crecidas en medio SD-WL como control positivo, o SD-WLH y distintas concentraciones de 3-AT (2,5 y 5 mM). (B) Ensayo de co-inmunoprecipitación mediante la expresión por el sistema TNT de los vectores pTNT-FLAG-GI, pTNT-HA-PIF7 y pTNT-HA-Ø y la posterior utilización del anticuerpo HA de rata para precipitar HA-PIF7.

Así, todo parece indicar que GI y PIF7 regulan la SAR a través de su interacción a nivel de proteína. Esta interacción entre componentes del reloj circadiano y factores de transcripción tipo PIF ha sido ya descrita por autores como Zhang y sus colaboradores (Zhang et al. 2019). En su artículo, describen cómo PIF7, junto a otros PIFs (PIF3 y PIF4), co-inmunoprecipitan con componentes del reloj central como TOC1 y los PRRs 5,7 y 9. Además, por medio de complementación fluorescente bimolecular (BiFC) comprobaron que estas interacciones se daban en el núcleo celular. Por otro lado, GI es una proteína multidominio que es capaz de interactuar con distintas proteínas gracias a esto. Por ejemplo, se ha demostrado que su interacción con FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT FBOX 1 (FKF1) dependiente de la luz azul se produce a través de la región amino-terminal de GI y el dominio LOV (Light, Oxygen, or Voltage) de la primera (Mishra & Panigrahi, 2015). También se ha descrito cómo GI interactúa con algunos PIFs (PIF1, PIF3, PIF4 y PIF5), e incluso se ha caracterizado cómo esta interacción modula su actividad. Por ejemplo, en el caso de PIF5, la interacción con GI promueve

su degradación (Nohales et al. 2019). Sin embargo, la interacción de GI y PIF7 no ha sido estudiada previamente (Balcerowicz 2020), por lo que no se sabe qué dominios de cada proteína participan, dónde tiene lugar o cómo les afecta.

#### 4.5. GI afecta la actividad de PIF7.

Uno de los mecanismos por los que se ha descrito que GI afecta a los PIFs es a través de su interacción con estos, evitando que activen la transcripción de sus genes diana (Nohales et al. 2019). Por ello, visto que GI y PIF7 son capaces de interactuar entre sí y dado que los datos de expresión de los genes responsables de la SAR activados por PIF7 se ven afectados en el mutante *gi-2* respecto a Col-0, se estudió el efecto de GI sobre la actividad activadora de la transcripción de PIF7. Para ello, se realizaron ensayos de expresión transitoria en *N.benthamiana* del gen de la luciferasa, clonado en una construcción en la que su expresión estaba dirigida por la región promotora del gen *PIL1* (pGLUCpPIL1). Esta construcción se coinfiltró con las construcciones pEG201-GFP, pEG201-PIF7, o la combinación pEG202-GI y pEG201-PIF7 y, tres días después de la infiltración, se midió la luminiscencia emitida por la luciferasa expresada al añadir luciferina como sustrato (Figura 10).

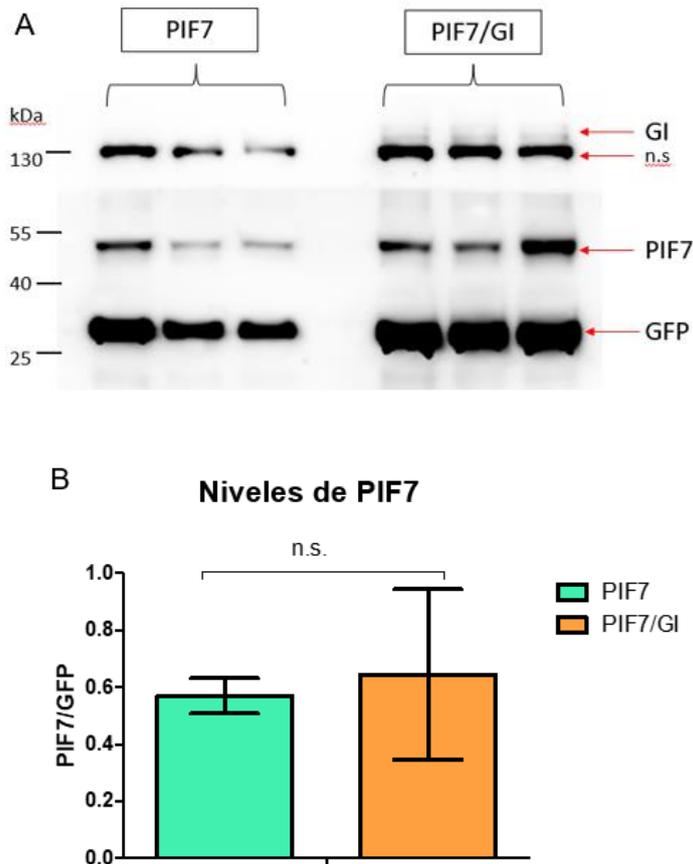


**Figura 10. GI inhibe la actividad de PIF7.** Luminiscencia emitida por plantas de *N.benthamiana* infiltradas con la construcción pGLUCpPIL1 en presencia de luciferina y normalizada con la emitida por la renila en plantas infiltradas también con pEG201-GFP, pEG201-PIF7, o la combinación pEG202-GI y pEG201-PIF7. Los asteriscos indican la presencia de diferencias significativas entre las distintas muestras

La figura 10 muestra cómo la luminiscencia de las muestras infiltradas con PIF7 es significativamente superior a la del control infiltrado con GFP, ya que PIF7 se une al promotor de *PIL1* y activa la expresión de la luciferasa, mientras que GFP es inactiva. En presencia de GI, la luminiscencia es significativamente menor a pesar de que se incluyó la misma concentración de PIF7 en la mezcla de infiltración. Dado que GI no es capaz de unirse directamente al DNA (Nohales et al. 2019, Baek et al. 2020), este resultado sugiere que GI afectaría negativamente a la inducción de *PIL1* mediada por PIF7 a través de su unión a esta última.

#### **4.6. GI no afecta a la estabilidad de PIF7.**

Dado que GI reprime la acción de PIF7 sobre la activación de *PIL1*, cabría la posibilidad de que GI promoviera la degradación de PIF7 de manera que no fuese capaz de unirse a sus dianas y no se indujera la expresión de los genes responsables de la SAR. Por ello, se hizo un ensayo de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* infiltrando con HA-PIF7 (pEG201-PIF7) por un lado y HA-PIF7 y FLAG-GI (pEG202-GI) por otro, midiéndose posteriormente los niveles de HA-PIF7 en ambas muestras tras realizar un Western blot. Tal y como se ve reflejado en la figura 11B, no existen diferencias significativas en cuanto a los niveles de PIF7 en las muestras infiltradas con GI respecto a las que no lo fueron. Ciertamente es que el error en las muestras infiltradas con GI es muy elevado y que esto ha podido influir en la estadística, sin embargo, los datos crudos obtenidos de este ensayo (Figura Suplementaria S2) tampoco reflejan ninguna tendencia que indique la disminución de los niveles de PIF7 en presencia de GI. Además, múltiples estudios afirman que PIF7 es más estable que el resto de PIFs (Nohales & Kay, 2016, Li et al. 2012), por lo que no es un resultado sorprendente que GI no induzca su degradación, contrariamente a lo que ocurre con otros PIFs como PIF5 (Nohales et al. 2019).



**Figura 11. GI no afecta a la estabilidad de PIF7.** (A) Western blot obtenido tras la infiltración con las construcciones pEG201-PIF7 o pEG201-PIF7 y pEG202-GI. (B) Niveles de PIF7 normalizados con el control interno GFP en muestras de *N.benthamiana* obtenidos a partir del Western blot anterior. n.s. indica que no existen diferencias significativas entre ambas muestras (analizado mediante un t-test).

Generalmente la degradación de los PIFs es dependiente de su fosforilación, tanto en presencia de luz, cuando interactúan con la forma Pfr de PHYB (Li et al. 2012), como en los casos en los que se ha estudiado su interacción con GI (Nohales et al. 2019). Sin embargo, en el caso de PIF7, cuando interactúa con el fitocromo PHYB en su forma activa, se fosforila pero no se degrada, acumulándose de una forma estable pero siendo incapaz de ejercer su actividad reguladora de la transcripción. Por el contrario, se ha descrito que en condiciones de sombra se induce la desfosforilación de PIF7, desencadenando la unión de PIF7 a sus dianas y por tanto la respuesta a sombra (Li et al. 2012). De esta forma, y dado que GI no induce su degradación, sería interesante saber el estado de fosforilación de PIF7 en presencia y ausencia de GI.

## 5. CONCLUSIÓN.

La regulación circadiana de la respuesta de evasión a sombra ya había sido descrita previamente a la realización de este proyecto (Sellaro et al. 2012), así como el papel de algunos componentes del reloj en la represión de la SAR a distintos momentos del día (Takase et al. 2013, Jiang et al. 2019). Por otro lado, también había sido estudiado el papel de GI como proteína intermediaria entre el reloj central y los mecanismos de respuesta a luz, además de su interacción con factores de transcripción tipo PIF (Nohales et al. 2019). Sin embargo, el papel de GI en la regulación de la SAR es la primera vez que se describe. Así, en esta investigación, se ha demostrado que mutantes de *GI* tienen un fenotipo de respuesta a sombra exacerbado y presentan además unos mayores niveles de expresión de genes implicados en la SAR, indicando que GI es un represor de esta. Además, se ha visto que esta represión ocurre a través de PIF7 y no por medio de otros PIFs, demostrándose la interacción entre ambas proteínas por complementación de doble híbrido e inmunoprecipitación *in vitro*. Por otro lado, se ha descrito que el mecanismo por el que GI reprime la expresión de genes inducidos por PIF7 en respuesta a sombra es independiente del control de la transcripción de este último, ya que los niveles de expresión de *PIF7* no se ven alterados en el mutante *gi-2*. De esta forma, gracias al ensayo de transactivación realizado en *N.benthamiana* infiltrada con luciferasa bajo el promotor de *PIL1* y dado que GI no es capaz de unirse por sí solo a la cromatina (Nohales et al. 2019, Baek et al. 2020), se demostró que la represión de la SAR ocurre a nivel de proteína, probablemente gracias al secuestro de PIF7 por parte de GI, evitando así la expresión de los genes implicados en la evasión a sombra. Además, todo parece indicar que GI no induce la degradación de PIF7, al ser este más estable que otros PIFs (Li et al. 2012). Sin embargo, este último resultado sería necesario confirmarlo en *Arabidopsis*, siendo también interesante saber cómo afecta GI a la fosforilación de PIF7. Para ello, durante la realización de este proyecto, se han desarrollado también las líneas transgénicas de *A.thaliana* *pPIF7:PIF7-HA;Glox-FLAG;gi-2* y *pPIF7:PIF7-HA;gi-2*, con las que se pretende estudiar estos fenómenos y realizar CHIP para establecer cómo varía la unión de PIF7 a la cromatina en presencia y ausencia de GI. Por último, también se ha obtenido la línea transgénica *pGI:GI-YPET-Flag;pPIF7:PIF7-ECFP-HA* con la que se pretende medir la colocalización de ambas proteínas y ver en qué tejidos se produce la interacción, con el objetivo de entender aún mejor el mecanismo por el que la SAR es controlada conjuntamente por GI y PIF7.

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

- Baek, D; Kim, WY; Cha, JY; Park, HJ; Shin, G; Park, J; Lim, CJ; ... ; Yun, DJ (2020). The GIGANTEA-ENHANCED EM LEVEL complex enhances drought tolerance via regulation of abscisic acid synthesis. *Plant Physiology*, (), <https://doi.org/10.1104/pp.20.00779>
- Balcerowicz, M. (2020). *PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS at the interface of light and temperature signalling*. 347–356. <https://doi.org/10.1111/ppl.13092>
- Bell-pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas, T. L., & Zoran, M. J. (2005). CIRCADIAN RHYTHMS FROM MULTIPLE OSCILLATORS : LESSONS FROM DIVERSE ORGANISMS. (June), 1–13. <https://doi.org/10.1038/nrd1633>
- Buti, S., & Pierik, R. (2020). *The bHLH network underlying plant shade-avoidance*. 312–324. <https://doi.org/10.1111/ppl.13074>
- Casal, J. J. (2012). *Shade Avoidance*. 1–19. <https://doi.org/10.1199/tab.0157>
- Chung, B. Y. W., Balcerowicz, M., Antonio, M. Di, Jaeger, K. E., Geng, F., Franaszek, K., ... Wigge, P. A. (2020). in *Arabidopsis*. *Nature Plants*, 6(May). <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0633-3>
- Farre, E. M. (2012). *The regulation of plant growth by the circadian clock*. 14, 401–410. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00548.x>
- Fiorucci, A., Galvão, V.C., Ince, Y.Ç., Boccaccini, A., Goyal, A., Allenbach Petrolati, L., Trevisan, M. and Fankhauser, C. (2020), PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 7 is important for early responses to elevated temperature in Arabidopsis seedlings. *New Phytol*, 226: 50-58. <https://doi.org/10.1111/nph.16316>
- Fujimori, T., Yamashino, T., Kato, T., & Mizuno, T. (2004). Circadian-Controlled Basic / Helix-Loop-Helix Factor , PIL6 , Implicated in Light-Signal Transduction in Arabidopsis thaliana. 45(8), 1078–1086.
- Gommers, C. M. M., Visser, E. J. W., Onge, K. R. S., Voeselek, L. A. C. J., & Pierik, R. (2013). Shade tolerance : when growing tall is not an option. *Trends in Plant Science*, 18(2), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.09.008>
- Greenham, K., & McClung, C. R. (2015). Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nature Publishing Group*, 16(10), 598–610. <https://doi.org/10.1038/nrg3976>
- Hellens, R.P., Allan, A.C., Friel, E.N., Bolitho, K., Grafton, K., Templeton, M.D., Karunairetnam, S., Gleave, A.P., Laing, W.A. (2005) *Transient expression vectors for functional genomics , quantification of promoter activity and RNA silencing in plants..* 4811. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-1-13>
- Huang, S. C., Zander, M., Nery, J. R., Ecker, J. R., Pedmale, U. V, Huang, S. C., ... Ljung, K. (2016). Cryptochromes Interact Directly with PIFs to Control Plant Growth in Limiting Blue Light Article Cryptochromes Interact Directly with PIFs to Control

Plant Growth in Limiting Blue Light. *Cell*, 1–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.018>

Jiang, Y., Xu, Y., Jiang, Y., Yang, C., Huang, S., Xie, F., ... Li, L. (n.d.). *The ELF3-PIF7 Interaction Mediates the Circadian Gating of the Shade Response in Arabidopsis*. 288–298. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.11.029>

Keuskamp, D. H., Keller, M. M., Ballaré, C. L., Pierik, R., Keuskamp, D. H., Keller, M. M., ... Pierik, R. (2012). *Blue light regulated shade avoidance*. 2324. <https://doi.org/10.4161/psb.19340>

Kim, Y., Yeom, M., Kim, H., Lim, J., Jung, H., & Hwang, D. (2012). GIGANTEA and EARLY FLOWERING 4 in Arabidopsis Exhibit Differential Phase-Specific Genetic Influences over a Diurnal Cycle. *Molecular Plant*, 5(3), 678–687. <https://doi.org/10.1093/mp/sss005>

Kim, J., Yi, H., Choi, G., Shin, B., Song, P., & Choi, G. (2003). Functional Characterization of Phytochrome Interacting Factor 3 in Phytochrome-Mediated Light Signal Transduction *The Plant Cell*. 15(October), 2399–2407. [https://doi.org/10.1105/tpc.014498.\(bHLH\)](https://doi.org/10.1105/tpc.014498.(bHLH))

Kolmos E, Herrero E, Bujdoso N, Millar AJ, Tóth R, Gyula P, Nagy F, Davis SJ. A reduced-function allele reveals that EARLY FLOWERING3 repressive action on the circadian clock is modulated by phytochrome signals in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2011 Sep;23(9):3230-46. <https://doi:10.1105/tpc.111.088195>

Leivar, P., & Monte, E. (2014). *PIFs: Systems Integrators in Plant Development*. 26(January), 56–78. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.120857>

Li, L., Ljung, K., Breton, G., Li, L., Ljung, K., Breton, G., ... Chory, J. (2012). *Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture*. 785–790. <https://doi.org/10.1101/gad.187849.112>

Lorrain, S., Allen, T., Duek, P. D., Whitelam, G. C., Fankhauser, C., & Building, G. (2008). Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. 1, 312–323. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03341.x>

Martinez-Garcia, J. F; Huq, E & Quail, PH (2000). Direct Targeting of Light Signals to a Promoter Element-Bound Transcription Factor. *Science*, 288(5467), 859–863. doi:10.1126/science.288.5467.859

Más, P. (2005). *Circadian clock signaling in Arabidopsis thaliana : from gene expression to physiology and development*. 500, 491–500. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041968pm>

Mishra, P., & Panigrahi, K. C. (2015). *GIGANTEA – an emerging story*. 6(January), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00008>

Mizuno, T., Oka, H., Yoshimura, F., Ishida, K., Yamashino, T., ... Yamashino, T. (n.d.). *Bioscience , Biotechnology , and Biochemistry Insight into the mechanism of end-*

- of-day far-red light ( EODFR ) -induced shade avoidance responses in Arabidopsis thaliana.* (July 2015). <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1065171>
- Nohales, M. A., & Kay, S. A. (2016). *Molecular mechanisms at the core of the plant circadian oscillator.* 23(12), 1061–1069. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3327>
- Nohales, M. A., Liu, W., Duffy, T., Maloof, J. N., Jacobsen, S. E., Kay, S. A., ... Maloof, J. N. (2019). *Multi-level Modulation of Light Signaling by GIGANTEA Regulates Both the Output and Pace of the Circadian Clock Article Multi-level Modulation of Light Signaling by GIGANTEA Regulates Both the Output and Pace of the Circadian Clock.* 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.030>
- Nusinow, D. A., Helfer, A., Hamilton, E. E., King, J. J., Imaizumi, T., Schultz, T. F., ... Lf, F. (2011). *clock to diurnal control of hypocotyl growth.* 3–9. <https://doi.org/10.1038/nature10182>
- Oakenfull, R. J., & Davis, S. J. (2017). *Shining a light on the Arabidopsis circadian clock.* (July), 2571–2585. <https://doi.org/10.1111/pce.13033>
- Paulišić S, Qin W, Arora Verasztó H, Then C, Alary B, Nogue F, Tsiantis M, Hothorn M, Martínez-García JF. Adjustment of the PIF7-HFR1 transcriptional module activity controls plant shade adaptation. EMBO J. 2021 Jan 4;40(1):e104273. <https://doi:10.15252/embj.2019104273>
- Pedmale, U. V.; Huang, S. C; Zander, M; Cole, B. J.; Hetzel, J; Ljung, K; ...; Chory, J. (2015). *Cryptochromes Interact Directly with PIFs to Control Plant Growth in Limiting Blue Light.* Cell, (), S0092867415016426–. <https://doi:10.1016/j.cell.2015.12.018>
- Pruneda-paz, J. L., Breton, G., Nagel, D. H., Kang, S. E., Bonaldi, K., Doherty, C. J., ... Kay, S. A. (2014). Resource A Genome-Scale Resource for the Functional Characterization of Arabidopsis Transcription Factors. *CellReports*, 8(2), 622–632. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.033>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). HISTORICAL commentary NIH Image to ImageJ : 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sellaro, R., & Paci, M. (2012). *Diurnal Dependence of Growth Responses to Shade in Arabidopsis : Role of Hormone , Clock , and Light Signaling.* (October 2011). <https://doi.org/10.1093/mp/ssr122>
- Sessa, G., Carabelli, M., Possenti, M., Morelli, G., & Ruberti, I. (2018). *Multiple Pathways in the Control of the Shade Avoidance Response.* (Figure 1). <https://doi.org/10.3390/plants7040102>
- Takase, M., Mizoguchi, T., Kozuka, T., Tsukaya, H., Takase, M., Mizoguchi, T., ... Tsukaya, H. (2013). *The unique function of the Arabidopsis circadian clock gene PRR5 in the regulation of shade The unique function of the Arabidopsis circadian clock gene PRR5 in the regulation of shade avoidance response.* 2324(November 2015). <https://doi.org/10.4161/psb.23534>
- Yang, C., & Li, L. (2017). *Hormonal Regulation in Shade Avoidance.* 8(September), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01527>

Zhang, Y., Pfeiffer, A., Tepperman, J. M., Dalton-roesler, J., & Leivar, P. (2020). *Central clock components modulate plant shade avoidance by directly repressing transcriptional activation activity of PIF proteins.* 117(6), 3261–3269. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918317117>

Zhang, R., Yang, C., Jiang, Y., & Li, L. (2019). *A PIF7-CONSTANS-Centered Molecular Regulatory Network Underlying Shade-Accelerated Flowering.* 2(December), 1587–1597. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.09.007>

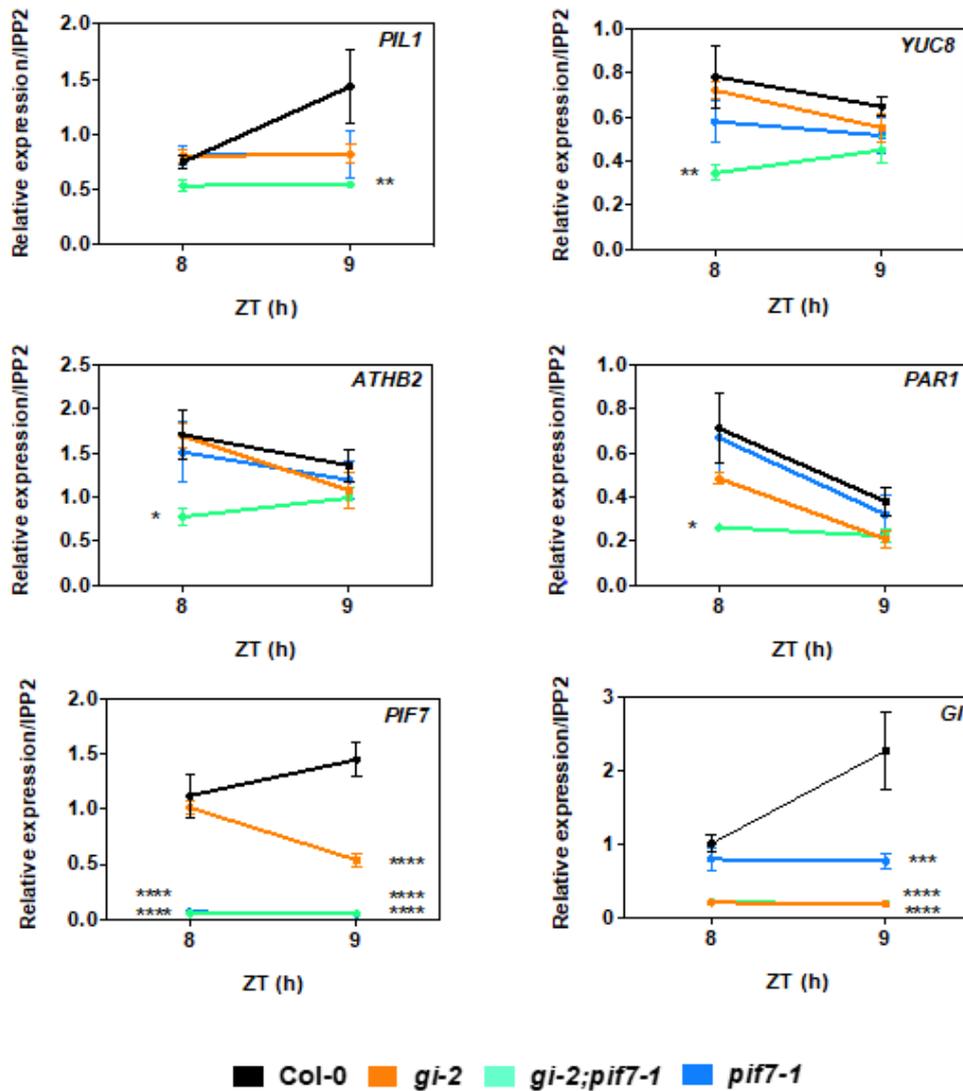
## 7. MATERIAL SUPLEMENTARIO.

	GO biological process complete	Fold Enrichment	raw P value	FDR
GROWTH	cell-cell junction assembly	41,42	1,21E-05	1,14E-03
	developmental vegetative growth	18,64	1,00E-03	4,36E-02
	suberin biosynthetic process	14,12	5,90E-05	4,51E-03
	plant-type cell wall loosening	11,75	5,51E-06	5,76E-04
	xyloglucan metabolic process	11,58	1,30E-08	3,37E-06
	positive regulation of growth	7,77	7,07E-04	3,34E-02
	cell wall biogenesis	4,44	7,77E-07	1,13E-04
	regulation of cell growth	4,18	9,67E-04	4,29E-02
	unidimensional cell growth	3,9	2,14E-06	2,49E-04
HORMONE	positive regulation of auxin mediated signaling pathway	34,52	1,73E-06	2,15E-04
	auxin efflux	16,57	1,99E-04	1,12E-02
	auxin homeostasis	9,56	7,37E-05	5,42E-03
	auxin polar transport	9	4,88E-07	8,31E-05
	brassinosteroid mediated signaling pathway	7,13	1,01E-04	6,51E-03
	steroid biosynthetic process	6,21	6,22E-04	3,03E-02
	cellular response to auxin stimulus	5,48	1,14E-03	4,75E-02
	response to jasmonic acid	3,55	7,77E-04	3,64E-02
LIGHT	shade avoidance	19,42	1,61E-05	1,45E-03
	phototropism	12,94	8,46E-05	5,79E-03
	response to far red light	11,56	1,30E-06	1,77E-04
	cellular response to blue light	11,51	1,38E-04	8,38E-03
	response to red light	7,65	2,03E-05	1,78E-03
	cellular response to red or far red light	7,03	3,38E-04	1,80E-02
	photomorphogenesis	6,72	4,76E-05	3,83E-03
	response to light intensity	4,02	6,11E-04	3,01E-02
OTHER DEV	stamen filament development	22,59	7,38E-05	5,29E-03
	gravitropism	4,68	1,08E-03	4,55E-02
	lateral root development	4,18	9,67E-04	4,26E-02
	regulation of developmental process	2,04	8,48E-04	3,89E-02
STRESS	response to iron ion	10,81	8,16E-04	3,77E-02
	response to oxidative stress	3,8	5,43E-09	1,47E-06
	response to wounding	3,42	1,88E-04	1,10E-02
	response to water deprivation	3,12	3,79E-05	3,18E-03
	response to salt stress	2,51	4,92E-04	2,53E-02
TRANSPORT	C4-dicarboxylate transport	11,3	7,04E-04	3,35E-02
	nitrate transport	7,22	9,53E-04	4,27E-02
	organic acid transport	4,65	5,02E-04	2,56E-02
	transmembrane transport	1,96	1,04E-03	4,42E-02
METABOLISM	olefinic compound biosynthetic process	7,97	6,37E-04	3,08E-02
	benzene-containing compound metabolic process	6,43	5,27E-04	2,66E-02
	detoxification	4,97	3,29E-04	1,78E-02
	cellular protein metabolic process	0,5	3,43E-05	2,92E-03
	nucleic acid metabolic process	0,37	1,90E-04	1,08E-02
GENERAL	gene expression	0,35	1,89E-04	1,08E-02
	establishment of localization in cell	0,16	9,70E-04	4,25E-02
	establishment of protein localization	0,1	9,16E-04	4,13E-02
	cellular protein-containing complex assembly	<0,01	1,09E-03	4,56E-02

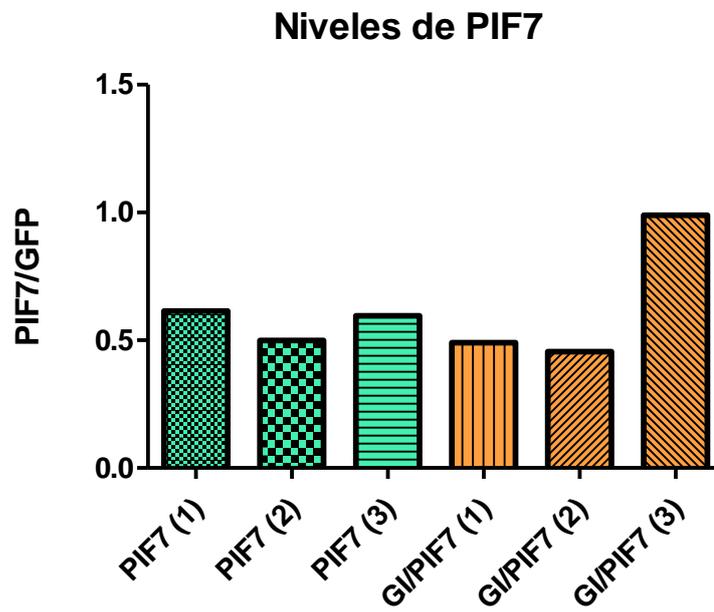
*Tabla Suplementaria S1. Categorías GO de proceso biológico de los datos de RNASeq. Enriquecimiento en categorías GO de proceso biológico (sobrerrepresentación de categorías de ontología génica (GO) usando como parámetros: “Text Type: Fisher’s Exact” y “Correction: Calculate Fisher Discovery Rate” en la plataforma PANTHER) de los genes diferencialmente expresados en mutantes de PIF7 y GI (RNASeq). Asociados al enriquecimiento de cada categoría, se encuentran en las columnas de la derecha los datos del p-valor y el FDR (False Discovery Rate), que indican la fiabilidad de los datos obtenidos.*

	GO biological process complete	Fold Enrichment	raw P value	FDR
LIGHT	shade avoidance	34,19	1,06E-06	1,26E-04
	response to far red light	20,36	1,84E-08	3,66E-06
	red or far-red light signaling pathway	12,87	1,28E-05	1,17E-03
	response to blue light	8,7	2,58E-05	2,23E-03
HORMONE	auxin efflux	21,88	5,42E-04	2,83E-02
	negative regulation of gibberellic acid mediated signaling pathway	20,51	6,39E-04	3,12E-02
	brassinosteroid mediated signaling pathway	12,56	2,78E-06	3,01E-04
	gibberellic acid mediated signaling pathway	9,73	1,01E-03	4,43E-02
	jasmonic acid mediated signaling pathway	9,25	7,20E-05	5,10E-03
	auxin polar transport	7,93	5,67E-04	2,89E-02
	hormone biosynthetic process	6,92	1,01E-03	4,46E-02
	response to abscisic acid	2,86	8,47E-04	3,88E-02
SEED	regulation of seed dormancy process	20,51	6,39E-04	3,09E-02
	regulation of seed germination	7,63	1,93E-04	1,20E-02
GROWTH	negative regulation of growth	12,16	4,65E-04	2,52E-02
	developmental growth	3,13	1,02E-03	4,45E-02
	cell growth	3,13	1,04E-03	4,51E-02
	shoot system development	2,54	5,21E-04	2,77E-02
STRESS	hyperosmotic salinity response	11,32	2,51E-05	2,23E-03
	response to chitin	5,55	3,68E-04	2,05E-02
	regulation of defense response	4,52	4,93E-05	4,02E-03
	response to water deprivation	3,35	6,01E-04	3,01E-02
	chemical homeostasis	3,16	5,76E-04	2,91E-02
GENERAL	C-terminal protein lipidation	54,71	1,20E-03	5,02E-02
	negative regulation of transcription, DNA-templated	4,41	6,16E-05	4,77E-03
	positive regulation of nucleic acid-templated transcription	2,83	9,25E-04	4,14E-02
	protein ubiquitination	2,68	2,93E-04	1,69E-02
	positive regulation of gene expression	2,66	1,06E-03	4,49E-02
	protein phosphorylation	2,33	3,20E-04	1,83E-02

*Tabla Suplementaria S2. Categorías GO de proceso biológico de los datos de ChIPSeq. Enriquecimiento en categorías GO de proceso biológico (sobrerrepresentación de categorías de ontología génica (GO) usando como parámetros: "Text Type: Fisher's Exact" y "Correction: Calculate Fisher Discovery Rate" en la plataforma PANTHER) de los genes próximos a las regiones de cromatina donde se encuentran asociados Gl y PIF7 (ChIPSeq). Asociados al enriquecimiento de cada categoría, se encuentran en las columnas de la derecha los datos del p-valor y el FDR (False Discovery Rate), que indican la fiabilidad de los datos obtenidos.*



**Figura Suplementaria S1. Control de la expresión de genes de respuesta a sombra en condiciones de luz blanca.** Expresión relativa de los genes *PIL1*, *ATHB2*, *PAR1*, *YUC8*, *GI* y *PIF7* respecto al gen *IPP2* en *Col-0* y los mutantes *gi-2*, *pif7-1* y *gi-2;pif7-1*. Las plántulas fueron crecidas 5 días en un fotoperiodo 10h luz/14h oscuridad a 22 °C y las muestras fueron recolectadas a ZT8 y ZT9 al sexto día. Los asteriscos en ambas figuras indican la presencia de diferencias significativas entre los mutantes y *Col-0* (analizadas mediante una ANOVA y un test de comparación múltiple de Tukey; \**p*-valor<0,05, \*\**p*-valor<0,01, \*\*\**p*-valor<0,001, \*\*\*\**p*-valor<0,0001).



*Figura Suplementaria S2. Datos brutos del ensayo de estabilidad de PIF7. Niveles de PIF7 normalizados respecto a GFP en muestras de N.benthamiana obtenidos a partir del Western blot mostrado en la figura 11A*