

SEMINARIO DE LICENCIATURA

INTERACCION ENTRE EL FITOCROMO B
Y EL CRIPTOCROMO HY4 EN

Arabidopsis thaliana.

Hernán Esteban Boccalandro

Director: Ing. Jorge J. Casal

UNIVERSIDAD de BUENOS AIRES

FACULTAD de AGRONOMIA

Instituto de Fisiología y Ecología Vinculado a la Agronomía

(I.F.E.V.A.)

Buenos Aires, Marzo de 1996

439 - 1

RESUMEN

Las plantas perciben cambios en el ambiente luminoso mediante tres grupos de fotorreceptores: los fitocromos, una familia de fotorreceptores que absorben principalmente luz Roja (R) y luz Rojo Lejana (RL), los criptocromos que absorben luz azul y UV-A y los fotorreceptores de radiación UV-B.

Estos sistemas de fotorreceptores, una vez excitados por la longitud de onda (λ) adecuada, inducen respuestas fotomorfogénicas cruciales para la adaptación de la planta a su medio.

El propósito de este trabajo fue investigar si los fitocromos y un fotorreceptor de luz azul (HY4) actúan en forma interdependiente durante la fotomorfogénesis de *Arabidopsis thaliana* (L.) Hyenh y de existir dicha interacción, qué fitocromos están involucrados en la misma.

Se realizaron experimentos comparando plantas de genotipo salvaje (WT), mutantes de fitocromo (*phyA* y *phyB*) y un mutante de fotorreceptor de luz azul (*hy4*). Las dos respuestas fotomorfogénicas estudiadas fueron el alargamiento del hipocótilo y la apertura de los cotiledones de plantas etioladas. Estas plantas fueron expuestas diariamente a tres horas de azul terminadas con un pulso de R o RL. En las plantas WT y mutantes *phyA*, el tratamiento con luz azul seguido por un pulso de R inhibió el alargamiento del hipocótilo y promovió la apertura de los cotiledones. Los efectos del azul fueron reducidos si la exposición al azul era seguida por un pulso de RL, que lleva el fitocromo a su forma inactiva (Pr). En las plantas WT no expuestas al azul, tuvieron poco efecto los pulsos de R versus los de RL y sólo se obtuvieron

respuestas máximas cuando las plantas estuvieron expuestas tanto a la luz azul como al pulso de R que establece la forma activa del fitocromo (Pfr) en el período subsecuente de oscuridad. Las respuestas al azul y a los pulsos de R versus RL fueron deficientes en los mutantes *phyB* y *hy4*.

Los tratamientos con luz azul también fueron efectivos en plantas expuestas a un fondo de luz naranja que satura las respuestas mediadas por el fitocromo. La luz azul, absorbida por un fotorreceptor específico (no por los fitocromos) requiere del fitocromo B para desarrollar todo su efecto. Los resultados obtenidos indican que existe coacción entre el fitocromo B y el criptocromo (HY4). No se observó sinergismo alguno entre el fitocromo A (activado por RLc o pulsos de RL) y HY4.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ADAPTACIÓN DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LAS PLANTAS AL AMBIENTE LUMÍNICO

Cuando los animales experimentan condiciones desfavorables (falta de alimento o agua, competidores, etc.) pueden movilizarse en búsqueda de un ambiente menos hostil. Las plantas deben permanecer donde se han establecido, aún cuando las condiciones no sean muy favorables, pero pueden adaptar con gran plasticidad su crecimiento, desarrollo y morfología al ambiente que las rodea. Para esto es fundamental percibir señales ambientales. La luz , es uno de los factores ambientales más complejos y variables al cual están expuestas las plantas. No sólo es fuente de energía para fotosintetizar, sino también porta información sobre diversos cambios en el ambiente potencialmente cruciales para el futuro de la planta.

Para poder percibir estas señales luminosas, las plantas poseen sistemas receptores de luz muy precisos. Es así, que cambios en la duración, intensidad, dirección y calidad de luz que llegan a una planta pueden ser utilizados como información acerca de la época del año (fotoperíodo), presencia de plantas competidoras, posición dentro de un canopeo, etc. (Ballaré y col., 1987; Casal y Smith 1989).

La percepción de estas señales lumínicas pueden conducir a modificaciones en el patrón de desarrollo y crecimiento de la planta, es decir pueden inducir respuestas fotomorfogénicas.

Las señales luminosas son percibidas por tres grupos de fotorreceptores:

- 1) Fitocromos, que absorben principalmente R (600-700 nm) y R lejana (700 - 800 nm)
- 2) Fotorreceptores de luz azul o Criptocromos, que absorben luz azul y UV-A (320 - 450 nm)
- 3) Fotorreceptores de radiación UV-B (280 - 320 nm).

De estos fotorreceptores, el mejor caracterizado bioquímica y fisiológicamente es el fitocromo.

1.2 FITOCROMOS

Distribución y Ubicación:

Los fitocromos son una familia de fotorreceptores ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se los encuentra en musgos, helechos, gimnospermas, angiospermas, y en algunos hongos (Mcnachere, 1994). En plantas etioladas, los fitocromos están presentes principalmente en células jóvenes de expansión rápida de casi todos los órganos de una planta, incluso en raíz. A nivel subcelular se localizan en el citosol como proteínas sclubles (Pratt, 1994).

Estructura y tipos de fitocromos

Los fitocromos son cromoproteínas formados básicamente por un grupo cromóforo, llamado fitocromobilina, unido covalentemente a una apoproteína de aproximadamente 120-130 kDa. Este polipéptido está plegado, formando dos dominios principales. El dominio N-terminal de 70 kDa, que porta el grupo cromóforo y está más expuesto en la forma Pr, y el dominio C-terminal de 55 kDa, más expuesto en la forma Pfr que interactuaría con componentes celulares involucrados en la transducción de la señal luminosa (Elich y Chory, 1994). En *Arabidopsis thaliana*, existen cinco genes que codifican para distintas apoproteínas, dando origen a cinco fitocromos diferentes: fitocromo A, B, C, D y E (Sharrock y Quail, 1989; Clack y col., 1994). En tomate existen más de cinco genes que codifican para fitocromo, de los cuales uno de ellos codificaría para un fitocromo bastante diferente a los

caracterizados hasta el momento, es decir distintos de los fitocromos A, B, C, D y E de *Arabidopsis* (Condonnier - Pratt y col., 1994).

El grupo cromóforo es sintetizado a partir del ácido 5-aminolevúlico (ALA), dando origen mediante numerosos pasos enzimáticos a un tetrapirrol lineal. Este grupo prostético es el encargado de absorber la luz que llega a la molécula de fitocromo y sería común a los distintos fitocromos conocidos (Rüdiger y Thümmler, 1994).

Características espectrales y formas del fitocromo:

Los fitocromos existen en dos formas interconvertibles, una de color azul llamada Pr y otra de color verdoso llamada Pfr. A nivel del cromóforo, estas formas difieren en la isomerización del doble enlace del C 15 entre el anillo C y D del tetrapirrol (Rüdiger y Thümmler, 1994). Esta isomerización diferencial lleva a que sus espectros de absorción sean diferentes (Fig. 1). El Pr absorbe principalmente luz entre 600-700 nm con un máximo en 660 nm (Rojo: R), pasando a la forma Pfr, (forma activa del fitocromo), cuya absorción ocurre entre 700-800 nm, con un máximo en 730 nm (Rojo Lejano: RL). Al absorber esta luz, el Pfr se reconvierte en Pr (Kendrick y Kronenberg, 1986). Los fitocromos pueden percibir cambios en la calidad de luz mediante la percepción de cambios en la relación R/RL del ambiente, que modifica el fotoequilibrio, es decir la relación $\phi = \text{Pfr}/\text{Fitocromo total}$. El fotoequilibrio máximo que se puede alcanzar irradiando con R es de aproximadamente $\phi=0.87$ (Mancinelli, 1994) . No se pueden alcanzar valores de ϕ más cercanos a 1, ya que los espectros de absorción del Pr y Pfr están superpuestos, entonces al iluminar con R es absorbida principalmente por el Pr que pasa a Pfr, pero este Pfr formado también absorbe algo de R volviendo a la

forma Pr. Esto lleva a que nunca se pueda transformar todo el Pr en Pfr. Cabe destacar que el Pr y el Ffr absorben también luz azul y UV. Aunque estas luces no son tan eficientes en la inducción de respuestas mediadas por fitocromo como el R y RL. Los fitocromos son sintetizados en su forma inactiva Pr, como dímero (Bowler y Chua, 1994). Al percibir R se modifica la isomerización del cromóforo provocando un cambio en la conformación de la apoproteína. Esta variación en la estructura, conduce a una modificación de las interacciones con otros componentes celulares (aún desconocidos) involucrados en la transducción de las señales percibidas por los fitocromos. Estos cambios llevan a diversas respuestas fotomorfogénicas, frecuentemente mediadas por modificaciones en la expresión génica (Li y col., 1994). La información presente se resume en el esquema de la Fig. 2.

Respuestas inducidas por RLc

Según lo expuesto en esta Fig. 2 sólo se inducirán respuestas fisiológicas vía fitocromo cuando las plantas sean iluminadas con R, y no cuando sean iluminadas con RL.

Existen dos excepciones muy importantes en las cuales el RL induce respuestas fisiológicas vía fitocromo:

- a) Las plantas etioladas y las semillas suelen responder a muy bajas irradiancias tanto de R como de RL, debido a que con las pequeñas cantidades de Pfr que se forman aún con RL serían suficientes para desencadenar determinadas respuestas fisiológicas. Este tipo de respuestas no son R/RL reversibles ya que ambas luces son inductoras (este tipo de respuestas se denominan respuestas a muy bajos flujos).

b) La otra excepción son las llamadas respuestas a altas irradiancias (del inglés HIR), que son inducidas en plantas etioladas por altas irradiancias de RL continuo (RLc). Por ejemplo la inhibición del alargamiento del hipocótilde de plantas etioladas de *Arabidopsis thaliana* también es inducida al irradiarlas con RLc. Dado que el mutante phyA pierce las respuestas HIR y que plantas transgénicas que sobreexpresan fitocromo A tienen mayor sensibilidad al RLc (Parks y Quail, 1993) se concluyó que este fitocromo estaría involucrado en mediar las respuestas HIR al RLc. Aún no se ha esclarecido cómo actúa este fitocromo para mediar este modo de acción, pero se sabe que la disponibilidad de Pfr no alcanza para explicar cuantitativamente estos efectos. Otro aspecto del sistema del fitocromo (además del Pfr) debe ser activo.

Roles y propiedades de los distintos fitocromos:

A lo largo del ciclo de vida de las plantas los fitocromos regulan importantes procesos tales como la germinación de semillas (Casal y col., 1991), la des-etiolación de plantas previamente cultivadas en oscuridad (inhibición de la elongación del hipocótilde, la apertura de los cotiledones, el desarrollo de cloroplastos, etc.) el desarrollo de hojas, la inducción de la floración, etc. (Reed y col., 1993).

La existencia de cinco genes en *Arabidopsis* que codifican para fitocromos diferentes, sugiere que cada fitocromo podría tener un rol fisiológico específico, percibiendo señales lumínicas diferentes y/o produciendo distintas respuestas o bien actuando en distintas etapas de una misma respuesta fisiológica (Smith y Whitelam, 1990; Whitelam y Harberd, 1994). Esta hipótesis fue probada en sus aspectos más generales para los

fitocromos A y B, mediante el uso de plantas mutantes y transgénicas que no tienen o sobreexpresan fitocromo A o B, respectivamente. Así por ejemplo, la germinación y des-etiolación en ambientes ricos en RL (canopeos muy densos) están mediadas por el fitocromo A, mientras que el fitocromo B no es importante en esta respuesta (Yanovsky, Casal y Whitelam, 1995; Botto, Sánchez, Whitelam y Casal 1996). Por otra parte, las respuestas a las bajas relaciones R/RL causada por plantas vecinas en plantas des-etioladas (cultivadas en luz) son mediadas por el fitocromo B (Ballaré, Casal y Kerdick, 1991 ; Whitelam y Smith 1991; Yanovsky y col., 1995). El fitocromo A es muy abundante en plantas etioladas y es inestable en su forma activa (Pfr), en cambio el fitocromo B es más estable en la forma activa por lo cual puede cumplir roles importantes en plantas des-etioladas(Smith 1994). Los niveles de fitocromo B en su forma activa (Ffr), son importantes en la regulación de la germinación de semillas, ya que pueden permanecer como Pfr durante largos períodos sin volver a la forma Pr o sin ser destruidos, aún cuando las semillas estén poco hidratadas. (Salisbury y Ross 1992).

Debido a la ausencia de mutantes específicos para los fitocromos C, D o E no se sabe casi nada acerca de sus roles fisiológicos. Sólo se conoce que el fitocromo C sería del tipo estable al igual que el fitocromo B (Quail, 1994).

1.3 CRIPTOCROMOS

Distribución y tipos de criptocromos:

Son fotorreceptores que absorben en la región del espectro del UV-A (320 - 400 nm) y el azul (400 - 500 nm). Están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, encontrándose en algas unicelulares y pluricelulares, musgos, helechos, gimnospermas y angiospermas. También están ampliamente distribuidos en el reino fungi, donde se ha estudiado su función en *Phycomyces*, *Neurospora crassa*, *Pteris vittata*, etc. Si bien aún no se conoce toda la familia de los fotorreceptores de azul, se sabe que se diferencia de la familia de los fitocromos, ya que esta última está formada por fotorreceptores estructuralmente similares (todos poseen el mismo cromóforo y varían parcialmente en la secuencia de aminoácidos de sus apoproteínas) en cambio los criptocromos son más heterogéneos, ya que existen fotorreceptores de azul de estructura muy diferentes.

Uno de ellos, por ejemplo ha sido caracterizado recientemente por el grupo de Briggs y está asociado a la membrana plasmática. Está involucrado en mediar las respuestas fototrópicas de las plantas debido a un estímulo direccional de la luz.

Otro criptocromo que ha sido caracterizado es el HY4 de *Arabidopsis thaliana*. Los mutantes del locus HY4 son plantas insensibles a la luz azul para respuestas fotomorfogénicas tales como la inhibición del alargamiento del hipocótil, pero no perdieron las respuestas fototrópicas inducidas por luz azul. El locus HY4 codifica para una flavoproteína con gran homología a la ADN-fotoliasa bacteriana. Dado que las fotoliásas son una clase de flavoproteínas que catalizan reacciones inducidas por luz

azul, y considerando la gran similitud con la secuencia del gen HY4, se piensa que el mismo codificaría para un fotorreceptor de luz azul, pero no actuando como fotolasa al mediar la fotomorfogénesis (Ahmad y Cashmore, 1993, Briggs 1993).

Roles y respuestas mediadas por criptocromos:

Existe gran variedad de respuestas mediadas por los criptocromos tales como el fototropismo, la síntesis de ALA, la síntesis de carotenoides en Neurospora, fototaxis en phicomycetes, reactivación de la Nitrato reductasa, (Senger y Schmidt, 1994) la inhibición del alargamiento de tallos, la expansión foliar y también regula la expresión del gen que codifica para la Chalcona sintetasa de *Arabidopsis* (Liscum y Hangarter, 1994).

Muchas de estas respuestas son controladas también por los fitocromos. Es decir que podría existir redundancia de fotorreceptores en la regulación de determinados procesos fotomorfogénicos.

En lo que resta de trabajo, cuando se mencione a un fotorreceptor de luz azul o criptocromo se estará haciendo referencia específicamente al producto del gen HY4, que interviene en la regulación de respuestas fotomorfogénicas.

1.4 INTERACCIÓN ENTRE FOTORRECEPTORES

Los distintos sistemas de fotorreceptores pueden interactuar entre sí para modular una misma respuesta fisiológica. En los casos donde las interacciones entre fotorreceptores son sinérgicas, se alcanzaron respuestas fisiológicas máximas, mayores a la suma de la acción independiente de cada fotorreceptor. La interacción más estudiada hasta el momento es la existente entre fitocromos y fotorreceptores de luz azul. Esta interacción no ocurriría directamente entre los fotorreceptores sino entre la cadena de transducción de los mismos.

Mohr (1986), propuso un modelo que explica a nivel general, la interacción entre fotorreceptores, particularmente entre fitocromos y criptocromos. Según este modelo la forma activa del fitocromo (Pfr), sería el que induce las respuestas y el criptocromo regularía la magnitud de las respuestas al Pfr. Es decir, el criptocromo ^{no} actuaría por se (de forma independiente), sino aumentando la capacidad de respuesta inducida por el Pfr.

La regulación de la inhibición del alargamiento del hipocótille, es una de las respuestas fotomorfogénicas más estudiadas en muchas especies, y es controlada tanto por fitocromo como por el criptocromo. Fue probado que ambos sistemas de fotorreceptores interaccionan en forma sinérgica para controlar el largo del hipocótille en especies como *Sesamum indicum* (Drumm Herrel y Mohr, 1984), *Cucumis sativus* (Drumm Herrel y Mohr, 1991; Attridge y col., 1984) y *Pinus sylvestris* L. (Fernbach y Mohr, 1990). Analizando la regulación de otras respuestas fotomorfogénicas tales como la síntesis de antocianinas en

mesocótiles de *Sorghum vulgare* (Mohr, 1986); y la acumulación de Gliceraldehido 3-P Deshidrogenasa en la matriz cloroplástica en hojas de *Sorghum vulgare* (Oelmüller y Mohr, 1985) se observó que también existe co-acción entre los fitocromos y criptocromos. Estos fotorreceptores también interaccionan para regular la expresión génica de la subunidad pequeña de la enzima Rubisco en *Sorghum vulgare* (Drumm-Herrel y Mohr, 1988). Los resultados de estas investigaciones coincidieron nuevamente con el modelo ya propuesto por Mohr, ya que la forma activa del fitocromo controla directamente la expresión génica mientras que la luz UV-A absorbida por el criptocromo, incrementa la sensibilidad de la maquinaria responsable de la producción de la subunidad pequeña de Rubisco al Pfr.

Si bien todos los ejemplos citados anteriormente en distintas especies apoyan el modelo propuesto por Mohr, no se sabía qué criptocromos y qué fitocromos estaban involucrados en dicha co-acción. Para esto hacía falta usar mutantes específicos para los distintos fitocromos y criptocromos y mediante distintos tratamientos lumínicos probar cuales interactúan entre sí. Al estudiar un mutante de pepino (*Cucumis sativus*) llamado *lh*, deficiente en fitocromo B, se observó que no respondían a pulsos de R/RL suministrados al final del fotoperíodo (respuestas de "fin del día") (López-Juez y col., 1990; Nagatani y col., 1991). Este tratamiento lumínico induce una de las respuestas típicas mediada por el fitocromo B. A diferencia del WT, este mutante no incrementó la tasa de alargamiento del hipocótille ante un aumento de la radiación RL (ya sea producida por canopeos muy densos o suministrada artificialmente). Al iluminar

este mutante con luz blanca con niveles normales o deficientes de radiación azul (la luz azul normalmente inhibe el alargamiento del hipocótilo al igual que la R) no se observaron respuestas como en el WT, respecto de la tasa de alargamiento del hipocótilo. El mutante *lh* conserva las respuestas fototrópicas a la dirección de la luz azul a pesar de haber perdido al menos una de las respuestas fotomorfogénicas a la luz azul (Ballaré, Casal y Kendrick, 1991). Es razonable pensar que la falta de inhibición del hipocótilo por luz azul se deba únicamente a la deficiencia en fitocromo B del mutante *lh*. Esto apoya el modelo propuesto por Mohr, ya que el criptocromo sólo afectaría el largo del hipocótilo interaccionando con la vía del fitocromo y no en forma independiente. Según estos resultados obtenidos en pepino se concluye que el fitocromo B interactuaría con algún fotorreceptor de luz azul desconocido. La falta de mutantes específicos (además del *lh*) impide determinar determinar qué criptocromo está involucrado en la co-acción y si otros fitocromos distintos del B, también interaccionan con este criptocromo en pepino.

Considerando que recientemente se obtuvieron en *Arabidopsis* mutantes específicos para el criptocromo HY4 y para el fitocromo B (*phyB*) y el A (*phyA*), esta especie proveería un buen modelo donde probar si existe co-acción entre los distintos fitocromos y el criptocromo HY4, combinando el uso de mutantes y tratamientos lumínicos que estimulen específicamente a cada uno de ellos. Sin embargo, investigaciones anteriores en *Arabidopsis*, mostraron resultados aparentemente inconsistentes con el modelo de Mohr mencionado anteriormente. El mutante de fitocromo B (*phyB*), al ser analizado bajo luz azul

continuó respondió aparentemente en forma normal a este tratamiento lumínico en la regulación de la apertura del gancho plumular. Es decir, no se observó co-acción entre dicho fotorreceptor y el criptocromo (Liscum y Hangarterm, 1993).

Inevitablemente, antes de evaluar la participación de distintos fitocromos y el HY4 en la co-acción entre fotorreceptores, es necesario encontrar condiciones en que dicha co-acción ocurra en *Arabidopsis*.

2 OBJETIVOS:

- 1) Determinar si existe co-acción entre diversos fitocromos y fotorreceptores de luz azul en la regulación de dos respuestas fotomorfogénicas típicas de plantas etioladas de *Arabidopsis thaliana* (la regulación del alargamiento del hipocótille y la apertura de los cotiledones).
- 2) De existir esta interacción, determinar combinando el uso de mutantes específicos (*phyA*, *phyB* y *hy4*) y diversos tratamientos fisiológicos, qué fotorreceptores específicos están involucrados en dicha interacción (el fitocromo A y/o el B).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Se sembraron semillas de *Arabidopsis thaliana* (L.), Heynh cultivar Landsberg erecta, o de las mutantes isogénicas *phyB-1*, *phyA - 201* o *hy4*. (2.23 N) en cajas de plástico transparentes (40 x 33 mm² x 15 mm de altura; 15 semillas por caja) sobre dos capas de papel de filtro humedecido con 0.9 ml de solución Johnson 10 %. Las semillas originales fueron amablemente provistas por los profesores R. E. Kendrick y M. Koornneef (Wageningen University, Holanda), la Dra. J. Chory (The Salk Institute, California, USA), y por el Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio State University, USA). Las cajas fueron incubadas por 3 días en oscuridad a 7°C. Luego fueron expuestas a un pulso saturante de R para inducir la germinación y finalmente transferidas a las condiciones de luz u oscuridad características de cada protocolo, a 25°C.

3.2 Tratamientos de luz:

Los pulsos de R fueron provistos por tubos fluorescentes rojos (Philips 40/15, Eindhoven, Holanda), condujeron a un fotoequilibrio calculado en $\emptyset=0.87$ y la tasa de flujo fue de 35 μmoles de fotones . m^{-2} . s^{-1} . Los pulsos de R L fueron provistos por una lámpara incandescente combinada con un filtro de 8 cm de agua destilada (para disminuir la transmisión infrarroja), y un filtro RG9

(Scholt, Mainz, Alemania) que enriquece el espectro en RL. Estos pulsos condujeron a un fotoequilibrio calculado de $\emptyset=0.027$ y una tasa de flujo de 42 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Los espectros de emisión de las fuentes que condujeron a $\emptyset=0.027$ y $\emptyset=0.87$ fueron publicadas por Casal y col. (1991). El RLC fue provisto por una lámpara incandescente de 500 W en combinación con una caja plástica transparente con 8 cm de agua, y 2 filtros acrílicos de R y 4 filtros de luz azul (Paolini 2031, Argentina). De esta forma se obtuvo un $\emptyset=0.15$. El espectro de emisión de la fuente se observa en la Fig. 7. La luz azul fue provista por lámparas de vapor de mercurio Philips HP400 W, en combinación con 2 láminas de Plexiglas azul, cada una de 3 mm de grosor (B-27, Rohm y Haas, Darmstadt, Alemania), y 10 cm de agua destilada ($\emptyset=0.43$, $9 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). El espectro de emisión es presentado en la Fig. 3.

En los tratamientos lumínicos donde fue necesario combinar el RLC con luz azul, se utilizaron como fuente de azul tubos fluorescentes (TLF 40 W / 54; Philips, Buenos Aires, Argentina) en combinación con filtros de acetato celeste (0.2 mm, N° 502, La Casa del Acetato, Buenos Aires. El espectro de emisión de la combinación de ambas fuentes se observa en la Fig. 7.

Para evaluar el efecto de la luz azul en condiciones de saturación de las respuestas mediadas por el fitocromo, se irradió con luz naranja o naranja más azul. Se utilizaron lámparas de sodio de alta presión (Phillips SON), en combinación con un filtro de acetato amarillo y uno naranja (0.5 mm, N° 532 y 531 respectivamente. La Casa del Acetato) en el caso de luz naranja, y sin dichos filtros en el caso del naranja más azul (Fig. 8).

4.3 Observación de plantas y estadística:

El largo del hipocótilo fue medido aproximando a los 0.5 mm más cercanos con una regla. Las diez plantas más largas fueron usadas para calcular el largo promedio del hipocótilo para cada caja (una réplica) con aproximación a 0.1 mm, y este valor fue usado para análisis de varianza. El ángulo entre los cotiledones fue medido (en las mismas plantas usadas para las mediciones del largo) con un transportador.

Los experimentos fueron repetidos varias veces. Las réplicas (cajas) correspondientes a todos los experimentos fueron promediadas para definir cada tratamiento. En cambio, valores promedio del largo y el ángulo de cada experimento fueron usados para estimar diferencias entre dos tratamientos. Para este propósito cada experimento fue usado como una réplica, a los fines estadísticos.

4 RESULTADOS

Un día después de inducirse la germinación, plantas WT fueron expuestas por tres días sucesivos a un pulso de R o RL (3 minutos) en combinación factorial con o sin 3 horas de luz azul provista antes de los pulsos, (ver esquema del protocolo en la Fig. 4, arriba). Un grupo de plantas control fue mantenido en oscuridad (Osc) luego de la germinación (Osc/Osc en Fig. 4). La longitud de los hipocótilles y el ángulo entre los cotiledones fueron similares en las plantas tratadas con pulsos de R o RL, sin haber sido expuestas previamente al azul. Las plantas expuestas diariamente a 3 horas de azul terminados con un pulso de R, tenían hipocótilles más cortos y los cotiledones mucho más abiertos (mayor ángulo) que las plantas expuestas a fotoperíodos terminados con un pulso de RL (Fig. 4). Es decir, se observó una interacción significativa en ambos tratamientos. El efecto del azul fue mayor cuando se terminó el fotoperíodo con un pulso de R, comparado con un pulso de RL, y la diferencia entre R y RL fue mayor cuando dichos tratamientos fueron precedidos por 3 horas de luz azul.

En otra serie de experimentos, el protocolo anterior fue usado para plantas WT y para los mutantes *phyA*, *phyB* y *hy4*. Como control se incluyó, un grupo de plantas expuesto a 3 horas de RLC (en vez de azul), terminando con pulsos de R y RL (Fig. 5, arriba). Como se mencionó en la introducción, el pretratamiento con RLC conduce a respuestas del tipo HIR mediadas por fitocromo A que a su vez aumentan las respuestas al R versus RL (Casal, 1995).

En estos experimento se calcularon los siguientes efectos:

- i) el efecto del azul versus oscuridad antes del pulso de R.
- ii) el efecto del R (alto Pfr) versus RL (bajo Pfr) después de 3 horas de azul.
- iii) el efecto de R versus RL después de 3 horas de RLc.

Debido a que el fitocromo B media las respuestas de "fin del día", es decir las respuestas a pulsos de R versus RL al final del fotoperíodo (López-Juez y col. 1990; Nagatani y col., 1991), no fue sorprendente que los pulsos de R versus RL, después del azul o RLc (RLc), no causaran diferencias significativas en el mutante *phy B* (Fig. 5). El mutante *hy4* mostró respuestas reducidas al azul (Fig. 5), tal como fuera observado previamente bajo luz azul continua (Koornneef y col., 1980). El aspecto novedoso de estos experimentos es que plantas mutantes *phy B*, comparadas con las WT, mostraron respuestas significativamente reducidas al azul, y el mutante *hy4* mostró respuestas significativamente reducidas al R versus RL después del tratamiento con azul (pero no después de RLc) (Fig. 5). En otras palabras, en plantas expuestas a fotoperíodos cortos de azul, el fitocromo B (fotorreceptor de R/RL) fue necesario para inducir respuestas al azul y el criptocromo HY4 (fotorreceptor de luz azul) fue necesario para inducir respuestas al R versus RL.

Con el protocolo descripto anteriormente, no se pudo obtener una idea clara sobre el rol del fitocromo A durante las respuestas al azul, ya que a diferencia de los otros genotipos, el mutante *phyA* mostró diferencias significativas entre R y RL en el grupo sin pretratamiento de 3 horas de luz azul o RLc (Fig. 5). Esta

respuesta (también presente después de 3 horas de RLC) podría deberse a un fitocromo diferente de A o 3, cuya acción aparecería en plantas etioladas, particularmente en el mutante *phyA* (Casal 1995). Como esta interpretación es especulativa, se usó un protocolo diferente para investigar si existe sinergismo entre el fitocromo A y HY4 en *Arabidopsis thaliana*. Este protocolo consistió en exponer diariamente a 3 horas de RLC con o sin luz azul suplementaria, en combinación factorial con un pulso de RL seguido por oscuridad, o un pulso de 3 minutos de RL cada hora o RLC durante las 21 horas restantes de cada día (Fig. 6, arriba). Las 3 horas de RLC suministradas durante la exposición al azul fueron para evitar efectos diferenciales del azul sobre los niveles de fitocromo A, ya que la luz azul sola incrementa I_c relación \emptyset , con respecto a la oscuridad. Por otro lado el Pfr del fitocromo A es lábil a la luz, por lo cual si se mantienen altos los niveles de Pfr se verían afectados los niveles de fitocromo A. Se sabe que en plantas etioladas los efectos del RL continuo (Dehesh y col., 1993; Nagatani y col., 1993; Parks y Quail, 1993; Whitelam y col., 1993) y los efectos de pulsos repetidos de RL (Casal 1995) son mediados por el fitocromo A. Tanto el crecimiento del hipocótille como la apertura de los cotiledones fueron significativamente afectados ($P << 0.01$) por pulsos de RL repetidos o RLC comparado a pulsos simples de RL en plantas WT., *phy B* y *hy4* (Fig. 6). El mutante de fitocromo A no mostró respuestas a estos tratamientos tal como era de esperar. El efecto residual del RLC sobre la apertura de los cotiledones en plantas mutantes *phy A* fue seguramente debido al mayor \emptyset calculado provisto por la fuente de RLC ($\emptyset = 15\%$) comparado con la fuente utilizada para pulsos de

RL ($\emptyset = 2.7\%$) y no a una verdadera reacción de alta irradiancia (ver introducción). Las respuestas al RLc versus RLc más azul fueron pequeñas (Fig. 6). Para el crecimiento del hipocótilo la diferencia fue sólo significativa ($P < 0.01$) en el mutante *phy A*. Para la apertura de los cotiledones todos los genotipos, incluyendo *hy4*, mostraron una respuesta pequeña, pero significativa ($P < 0.05$). El punto más importante de este grupo de resultados es que ni el alargamiento del hipocótilo ni la apertura de los cotiledones mostraron una interacción significativa entre los tratamientos con RL (ya sea con un pulso de RL al final del fotoperíodo, pulsos de RL cada hora, o RLc) y los tratamientos con azul (RL versus RL+azul). En otras palabras, incrementando la actividad del fitocromo A, no se incrementaron las respuestas al azul, particularmente a las respuestas mediadas por HY4.

Los datos mostrados en la Fig. 5 indican respuestas reducidas al azul en el mutante *phyB*. Antes de concluir que esta pérdida de respuesta se debió a que el fitocromo B interactuó con el criptocromo HY4, se debe excluir la posibilidad de que la luz azul haya actuado en parte como R (ya que la fuente de azul utilizada produce un $\emptyset = 43\%$, típico de las λ del azul), es decir directamente vía fitocromo B (y no vía criptocromo), incrementando los niveles de Pfr a valores suficientes para desencadenar las respuestas fisiológicas perdidas en el mutante *phyB*. De ser cierta esta interpretación, en el mutante *phyB* no se habría perdido la interacción con el fotorreceptor de luz azul, sino que simplemente faltaría el fitocromo capaz de percibir la luz azul. Para evaluar esta posibilidad se trató a un grupo de plantas WT y los genotipos mutantes *phyA*, *phyB* y *hy4*, bajo

condiciones donde se saturaron las respuestas mediadas por los fitocromos mediante el uso de un fondo de luz naranja ($100 \mu\text{moles m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), alcanzándose un photoequilibrio máximo. En estas condiciones la suplementación con luz azul ($50 \mu\text{moles m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, Fig. 8), no debería inducir efecto alguno, con respecto al tratamiento con luz naranja sola, si el efecto del azul fuera mediado directamente por fitocromos. Para confirmar que las respuestas mediadas por fitocromos estaban saturadas un grupo control de plantas fueron tratadas con luz naranja más luz naranja adicional ($50 \mu\text{moles m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), es decir $150 \mu\text{moles}$ de fotones totales (Fig. 8 y Fig. 9 arriba). Como resultado se observó que en plantas WT y mutantes *phyA* la presencia del azul redujo el alargamiento del hipocótille e incrementó la apertura de los cotiledones (Fig. 9). La adición de luz naranja extra no tuvo efectos significativos (Fig. 9), indicando que los efectos del azul fueron mediados por fotorreceptores específicos de luz azul (y no por fitocromos). Tanto los mutantes *phyB* como los *hy4* mostraron respuestas reducidas al azul cuando fue suministrado junto con luz naranja, reafirmando que los efectos del azul fueron mediados por un criptocromo.

5 DISCUSIÓN

5.1 Co-acción entre el fitocromo B y fotorreceptores de luz azul

Se observó un fuerte sinergismo entre la luz absorbida por el fitocromo y la luz azul en plantas WT de *Arabidopsis thaliana* (Fig. 3). La exposición diaria a 3 horas de luz azul redujo el claramiento del hipocótil e incrementó la apertura de los cotiledones. Las respuestas a la luz azul fueron significativamente mayores cuando dicho tratamiento fue terminado con un pulso de R, comparado con un pulso de RL, es decir con altos niveles de Pfr. Además los pulsos diarios de R versus RL redujeron e alargamiento del hipocótil e incrementaron la apertura de los cotiledones cuando eran precedidos por 3 horas de azul, pero no cuando eran precedidos por oscuridad.

El mutante *phy B* mostró respuestas reducidas al azul (poca inhibición del alargamiento del hipocótil y poca apertura de los cotiledones, Fig. 5), aún cuando el azul fue adicionado a un fondo de luz naranja para saturar las respuestas mediadas por fitocromos (Fig. 9). La inhibición del alargamiento del hipocótil y la promoción de la apertura de los cotiledones, inducida por luz azul adicionada a la luz naranja, fue mediada por fotorreceptores específicos de azul (no por fitocromos), ya que la adición de luz naranja extra, no tuvo efectos significativos sobre ambas respuestas. De esto se concluye que la expresión total de estas respuestas fisiológicas analizadas, mediadas por fotorreceptores de luz azul requiere del fitocromo B en su forma activa (Pfr) durante el periodo de

oscuridad subsiguiente al tratamiento lumínico. Plantas des-etioladas del mutante *lh* de pepino, deficientes en fitocromo B (López-Juez y col. 1990), también carecen de respuestas (inhibición del alargamiento del hipocótilo) mediadas específicamente por fotorreceptores de luz azul (Ballaré y col., 1991).

En *Arabidopsis*, existe un efecto residual del azul, no mediado por co-acción entre el fitocromo B y fotorreceptores de luz azul. Estos fotorreceptores podrían actuar en forma independiente o en co-acción con otro fitocromo (que tampoco es el fitocromo A, ver más adelante). Bajo luz continua azul, no se había observado co-acción entre el fitocromo B y el fotorreceptor de luz azul (Liscum y Hangarter 1994). Es decir, que la acción del criptocromo por una vía independiente del fitocromo B, se tornaría más importante bajo irradiaciones prolongadas de azul.

5.2 Co-acción entre el fitocromo B y el producto del gen *HY4*

Como era de esperarse las respuestas al azul analizadas, fueron reducidas en el mutante *hy4* comparado con las plantas WT (Fig. 5 y Fig. 9). El aspecto novedoso es que el mutante *hy4* mostró respuestas disminuidas a pulsos de R versus RL provistos al final del fotoperíodo de 3 horas de azul (Fig. 5). Como se mencionó anteriormente los pulsos al final del día son percibidos por el fitocromo B (Nagatani y col. 1991; Mc Cormac y col. 1993; Parks y Quail 1993). Esta respuesta fue reducida en las plantas mutantes *hy4* expuestas al azul durante el fotoperíodo, pero fue normal en los mutantes *hy4* expuestos a RLc durante el

fotoperíodo. En otras palabras, el mutante *hy4* no fue intrínsecamente incapaz de responder normalmente a los pulsos de R versus RL, sino que no fue normal la ampliación de la capacidad de respuesta al Pfr del fitocromo B mediada por el azul. Se concluye que la respuesta máxima al azul ocurre si están presentes las formas activas tanto del producto del gen *HY4* como del fitocromo B.

5.3 Falta de co-acción entre el fitocromo A y fotorreceptores de luz azul.

Los resultados presentes proveen evidencia en contra de una interacción sinérgica entre el fitocromo A y fotorreceptores de luz azul. El incremento de la actividad del fitocromo A (por pulsos horarios de RL o RLC) no aumentó las respuestas al azul suplementario (Fig. 7). Muy por el contrario, las respuestas al azul fueron generalmente mayores en el mutante *phy A* (Fig. 7 y Fig. 9). La apertura de los cotiledones fue muy pobre en las plantas *phy A* expuestas diariamente a 3 horas de RLC terminado con pulsos de RL, pero la adición del azul al RLC fue más efectiva en este genotipo (Fig. 7). La carencia de sinergismo entre el fotorreceptor de azul y el fitocromo A es consistente con observaciones previas que mostraron que las respuestas al azul para el alargamiento del tallo eran normales (o más que normales) en el mutante *aurea* de tomate (Casal 1994), que tiene cantidades deficientes de fitocromo A espectralmente activo (Sharma y col. 1993), y deficientes en plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresaban fitocromo A (Casal y Sánchez 1994).

5.4 Significancia fisiológica

La existencia de sinergismo entre la luz azul (absorbida por fotorreceptores específicos) y los niveles de Pfr (Mohr 1986) había sido documentada anteriormente. Este trabajo es el primero en demostrar, mediante el uso de mutantes específicos, un sinergismo entre HY4 y fitocromo B es decir en identificar los fotorreceptores específicos involucrados. Estas interacciones no son el resultado de cambios en los niveles de fitocromo B, porque este fotorreceptor aparece expresado constitutivamente. Los niveles de fitocromo B no son afectados por las condiciones lumínicas o por las mutaciones en el gen que codifica para el fitocromo A o el HY4 (Somers y col. 1991; Nagatani y col. 1993; Parks y Quail 1993). Es decir que tanto el fitocromo A (Casal, 1995) y el criptocromo HY4 media la amplificación de la capacidad de respuesta hacia el fitocromo B en plantas etioladas de *Arabidopsis thaliana* (Fig. 10). La ocurrencia de interconexión entre las cadenas de transducción de diferentes fotorreceptores podría ser un fenómeno común en la regulación de diversas respuestas fotomorfogénicas.

Aún no se conoce la naturaleza molecular de la interacción entre fotorreceptores, pero continuando el presente trabajo se buscarán nuevos mutantes que ayuden a dilucidar qué genes están involucrados en este proceso. El impacto de la co-acción entre fotorreceptores bajo condiciones naturales podría depender de las magnitudes de las acciones independientes e interdependientes de esos fotorreceptores en relación al máximo de respuesta alcanzable.

6 REFERENCIAS

Ahmad M. y Cashmore A. R. (1993) HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of blue-light photoreceptor. Nature 366, 162-166.

Attridge, T. H., Black M., Gaba V. (1984) Photocontrol of hypocotyl elongation in light-grown *Cucumis sativus* L. A synergism between the blue photoreceptor and phytochrome. Planta 162, 422-426.

Ballaré C.L., Casal J.J., Kendrick, R.E. (1991) Responses of light-grown wild-type and long-hypocotyl growth mutant seedlings to natural and simulated shade light. Photochemistry and Photobiology 54, 819-826.

Ballaré C. L., Sánchez R. A., Scopel A., Casal J.J., Ghersa C. M. (1987) EaRLy detection of neighbour plants by phytochrome perception of spectral changes in reflected sunlight. Plant Cell & Environment 10, 551-557.

Botto J., Sánchez R. A., Whitelam G.C. y Casal J.J. (1996) Phytochrome A mediates a promotion of seed germination by very low fluences of light and canopy shade light in *Arabidopsis*. Plant. Physiol. 110, 439-444.

Bowler C. y Chua N. H. (1994) Emerging themes of plant signal transduction. The Plant Cell 6, 1529-1541.

Briggs W. R. (1993) New light on stem growth. Nature 366, 110-111.

Casal J.J. y Smith H. (1989) The function, action and adaptative significance of phytochrome in light-grown plants. Plant Cell & Environment 12, 855-862.

Casal J.J., Sánchez R. A., Di Benedetto A. H., De Miguel L. C. (1991) Light promotion of seed germination is mediated by a highly stable pool of phytochrome. Photochem. Photobiol. 53, 249-254.

Casal J.J. (1994) Stem extension - growth responses to blue light require Pfr in tomato seedlings but are not reduced by the low phytochrome levels of the *aurea* mutant. Physiol. Plant. 91, 263-267.

Casal J.J. y Sánchez R. A. (1994) Impaired stem-growth responses to blue-light irradiance in light-grown transgenic tobacco seedlings overexpressing *Avena* phytochrome A. Physiol. Plant. 91, 268-272.

Casal J.J. (1995) Coupling of phytochrome B to the control of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. Planta 195, 23-29.

Clack T., Mathews S., and Sharrock R.A. (1994) The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. Plant Molecular Biology 25, 413-427.

Condonnier-Pratt M, Pratt L. H., Hauser B., Kochert G. y Kaboche M. (1994) Comparative analysis of the phytochrome gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) and sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). Plant. Physiol. 105, (suppl.) 72.

Dehesh K., Franci C., Parks B.M., Seeley K.A., Short T. W., Tepperman J.M., Quail, P.H. (1993) *Arabidopsis* HY8 locus encodes phytochrome A. *Plant Cell* 5, 1081-1088.

Drumm-Herrel H. y Mhor H. (1984) Mode of coaction of phytochrome and blue light photoreceptor in control of hypocotyl elongation. *Photochem. Photobiol.* 40, 261-266.

Drumm-Herrel H. y Mhor H. (1988) Mode of coaction between UV-A and light absorbed by phytochrome in control of appearance of ribulose- 1,5-biphosphate carboxylase in the shoot of milo (*Sorghum vulgare* Pers.). *Photochem. Photobiol.* 47, 599-604.

Drumm-Herrel H. y Mhor H. (1991) Involvement of phytochrome in light control of stem elongation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *Photochem. Photobiol.* 53, 539-544.

Elich T. y Chory J. (1994) Initial events in phytochrome signalling: still in the dark. *Plant Molec. Biology* 26, 1315-1327.

Fernbach E. y Mhor H. (1990) Co-action of blue/ultraviolet-A light and light absorbed by phytochrome in controlling growth of pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Planta* 180, 212-216.

Johnson E. J., Bradley M., Harberd N., Whitelam G. C. (1994) Photoresponses of light-grown *phyA* mutants of *Arabidopsis*. Phytochrome A is required for the perception of daylength extensions. Plant. Physiol. 105, 141-149.

Kauffman L. S. (1993) Transduction of blue-light signals. Plant Physiol. 66, 207-210.

Kronenberg H. y Kendrick R. E. (1986) The physiology of action. En: Photomorphogenesis in Plants, pags. 99-114, Kendrick y Kronenberg editores, Martinus Nijhoff, Dordrecht, Holanda.

Koornneef M., Rolf E., Spruit C. J. (1980) Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Z. Pflanzenphysiol. 100, 147-160.

Li H., Washburn T. and Chory J. (1993) Regulation of gene expression by light. Opin. Cell Biol. 5, 455-460.

Liscum E., y Hangarter R. P. (1993) Photomorphogenic mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal activities of multiple photosensory systems during light- stimulated apical-hook opening. Planta 191, 214-221.

Liscum E., y Hangarter R. P. (1994) Mutational analysis of blue-light sensing in *Arabidopsis*. Plant Cell Environ. 17, 639-648.

López-Juez E., Buurmeijer W. F., Heeringa G. H., Kendrick R. E., Wesselius J.C. (1990) Response of light-grown wild-type and long-hypocotyl mutant cucumber plants to end-of-day far-red light. Photochem. Photobiol. 52, 143-149.

Manachère (1994) Photomorphogenesis in fungi. En: Photomorphogenesis in Plants, págs 753-781, Kendrick y Kronenberg editores, Publicador Martinus Nijhoff, Dordrecht, Holanda.

Mancinelli A. (1994) The physiology of phytochrome action. En: Photomorphogenesis in Plants, págs 211-265, Kendrick y Kronenberg editores, Martinus Nijhoff, Dordrecht, Holanda.

McCormac A.C., Wagner D., Boylan M. T., Quail P. H., Smith H., Whitelam G.C. (1993) Photoresponses of transgenic *Arabidopsis* seedlings expressing introduced phytochrome B-encoding cDNAs: evidence that phytochrome A and phytochrome B have distinct photoregulatory functions. Plant J. 4, 19-27.

Mohr, H. (1986) Co-action between pigment systems. In: Photomorphogenesis in Plants, págs 547-564, Kendrick y Kronenberg editores, Martinus Nijhoff, Dordrecht, Holanda.

Nagatani A., Chory J., Furuya M. (1991) Phytochrome B is not detectable in the hy3 mutant of *Arabidopsis* which is deficient in responding to end-of-day far-red light treatments. Plant. Cell. Physiol. 32, 1119-1122.

Nagatani A., Reed J. W., Chory J. (1993) Isolation and initial characterization of *Arabidopsis* mutants that are deficient in phytochrome A. Plant. Physiol. 102, 269-277.

Oelmüller y Mohr H. (1985) Specification of blue light on phytochrome-mediated enzime synthesis in the shoot of milo (*Sorghum vulgare* Pers.). Plant Cell & Environment 8, 27-31.

Parks B.M. and Quail P.H. (1993) hy8, a new class of *Arabidopsis* long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. Plant Cell 5, 39-48.

Pratt L. H. (1994) Distribution and localization of phytochrome within the plant. En: Photomorphogenesis in Plants, págs. 163-185 Kendrick y Kronenberg editores, Martinus Nijhoff, Dordrecht, Holanda.

Quail P. (1994) Phytochrome genes and their expression. En: Photomorphogenesis in Plants, págs. 71-103, Kendrick y Kronenberg editores, Martinus Nijhoff, Dordrecht, Holanda.

Reed J. W., Nagpal P. , Poole D. S., Furuya M., Chory J. (1993). Mutations in the gene for the Red/Far Red light photoreceptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. Plant Cell 5, 147 - 157.

Rüdiger W. y Thümmler (1994) The phytochrome chromophore. En: Photomorphogenesis in Plants, págs 51-67, Kendrick y Kronenberg editores, Martinus Nijhoff, Dordrecht, Holanda.

Salisbury F. y Ross C. (1992) Fisiología Vegetal, pags. 487-513. Ed. Iberoamérica, México.

Senger H. y Schmidt W. (1994) Diversity of photoreceptors. En: Photomorphogenesis in Plants, págs 301-325, Kendrick y Kronenberg editores, Martinus Nijhoff, Dordrecht, Holanda.

Sharma R., López-Juez E, Nagatani A., Furuya M. (1993). Identification of photo-inactive phytochrome A in etiolated seedlings and photoactive phytochrome B in green leaves of the *curea* mutant of tomato. Plant J. 4, 1035-1042.

Sharrock R.A. and Quail P.H. (1989) Novel phytocrome sequences in *Arabidopsis thaliana* : structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. Genes Dev. 3, 1745-1757.

Smith H. and Whitelam G.C. (1990) Phytocrome, a family of photoreceptors with multiple physiological roles. Plant, Cell and Environment 13, 695-707.

Smith H. (1994) Sensing the light environment. En: Photomorphogenesis in Plants, págs 377-416, Kendrick y Kronenberg editores, Martinus Nijhoff, Dordrecht, Holanda.

Somers D. E., Sharrock R. A., Tepperman J. M., Quail P. H. (1991) The hy3 long-hypocotyl mutant is deficient in phytochrome B. Plant Cell 3, 1263-1274.

Whitelam G.C. and Smith F. (1991) Retention of phytocrome-mediated shade-avoidance responses in phytocrome-deficient mutants of *Arabidopsis*, cucumber and tomato. J. Plant. Physiol. 139, 119-125.

Whitelam G. C., Johnson E., Peng J., Carol P., Anderson M. L., Cowl J. S., Harberd N. P. (1993) Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell* 5, 757-768.

Whitelam G.C. and Harberd N.P. (1994) Action and function of phytochrome family members revealed through the study of mutant and transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* 17, 615-625.

Yanovsky M., Casal J.J. y Whitelam G.C. (1995) Phytochrome A, Phytochrome B and HY4 are involved in hypocotyl growth responses to natural radiation in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* 8, 788-794.

7 LEYENDAS

FIG. 1: Espectro de absorción de la formas Pr y Pfr de los fitocromos .

FIG. 2: Modelo del sistema del fitocromo.

FIG. 3: Espectro de emisión de la fuente de luz azul utilizada en los tratamientos donde se suministró dicha luz durante 3 horas antes de los pulsos de R o RL .

FIG. 4 Largo del hipocótilo y ángulo entre los cotiledones de plantas WT de *Arabidopsis thaliana* tratadas con pulsos de R o RL en combinación factorial con o sin exposición a 3 horas de luz azul ($9 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), suministrada inmediatamente antes de los pulsos. Un día después de inducida la germinación, las plantas fueron expuestas por 3 días a los tratamientos antes mencionados (ver protocolo en la parte superior de la Fig.). Las flechas indican el largo del hipocótilo y el ángulo entre los cotiledones de plantas crecidas en completa oscuridad (Osc.) (Osc./Osc.). Los datos mostrados son las medias y los errores estándar de 6 réplicas. Se indica la significancia de la influencia entre azul versus oscuridad y R versus RL, (análisis factorial de varianza).

FIG. 5: Largo del hipocótilo y ángulo entre los cotiledones de plantas WT y de los mutantes *phyA*, *phyB* y *hy4* de *Arabidopsis thaliana* tratadas con pulsos de R o RL en combinación factorial con o sin exposición a 3 horas de azul ($9 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), o 3 horas de RL continuo (RLc) ($30 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), suministrados inmediatamente antes de los pulsos. Un día después de inducida la germinación, las plantas fueron expuestas durante 3 días al protocolo indicado en la parte superior de la Fig.. Las barras son las medias de 13 réplicas con sus correspondientes errores estándar. Se calculó para cada uno de los cuatro experimentos el efecto del azul antes de los pulsos de R, la diferencia entre R/RL después del tratamiento con azul y la diferencia entre R y RL después de 3 horas

de R. Se indican los efectos promedios y errores estándar entre paréntesis, cerca de las flechas importantes.

FIG. 6: Composición espectral de las fuentes utilizadas para los tratamientos de 3 horas de RLC (izquierda) y RLC + azul (derecha).

FIG. 7: Largo del hipocótilo y ángulo entre los cotiledones de plantas WT y los mutantes *phyA*, *phyB* y *hy4* de *Arabidopsis thaliana* tratados con 3 horas de RLC ($30 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), o RLC + azul (total = $40 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, azul: $10 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), en combinación factorial con un pulso de RL, seguido por 20.8 horas de oscuridad, o 21 ciclos de 3 minutos de RL + 57 minutos de oscuridad, o 21 horas de RLC ($30 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Un día después de inducirse la germinación las plantas fueron expuestas por 3 días a los tratamientos indicados en la parte superior de la Fig.. Las barras indican las medias y los errores estándar de 12 réplicas (obtenidas de 6 experimentos).

FIG. 8: Espectro de las fuentes utilizadas para los tratamientos con luz naranja (izquierda) y luz naranja más azul (derecha).

FIG. 9: Largo del hipocótilo y ángulo entre los cotiledones de plantas WT y de los mutantes *phyA*, *phyB* y *hy4* de *Arabidopsis thaliana* tratados diariamente con 3 horas de luz naranja ($100 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), luz naranja más azul (total = $150 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $50 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de azul) y naranja + naranja (total = $150 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Un día después de inducirse la germinación las plántulas fueron expuestas al protocolo indicado arriba. Los datos son medias y errores estándar de 13 réplicas obtenidas de 5 experimentos. Al lado de las flechas se indica el efecto de complementar la luz naranja con luz azul con respecto al tratamiento con luz naranja sola, junto con el promedio y errores estándar de 5 experimentos.

FIG. 10: Modelo de las acciones de fitocromo A (PHYA), fitocromo B (PHYB) y HY4 sobre el alargamiento del hipocótilo en plantas etioladas de *Arabidopsis*.

FIGURA 1

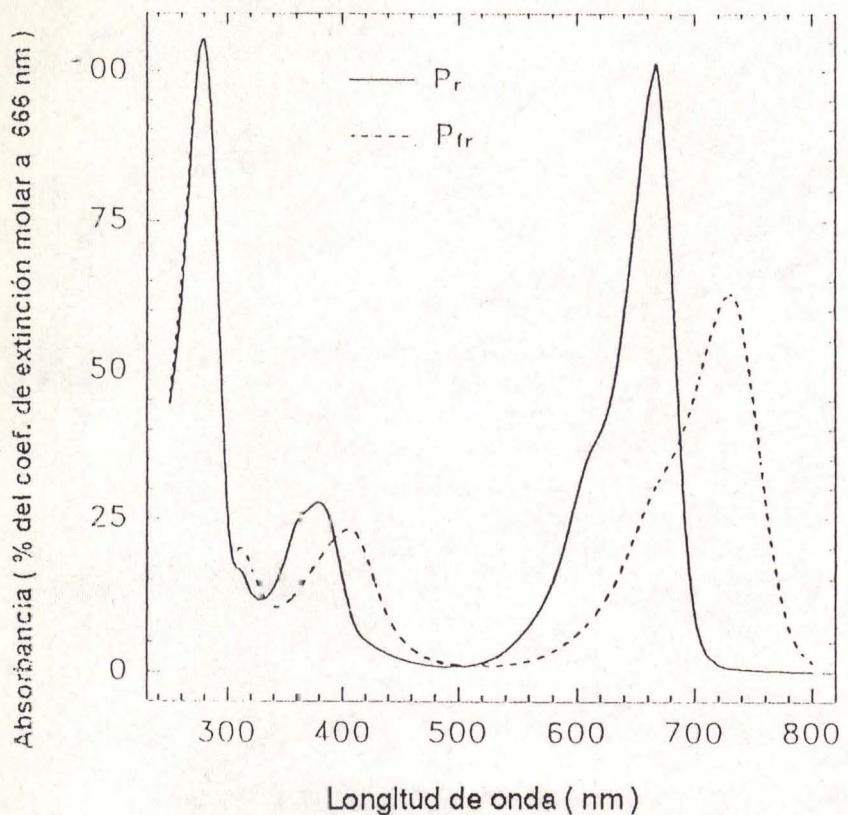


FIGURA 2

Síntesis

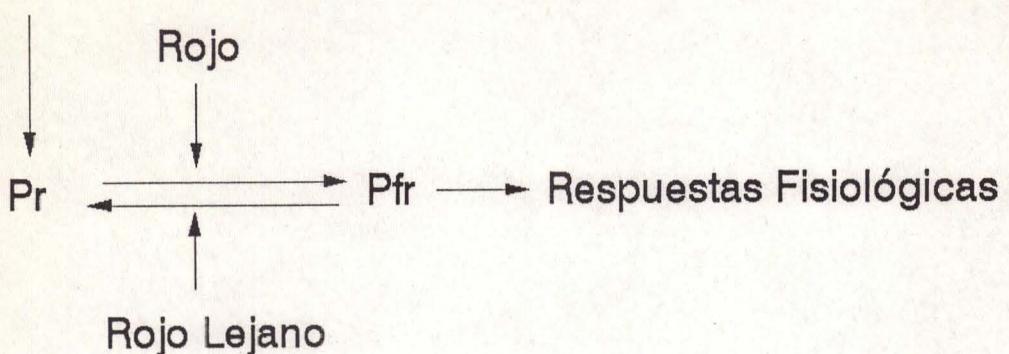


FIGURA 3

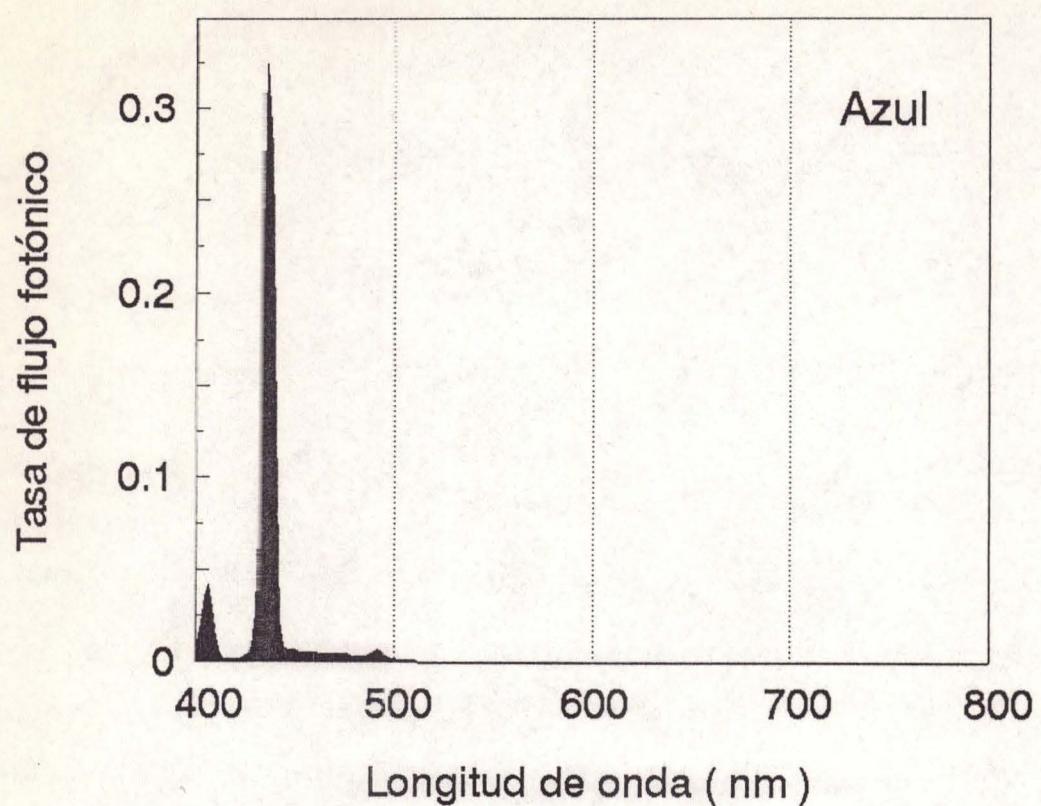


FIGURA 4

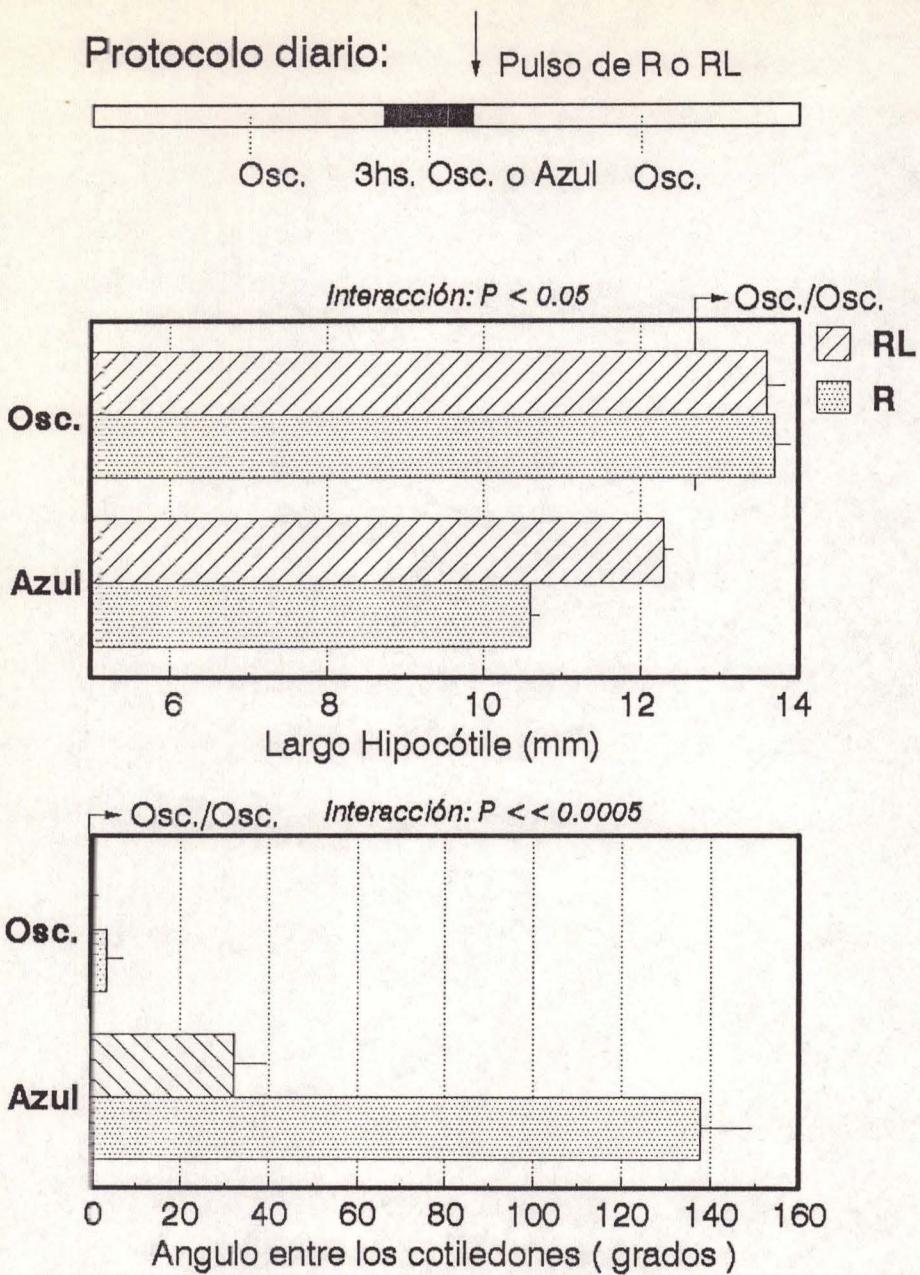


FIGURA 5

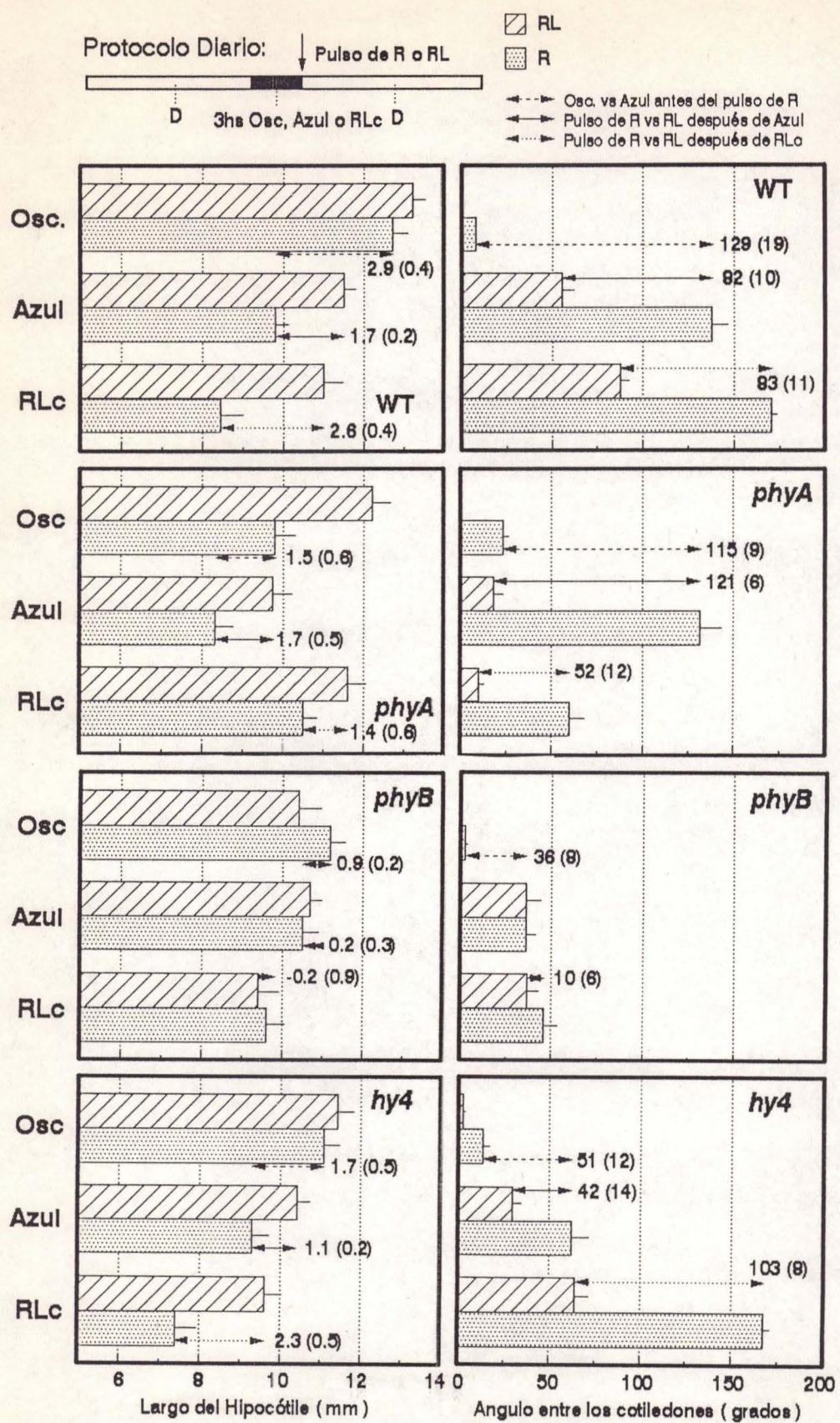


FIGURA 6

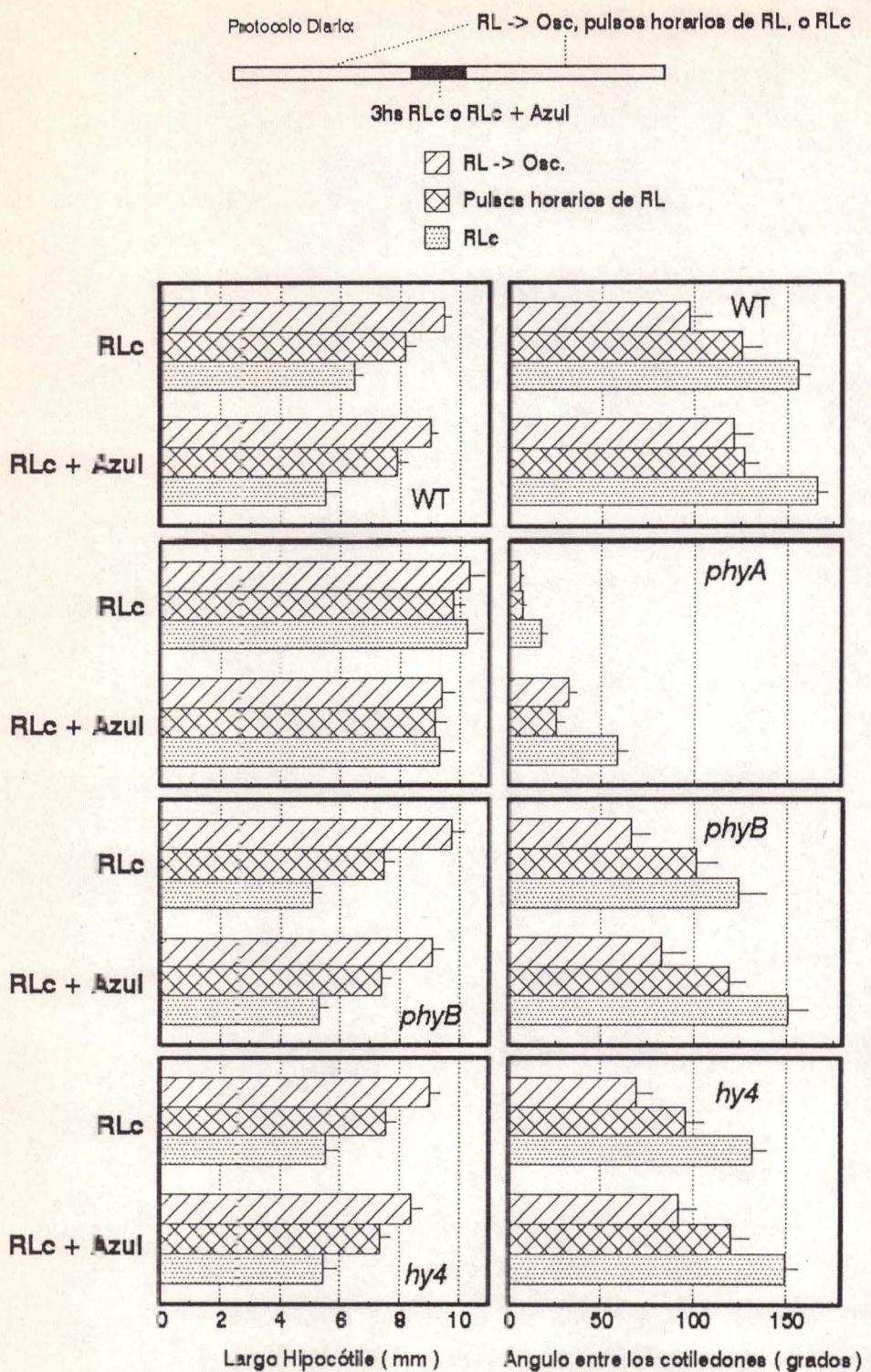


FIGURA 7

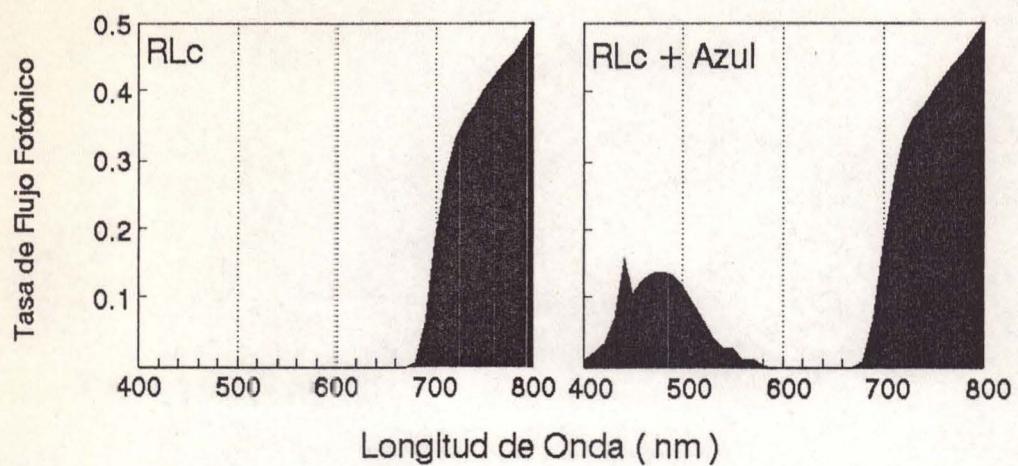


FIGURA 8

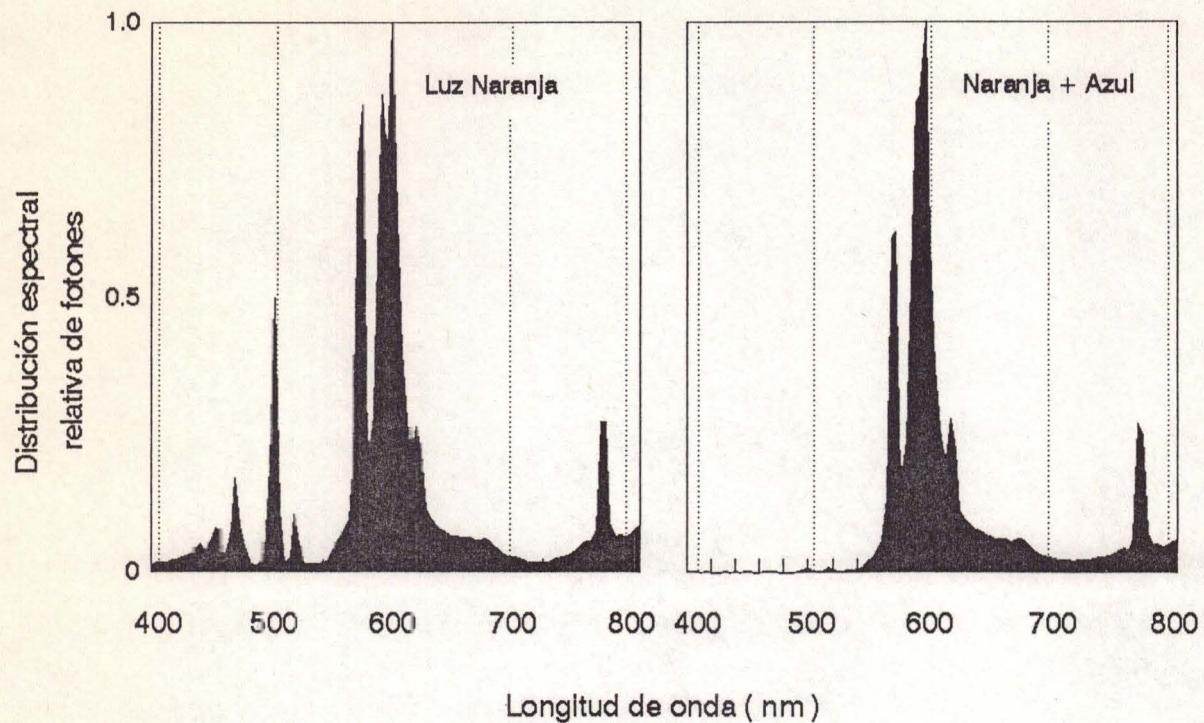


FIGURA 9

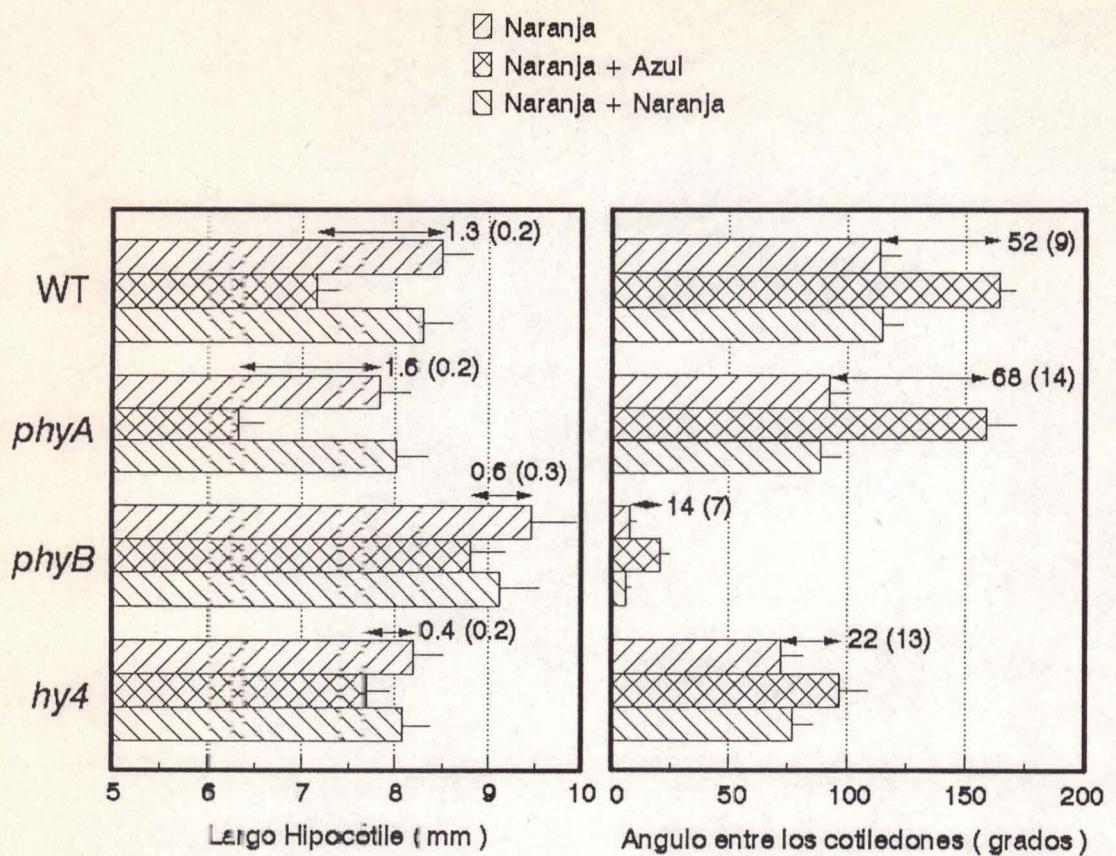


FIGURA 10

