

Tesis de Posgrado

Interacción entre fitocromos y criptocromos en el control del crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana*

Mazzella, María Agustina

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Mazzella, María Agustina. (2001). Interacción entre fitocromos y criptocromos en el control del crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3342_Mazzella.pdf

Cita tipo Chicago:

Mazzella, María Agustina. "Interacción entre fitocromos y criptocromos en el control del crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3342_Mazzella.pdf

**Interacción entre fitocromos y criptocromos en el control del crecimiento
y desarrollo de *Arabidopsis thaliana***



WT *phyA phyB*
cry1 cry2

María Agustina Mazzella

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Interacción entre fitocromos y criptocromos en el control del
crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana***

Tesis presentada para optar al grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Lic. María Agustina Mazzella

Director: Jorge José Casal

Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas Vinculadas a la Agricultura
(IFEVA)

Facultad de Agronomía

Universidad de Buenos Aires

2001

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge J. Casal, por su excelencia como director, y lo más importante, como persona. Por su extraordinaria conducción, dedicación, ánimo, buen humor, y excelentísimo trato con todo su equipo.

A Mamá, por darme su apoyo incondicional en todo momento.

Al director del IFEVA, Dr. Rodolfo Sánchez, por darme la aceptación para trabajar en este instituto, y por su gran predisposición de responder a todas mis consultas.

AL CONICET por el financiamiento que me permitió la iniciación de la investigación científica.

A Nacho y Felipe, por estar todos los días al lado mío, por el esfuerzo que hicieron ambos para que pudiera terminar.

Al grupo de fotomorfogénesis, con el cual compartí 8 años, por su compañerismo y por lograr y mantener un excelente clima de trabajo: Marcelo Yanovsky, Majo Burgin, Hernán Boccalandro, Teresa Alconada, Karina Oliviero, Laura Luccioni y Matias Quinn.

A Toda la gente del Ifeva especialmente: Javier Botto, Carlos Mazza, Laura Yadhjian, Gustavo Marino, Miriam Izaguirre, Carla Giordano, Mariela Schwarcborg, Alejandra Mella.

A la gente de Campomar, por guiarme en mis primeras incursiones en la Biología Molecular y su buena onda y predisposición. Al Dr. Roberto Staneloni, Pablo Cerdán, Mati Bunge, Carolina Reymundo, Vanesa Castillo y Jimena Ortega.

A mis grandes amigos que me han acompañado todos estos años: Chilly, Cari, Sil, Vicky, Richota y Sole.

A Pedro Gundel por su valiosa ayuda técnica.

ÍNDICE

Resumen	6
Abreviaturas	8

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA LUZ COMO FACTOR ECOLOGICO	10
1.1.1 Señales lumínicas del ambiente	11
1.1.2 Regulación del crecimiento y desarrollo por las señales lumínicas	13
1.1.2.1 Germinación	13
1.1.2.2 Etiolación y des-etiolación	14
1.1.2.3 Modulación de la competitividad con plantas vecinas	14
1.1.2.4 Iniciación floral	15
1.2 PERCEPCIÓN DE LAS SEÑALES LUMÍNICAS	15
1.2.1 Fitocromos	16
1.2.1.1 Estructura y propiedades fotobiológicas de los fitocromos	16
1.2.1.2 Los fitocromos son una familia de fotorreceptores	20
1.2.1.3 Caminos de señalización y componentes de la cadena de transducción de los fitocromos	24
1.2.2 Receptores de luz azul	26
1.2.2.1 Criptocromos	27
1.2.2.2 Fototropina	28
1.2.3 Receptores de luz UV-B	28
1.3 INTERACCION ENTRE FOTORRECEPTORES	29
1.4 OBJETIVOS	32

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1	Material Vegetal. Obtención de los mutantes múltiples	34
2.2	Identificación de los alelos mutantes por PCR	35
2.3	Condiciones experimentales	35
2.4	Tratamientos y características de las fuentes de luz	36
2.5	Mediciones y estadísticas	37

3. RESULTADOS

3.1	INTERACCIÓN ENTRE EL PHYA Y EL PHYB BAJO LUZ ROJA CONTINUA	39
3.2	DESARROLLO VEGETATIVO Y REPRODUCTIVO EN <i>ARABIDOPSIS</i> <i>THALIANA</i> CON O SIN PHYA, PHYB, CRY1 Y CRY2	45
3.2.1	CONTROL DE LA ELONGACIÓN DE LOS ENTRENUDOS BASALES EN <i>ARABIDOPSIS</i> POR EL PHYB Y CRY1.	54
3.3	INTERACCIONES ENTRE PHYA, PHYB, CRY1 Y CRY2 EN CONDICIONES DE RADIACIÓN NATURAL	60

4. DISCUSIÓN

4.1	El phyA media las respuestas a muy bajos flujos de luz R continua.	70
4.2	Patrones de interacción entre fitocromos y criptocromos	73
4.2.1	Des-etiolación	73
4.2.2	Desarrollo vegetativo	75
4.2.3	Iniciación Floral	77
4.3	El patrón de interacciones depende del estado ontogénico, luz y la temperatura.	78
4.4	Mecanismos moleculares de las interacciones	80

4.5	Significado ecológico de las interacciones	81
4.6	Conclusiones	84
5.	BIBLIOGRAFÍA	86

RESUMEN

La luz provee a las plantas la energía necesaria para la fotosíntesis e información sobre el ambiente. Las señales lumínicas son percibidas por fotorreceptores específicos. En *Arabidopsis thaliana* se identificaron y clonaron tres grupos de fotorreceptores: los fitocromos que son fotorreceptores de luz roja (R) y roja lejana (RL), que son codificados por cinco genes (*PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD*, *PHYE*); los criptocromos que son fotorreceptores de luz azul, codificados por dos genes (*CRY1* y *CRY2*) y las fototropinas. Los fitocromos y criptocromos tienen funciones independientes y coordinadas que regulan el desarrollo de las plantas durante todo el ciclo de vida.

El objetivo de esta tesis es estudiar la interacción entre fitocromos (específicamente *phyA* y *phyB*) y criptocromos (*cry1* y *cry2*) en distintas respuestas durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. Para cumplir este objetivo hemos obtenido los dobles, triples y cuádruple mutantes a partir de los simples mutantes de *phyA*, *phyB*, *cry1* y *cry2* para analizar el efecto de un fotorreceptor en ausencia/presencia de los demás fotorreceptores.

El uso de los simples, dobles, triples, y cuádruple mutantes permitió revelar nuevas interacciones entre los fotorreceptores e identificar funciones no conocidas de los mismos. En plántulas etioladas expuestas a luz R, el *phyA* mostró un efecto dual. Cuando el *phyA* fue activado con bajos flujos de luz R produjo por un lado la inhibición del alargamiento del hipocotilo, y por otro lado, redujo la inhibición del alargamiento del hipocotilo mediado por el *phyB*, es decir que el *phyA* interactuó antagonísticamente con el *phyB*. En nuestras condiciones, el *phyA* retrasó la transición del estado vegetativo al reproductivo, sólo en determinados contextos genéticos: *cry1*, *cry2* y *cry1 cry2*, poniendo en evidencia un nuevo rol del *phyA* en el control de la floración. El *phyB* y el *cry1* fueron redundantes en la represión del alargamiento del entrenudo, y la ausencia de ambos permitió demostrar que el alargamiento del tallo no está obligadamente acoplado al desarrollo reproductivo. La redundancia entre *phyB* y *cry1*, sin embargo, fue condicional a la temperatura. En la inhibición del alargamiento del hipocotilo, el *phyB* y el *cry1* interactuaron sinérgicamente. La interacción del *phyB* y el *cry1* en ésta respuesta fue condicional al ambiente lumínico. En la mayoría de las respuestas el *cry2* fue redundante con el *cry1*. La interacción del *cry2* con *phyA* y *phyB* en las distintas respuestas durante el desarrollo puede dividirse en dos patrones, en el primero la actividad del *cry2* requirió la presencia de *phyA* y *phyB* (efecto sinérgico), y en el segundo requirió la ausencia de *phyA* y *phyB* (efecto redundante). El análisis del comportamiento del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* mostró que la deficiencia en la percepción de luz durante el desarrollo no está restringida sólo a la des-etiolación sino que continúa incluso hasta al estadio adulto. Basados en los datos de esta tesis y de la literatura presentamos un modelo de los patrones de interacción para dos procesos: des-etiolación y floración.

Las interacciones observadas en condiciones de radiación natural entre los fotorreceptores reflejan aquellas observadas en condiciones controladas. La compleja red de interacciones entre fitocromos y criptocromos en condiciones de radiación natural generó homeostasis en la des-etiolación contra los cambios en irradiancia y fotoperíodo que no forman parte de la señales relacionadas con la posición del vástago por debajo o por encima de la superficie del suelo.

El *phyA*, *phyB*, *cry1* y *cry2*, se acoplan con diferentes jerarquías durante el desarrollo de *Arabidopsis*. La dependencia o redundancia entre las vías es afectada por las condiciones ambientales, el estado ontogénico y el contexto genético. La redundancia entre los fotorreceptores en el control de los procesos del desarrollo genera estabilidad del fenotipo que evita caer en patrones aberrantes, mientras que las jerarquías entre los fotorreceptores permite un patrón específico de crecimiento y desarrollo bajo señales lumínicas particulares.

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*, Criptocromo, Desarrollo, Estabilidad, Fitocromo, Homeostasis, Interacciones, Luz.

SUMMARY

Light provides plants not only the energy necessary for photosynthesis but also information about the environment. Light signals are perceived by specific photoreceptors. In *Arabidopsis thaliana* three groups of photoreceptors have been identified and cloned: phytochromes, that are red - far-red light photoreceptors encoded by five genes (*PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* and *PHYE*); cryptochromes, that are blue light photoreceptors encoded by two genes (*CRY1* and *CRY2*); and phototropin. Phytochromes and cryptochromes have independent and coordinated functions that control plant development throughout all the life cycle.

The aim of this thesis is to study the interactions between phytochromes (specifically *phyA* and *phyB*) and cryptochromes (*cry1* and *cry2*) in the control of *Arabidopsis thaliana* development. For this propose we have obtained all the double, triple and quadruple mutant combinations of the *phyA*, *phyB*, *cry1* and *cry2* mutants to analyze the effect of one photoreceptor in the presence/ absence of other(s).

The use of single, double, triple and quadruple mutants revealed novel interactions among photoreceptors and identified unknown photoreceptor functions. In etiolated seedlings exposed to continuous red light, *phyA* showed a dual effect. On one hand *phyA* inhibited hypocotyl growth, and on the other, it reduced hypocotyl growth inhibition mediated by *phyB*. Thus, *phyA* interacted antagonistically with *phyB*. Also under white light photoperiods, *phyA* delayed the transition from the vegetative to the reproductive stage only in specific genetic backgrounds: *cry1*, *cry2* and *cry1 cry2*, evidencing a novel roll of *phyA* in the control of flowering. *phyB* and *cry1* were redundant on internode growth repression, and the absence of both photoreceptors demonstrated that stem growth is not inevitably linked to the reproductive developmental program. In hypocotyl growth inhibition responses, *phyB* and *cry1* interacted synergistically, and this interaction was light conditional. In most of the responses studied here, *cry2* was redundant with *cry1*. The interaction of *cry2* with *phyA* and *phyB* in different developmental responses followed two patterns, one in which *cry2* activity required the presence of *phyA* and *phyB* (synergistic effect), and the other in which *cry2* required the absence of *phyA* and *phyB* (redundant effects). The behavior of the *phyA phyB cry1 cry2* quadruple mutant indicates that deficiencies in light perception are not restricted to de-etiolation, and continue during the adult stage. Based on our results and complementary literature we propose a genetic model of photoreceptor interactions for two processes: de-etiolation and flowering.

The interactions observed under natural radiation were compatible with those observed under laboratory conditions. The complex network of interaction between phytochromes and cryptochromes under natural radiation generated de-etiolation homeostasis against the changes in irradiance and photoperiod not associated to the position of the shoot above or below soil level.

phyA, *phyB*, *cry1* and *cry2* are coupled to *Arabidopsis* development with different hierarchies. Dependency or redundancy between pathways is affected by environmental conditions, ontogeny, and genetic context. Redundancy among photoreceptors in the control of developmental processes generates stability of phenotype that prevents aberrant patterns, while different hierarchies among photoreceptors allow a specific pattern of growth and development under specific light conditions.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, cryptochromes, Development, Homeostasis, Interactions, Light, Phytochromes, Stability.

ABREVIATURAS

<i>CRY 1-2</i>	genes que codifican para los criptocromos 1 y 2
<i>cry 1-2</i>	mutante de criptocromo 1 y 2
<i>cry1 1-2</i>	criptocromos (apoproteína+ cromóforo)
E.E	error estándar
HIR	respuestas a altas irradiancias de rojo lejano continuo
LFR	respuestas a flujos moderados de luz roja
<i>PHY (A-E)</i>	genes que codifican para los fitocromos A-E
<i>phy A-E</i>	mutantes de fitocromo A, B, C, D, o E
phy A-E	fitocromos A, B, C, D, o E (apoproteína+ cromóforo)
Pfr	forma activa del fitocromo, $\lambda_{\text{máx}}= 730 \text{ nm}$
Pr	forma inactiva del fitocromo, $\lambda_{\text{máx}}= 660 \text{ nm}$
P	fitocromo total (Pr+Pfr)
Pfr/P	proporción del fitocromo total que se encuentra en la forma activa
R	luz roja
Rc	luz roja continua
Rp	pulso de luz roja
RL	luz roja lejana
RLc	luz roja lejana continua
RLp	pulso de luz roja lejana
R/RL	proporción de luz roja a luz roja lejana
VLFR	respuestas a muy bajos flujos de luz
WT	genotipo salvaje

Los resultados de esta tesis han sido parcial o totalmente publicados en los siguientes trabajos.

Mazzella M.A., Alconada, T M, Casal, J.J. (1997). Dual effect of phytochrome A on hypocotyl growth under continuous red light. *Plant, Cell and Environment* 20, 261-267.

Mazzella MA, Bertero D, Casal JJ. (2000). Temperature-dependent internode elongation in vegetative plants of *Arabidopsis thaliana* lacking phytochrome B and cryptochrome 1. *Planta*. 210, 497-501.

Mazzella MA, Casal JJ. (2001). Interacting signalling by phytochromes and cryptochromes generates de-etiolation homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, 24, 155-163.

Casal JJ, **Mazzella MA.** 1998. Conditional synergism between cryptochrome1 and phytochrome B is shown by the analysis of *phyA*, *phyB* and *hy4* simple, double and triple mutants in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 118, 19-25

Mazzella MA, Cerdán P, Satneloni R, Casal JJ. 2001. Hierarchical coupling of phytochromes and cryptochromes reconciles stability and light modulation of *Arabidopsis* development. *Development*, en prensa.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las plantas son organismos sésiles, es decir que no pueden trasladarse cuando las condiciones son desfavorables y ésta característica refleja el modo en que responden a los cambios ambientales. Así, cambios en la fisiología de las plantas proveen de respuestas a corto plazo frente a alteraciones en el ambiente; y la integración de respuestas fisiológicas moldea el desarrollo que permiten el ajuste a largo plazo a las variables ambientales. El desarrollo de la morfología dependiente de la luz por parte de las plantas es llamado **fotomorfogénesis**, y es controlado por la acción combinada de los sistemas de fotorreceptores.

1.1 LA LUZ COMO FACTOR ECOLÓGICO

La luz es uno de los factores ambientales más complejos y variables al cual están expuestas las plantas en crecimiento. No solamente representa una fuente de energía necesaria para la fotosíntesis, sino que también provee información de valor ecológico crucial que las plantas utilizan para optimizar su crecimiento y desarrollo. Si bien las plantas superiores utilizan efectivamente la luz visible para la fotosíntesis, responden a un rango más amplio del espectro, que incluye la radiación ultravioleta (UV) y la rojo lejana (RL). La Fig. 1.1 muestra la efectividad de distintas bandas espectrales para inhibir el alargamiento del hipocotilo y producir la apertura de los cotiledones en plántulas de *Arabidopsis* comparadas a aquellas cultivadas en oscuridad. Esto sugiere que las plántulas son capaces de percibir señales lumínicas y utilizarlas para controlar su morfogénesis.

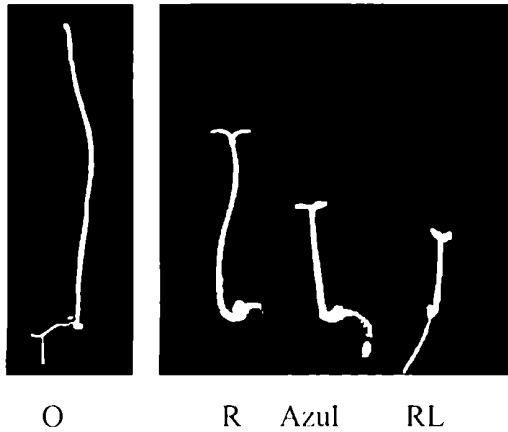


Figura 1.1. Patrones de crecimiento fotomorfológico en plántulas de *Arabidopsis* cultivadas en distintas condiciones lumínicas. Las plántulas que crecen en oscuridad (O) se caracterizan por poseer el hipocotilo largo y los cotiledones cerrados. La exposición a la luz continua roja (R), roja lejana (RL) o azul cambia el patrón de crecimiento de la plántula, que se caracteriza por la inhibición del alargamiento del hipocotilo y la apertura de los cotiledones.

1.1.1 Señales lumínicas del ambiente

La duración (fotoperíodo), dirección, intensidad (cantidad de fotones), y composición espectral de la luz, proveen de información acerca del ambiente luminoso. El primer cambio en el ambiente luminoso percibido por la plántula es la transición de oscuridad (por debajo de la superficie del suelo), a la luz cuando ésta emerge. Por arriba de la superficie del suelo, las plántulas sienten la dirección de la luz y dirigen su crecimiento hacia la misma (fototropismo). Cambios en la intensidad de luz recibidos producen cambios adaptativos en la capacidad fotosintética. La percepción de la duración de la luz (o de la oscuridad) se llama fotoperiodismo y los cambios que se producen en el fotoperíodo a lo largo de un año proveen información inequívoca de la progresión de las estaciones climáticas. El cambio en la composición espectral del ambiente luminoso es usado por las plantas para detectar la proximidad de plantas vecinas y regular varios aspectos del desarrollo (Fig. 1.2). Los pigmentos fotosintéticos absorben principalmente la luz roja (R) y azul, y reflejan y transmiten más eficientemente la luz RL y verde (Smith, 1982). Como consecuencia, en el caso de plantas que crecen completamente aisladas de plantas vecinas la relación de luz rojo/ rojo lejana (R/RL) es alta. En cambio, el aumento en el número y/o tamaño de plantas vecinas producen la disminución en la relación R/RL. En etapas tempranas del crecimiento de un canopeo, cuando el índice de área foliar es pequeño y no existe sombreado mutuo entre plantas vecinas, hay una disminución de la

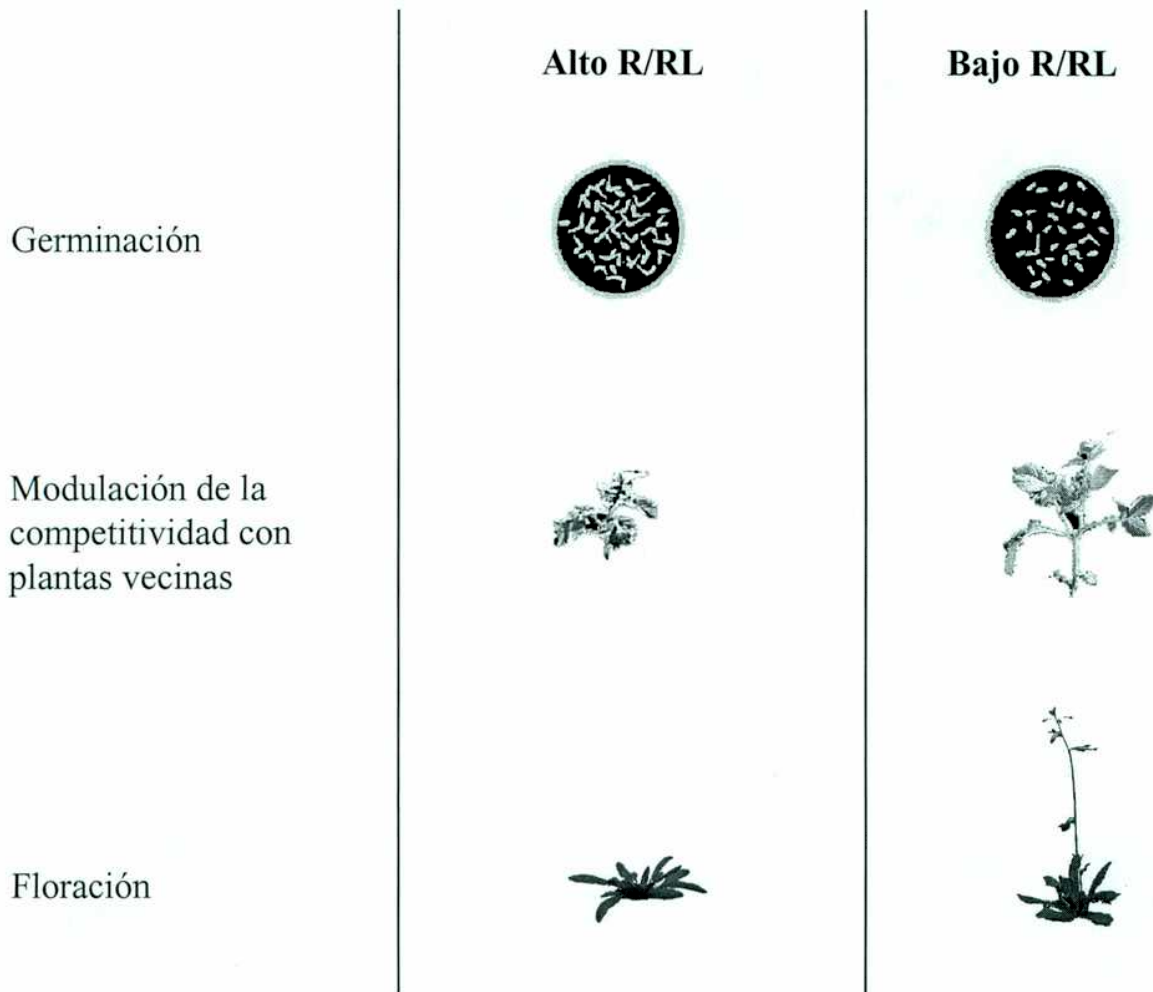


Figura 1.2. Procesos del desarrollo afectados por la relación R/RL percibida por el fitocromo. La disminución de la relación R/RL, como consecuencia de la presencia de plantas vecinas, producen la inhibición de la germinación en las semillas, el alargamiento del tallo y aumento de la dominancia apical, y la inducción de la iniciación de la floración en plantas adultas. Estos mecanismos favorecerían la germinación en lugares libres de canopeos densos que representarían futuros competidores, la posibilidad de llegar a estratos más altos de la vegetación donde el recurso luz está disponible y la reproducción aún en condiciones desfavorables.

relación R/RL de la luz propagada horizontalmente afectando principalmente el ambiente luminoso de los tallos (Ballaré *et al.*, 1987; Ballaré *et al.*, 1990). Así, la radiación RL reflejada por las hojas vecinas funcionaría como una señal temprana de competencia durante el desarrollo de un canopeo (Ballaré *et al.*, 1987; Ballaré *et al.*, 1990). Cuando el canopeo se hace más denso el sombreado mutuo entre plantas se hace más importante y disminuye drásticamente la intensidad de luz R y azul y en menor medida la de RL, causando la caída de la relación R/RL de la luz propagada verticalmente que afecta el ambiente luminoso de las hojas (Ballaré *et al.*, 1987; Casal y Smith, 1989).

Los procesos del desarrollo en los cuales las señales lumínicas son ecológicamente relevantes incluyen la germinación, la des-etiolación, la modulación de la competitividad con plantas vecinas, y la iniciación de la floración.

1.1.2 Regulación del crecimiento y desarrollo por las señales lumínicas

1.1.2.1 Germinación

El tiempo y el lugar donde una semilla comenzará a desarrollarse son críticos para la supervivencia de la plántula. Así, las semillas tienen la capacidad de sentir el ambiente lumínico que las rodea y evaluar las condiciones más favorables para su posterior establecimiento. Varias especies producen semillas que, dependiendo de las condiciones ambientales, requieren ser expuestas a la luz para la inducción de la germinación (Casal y Sánchez, 1998). Este proceso puede ser desencadenado aún por breves transiciones de la oscuridad a la luz experimentadas por las semillas bajo tierra expuestas a frecuentes remociones en el suelo (Scopel *et al.*, 1991).

La germinación de semillas de varias especies está afectada fuertemente por la calidad de luz. Bajas relaciones R/RL inhiben la germinación, evitando condiciones de luz desfavorables para el futuro crecimiento de la plántula, mientras que altas relaciones R/RL promueven la germinación, permitiendo así detectar claros de vegetación donde las condiciones son más favorables (Fig. 1.2).

1.1.2.2 Etiolación y Des-etiolación

El pasaje de completa oscuridad a ciclos de luz/oscuridad es la señal lumínica que desencadena el proceso de des-etiolación. En oscuridad, (por debajo del suelo), las plántulas siguen un patrón de crecimiento y desarrollo caracterizado por la etiolación, en el que se favorece el alargamiento del hipocotilo y se reprime el desarrollo de las hojas (Fig. 1.1 (O)). La etiolación incrementa así la probabilidad que las hojas sean elevadas por sobre la superficie del suelo y alcancen la fotoautotrofia antes que se agoten las reservas en la semilla. Una vez que la plántula alcanza la superficie, se produce un profundo cambio en el desarrollo llamado des-etiolación (Fig. 1.1). La des-etiolación involucra una serie de cambios morfológicos como la inhibición en el crecimiento del hipocotilo, la estimulación del desarrollo de las hojas, la formación de la maquinaria fotosintética y la inducción de la expresión de algunos genes como *LHCP* y *RBCS*. La existencia de mutantes en *Arabidopsis thaliana* que muestran un fenotipo des-etiolado cuando son cultivadas en completa oscuridad ha demostrado que la etiolación es un proceso en el cual el patrón de desarrollo normal está reprimido (Chory *et al.*, 1989; Deng *et al.*, 1991)

1.1.2.3 Modulación de la Competitividad con plantas vecinas

A medida que aumenta la densidad de plantas, la luz se encuentra menos disponible. La adaptación de las plantas al sombreado por plantas vecinas puede seguir dos estrategias. Las plantas tolerantes a la sombra se caracterizan por conservar la energía y los recursos con bajas tasas de crecimiento, y por el desarrollo de estructuras fotosintéticas muy eficientes con bajos niveles de luz. La estrategia opuesta, es la de evasión al sombreado, en la que bajas relaciones R/RL como consecuencia de la presencia de plantas vecinas, produce el rápido aumento en la extensión del tallo permitiendo así proyectar las estructuras fotosintéticas hacia aquellas partes del ambiente en el que el recurso luz está disponible, y se reduce el número de ramificaciones (Fig. 1.2). En varias especies estudiadas, como tabaco, mostaza y girasol, el incremento en la longitud del tallo está acompañado por una

redistribución de los fotoasimilados, produciéndose una mayor acumulación de materia seca en el mismo (Kasperbauer *et al.*, 1971, Holmes, 1977; Casal y Sánchez, 1992, Mazzella, 1995) incluyendo hidratos de carbono (Casal, *et al.*, 1995; Mazzella, 1995). En algunas monocotiledóneas, las bajas relaciones R/RL reducen el macollaje (Casal *et al.*, 1995).

1.1.2.4 Iniciación floral

Muchas plantas son sensibles a los cambios en las estaciones climáticas, y producen las estructuras reproductivas en un determinado momento del año cuando los días son largos o cortos, según la especie. El fotoperíodo es el factor ambiental más importante que afecta el tiempo de floración. De esta manera, las plantas pueden sincronizar la floración a la estación climática más conveniente y favorecer además la fecundación cruzada. La calidad de luz también puede afectar el proceso de iniciación floral. En algunas especies, las plantas cultivadas bajo luz con una baja relación R/RL florecen más temprano que aquellas cultivadas con una alta relación R/RL (Halliday *et al.*, 1994) (Fig. 1.2).

1.2 PERCEPCION DE LAS SEÑALES LUMÍNICAS

La relación entre las plantas y la percepción del ambiente lumínico es más que una serie de piezas de rompecabezas por ser develada por los investigadores: para la planta puede ser una cuestión de sobrevivir o morir.

Las plantas poseen mecanismos altamente sofisticados para detectar la calidad y cantidad de luz y adaptar sus patrones de crecimiento a las condiciones prevalentes del ambiente. Este proceso requiere la existencia de pigmentos (**fotorreceptores**) capaces de absorber luz y proveer la primera señal bioquímica que culmina con la respuesta fisiológica. Hasta el momento se han identificado tres grupos de fotorreceptores en plantas: los fitocromos, que perciben la luz R y RL, los fotorreceptores de luz azul y ultravioleta-A (UV-A), y los fotorreceptores de luz ultravioleta-B (UV-B).

1.2.1 Fitocromos

La región más efectiva del espectro para muchas respuestas es la luz R de 660 nm, y este efecto del R puede ser cancelado por la irradiación subsecuente de luz RL de 730 nm. En la década del 50 se caracterizó al fitocromo como el pigmento involucrado en el fotocontrol de la germinación de semillas de lechuga (Borthwick *et al.*, 1952). La luz R inducía la germinación de las semillas que podía ser inhibida por un pulso subsecuente de luz RL. Si las semillas eran expuestas a ciclos secuenciales de R y RL, la respuesta final estaba determinada (dentro de cierto límite de tiempo) por el último tratamiento de luz recibido, independientemente de los tratamientos previos. La conclusión fue que la respuesta estaba mediada por un único regulador, llamado **fitocromo**, que se activaría con R y se inactivaría con exposiciones a RL.

1.2.1.1 Estructura y propiedades fotobiológicas de los fitocromos

Los fitocromos son cromoproteínas solubles, que contienen aproximadamente 1100 aminoácidos. Normalmente están formando dímeros, y el peso molecular de cada monómero está en el rango de 120-127 kDa (Thomas, 1991). La comparación de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas indican un alto grado de conservación de las secuencias y estructura de los fitocromos en plantas superiores.

Cada monómero de la apoproteína del fitocromo está unido a un cromóforo que es un tetrapirrol de cadena abierta llamado fitocromobilina (Quail, 1991). El cromóforo se une a un residuo de cisteína ubicado en una región altamente conservada de la apoproteína a través de un enlace tioéter. Esta unión es un proceso autocatalítico (Lagarias y Lagarias, 1989).

Los fitocromos se encuentran en dos formas interconvertibles, Pr con un máximo de absorción en la región del R de 660 nm; y otra llamada Pfr con un máximo de absorción en el RL de 730 nm (Fig. 1.3A). Las diferencias espectrales entre Pr y Pfr se deben, en parte, a

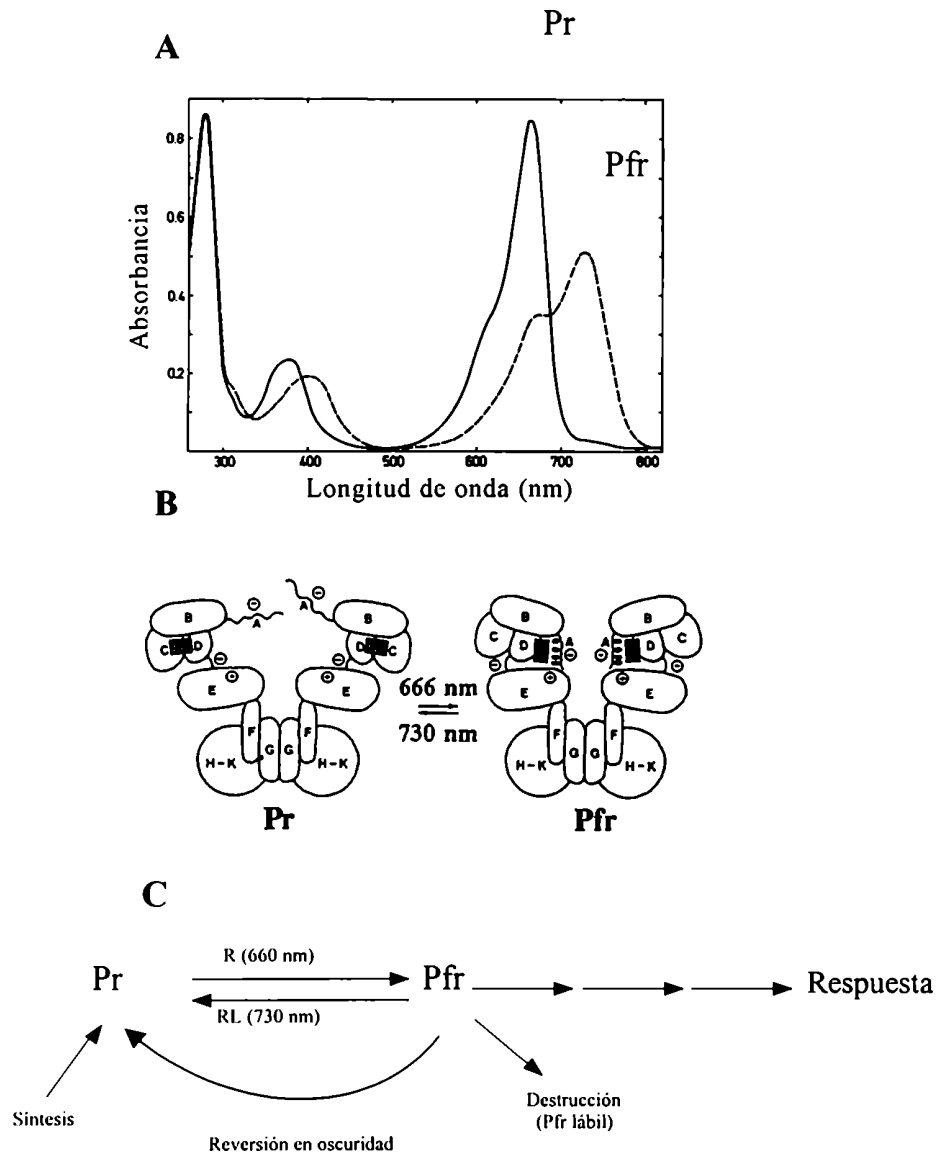


Figura 1. 3. Propiedades fotobiológicas de los fitocromos. A) Espectro de absorción del fitocromo. La forma Pr tiene su pico de máxima absorción en los 660 nm, mientras que la forma Pfr en los 730 nm. B) La conversión de Pr a Pfr produce cambios estructurales en el cromóforo que son traducidos en cambios conformacionales de la proteína. C) Diagrama de la fototransformación reversible del fitocromo. El fitocromo es sintetizado como Pr, el cual se fototransforma a Pfr, forma fisiológicamente activa del fitocromo. El Pfr puede destruirse por la vía de la degradación proteolítica o también revertir a la forma Pr.

diferencias estructurales del cromóforo (isómero 15E y 15Z, respectivamente). Los cambios producidos en la configuración del cromóforo, producen cambios conformacionales en la apoproteína que a su vez, interacciona con componente(s) de la célula (Fig. 1.3B). El fitocromo es sintetizado en la forma Pr, es decir que en plántulas etioladas el 100 % del fitocromo se encuentra en esta forma. La luz R convierte la forma Pr a la forma Pfr, y como la fototransformación es fotoreversible, la luz RL convierte la forma Pfr en Pr (Fig. 1.3C). Los espectros de absorción de ambas formas se superponen (Fig. 1.3A). Por esta razón cuando se realizan irradiaciones con luz monocromática se establece un fotoequilibrio dinámico entre la forma Pr y Pfr. La proporción de Pfr respecto de la cantidad total de fitocromo (Pfr/P) depende de la composición espectral del tratamiento lumínico (Mancinelli, 1994). La luz R de 660 nm convierte un 87% del fitocromo en la forma Pfr, mientras que la luz RL establece un 3% o 10% dependiendo de la fuente de luz utilizada. En exposiciones a irradiaciones dicromáticas, el Pfr/P estará determinado principalmente por la proporción de luz R y RL incidente. La característica del fitocromo de ser fotorreversible le confiere la propiedad de ser un sensor de la calidad de luz, a través de la percepción de los cambios en la relación R/RL producidos en el ambiente, y el subsecuente cambio en la relación Pfr/P (Smith, 1982). De ésta manera el fitocromo controla procesos cruciales en el desarrollo de las plantas a lo largo de todo su ciclo de vida (Fig. 1.2).

Los niveles de Pfr también son afectados por dos tipos de reacciones que no dependen de la luz: la destrucción y la reversión a la forma Pr (Fig. 1.3C). La destrucción del Pfr ocurre, aparentemente, a través de la vía proteolítica de degradación (Clough y Vierstra 1997; Casal y Smith, 1989.). La tasa de reversión de Pfr—Pr varía según la especie (Mancinelli, 1994).

La acción del fitocromo requiere dos procesos a nivel de la molécula de fitocromo misma: la percepción de la señal luminosa y la transducción en una señal bioquímica. El fitocromo consta de dos dominios estructurales en su molécula, un extremo amino terminal, que constituye el dominio de entrada de la señal, y un dominio carboxi terminal que constituye el dominio de salida (Fig. 1.4). El aislamiento de mutaciones sin sentido en el gen del fitocromo con la producción de plantas transgénicas sobreexpresantes de fitocromos

mutados han indicado que las secuencias necesarias para una actividad normal residen en ambos extremos del polipéptido. En el dominio amino terminal se encuentran los sitios necesarios para la unión al cromóforo y para mantener la especificidad fotosensorial (Wagner *et al.*, 1996) (Fig. 1.4). En el dominio carboxi terminal se encuentran los sitios necesarios para la dimerización y la actividad regulatoria del fitocromo (Quail *et al.*, 1995) (Fig.1.4). Éste último dominio contiene dos regiones con homología a los dominios PAS (Lagarias, 1995) (por PER ARNT SIM, dominios encontrados originalmente en un gran número de proteínas reguladoras en moscas y mamíferos; Huang *et al.*, 1993). Se ha encontrado que estos dominios son importantes en la interacción proteína-proteína (Taylor y Zhulin, 1999). La importancia de los dominios PAS en la estructura de los fitocromos queda manifiesta en el hecho de que mutantes de fitocromo afectados en estos dominios tienen defectos en sus propiedades espectrales y en la capacidad de interactuar con componentes río abajo de la cadena de transducción (Elich y Chory, 1997). En el extremo carboxi terminal también se encuentran los dominios de homología a Histidina kinasa, que se describen más adelante.

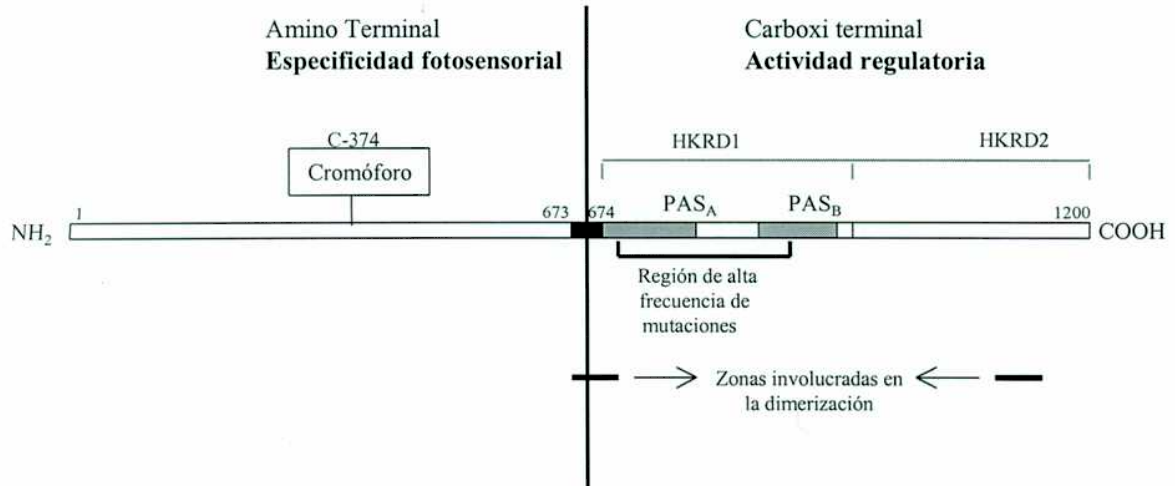


Figura 1.4. Estructura del fitocromo. En el dominio amino terminal se encuentra la especificidad fotosensorial con el sitio de unión al cromóforo, mientras que el dominio carboxi terminal se encuentran los elementos necesarios para la actividad regulatoria. La región negra representa el 'puente' entre ambos dominios. En el extremo carboxi terminal se encuentran los dominios con homología a histidina kinasas (HKRD), y los dominios PAS.

1.2.1.2 Los fitocromos son una familia de fotorreceptores

Resultados espectrofotométricos mostraron que el Pfr en tejidos etiolados era lábil, pero el Pfr en tejidos des-etiolados era relativamente estable (Jabben y Schäfer, 1982), identificándose así dos *pooles*¹ de Pfr fisiológicamente distintos: un *pool* lábil y otro estable a la luz. Más tarde, la caracterización inmunoquímica permitió el descubrimiento de más de un fitocromo en una única planta (Tokuhisa, *et al.*, 1985). La evidencia concluyente de la presencia de distintas isoformas de fitocromo en una misma especie fue provista por el clonado y secuenciación de cinco genes del genoma de *Arabidopsis thaliana*: *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD*, y *PHYE* (Sharrock y Quail, 1989; Clack *et al.*, 1994). También se encontraron genes *PHY* en hongos (Hanelt, 1992) musgos (Thummler *et al.*, 1992) algas (Lagarias, *et al.*, 1995), e incluso algunas bacterias (Davis *et al.*, 1999; Yeh *et al.*, 1997). El número de genes de la familia de los fitocromos no es uniforme en las plantas superiores. En tomate existen genes *PHY* distintos, incluyendo *PHYA* *PHYB1* *PHYB2* *PHYE* y *PHYF/PHYC* (Pratt *et al.*, 1995). En las monocotiledóneas existirían tres genes de fitocromos correspondientes a los genes *PHYA*, *PHYB*, *PHYC* (Mathews y Sharrock, 1997). El análisis de las secuencias de distintos fitocromos reveló que los fitocromos de distintas especies son más parecidos entre sí que los distintos fitocromos de una misma especie. Esto sugiere que los distintos fitocromos se originaron a partir de un ancestro común, a través de sucesivas duplicaciones (Mathews y Sharrock, 1997).

Durante muchos años los fitocromos fueron considerados exclusivamente citosólicos, sin embargo hoy en día se sabe que migran hacia el núcleo como consecuencia de la activación por luz (Nagy, 2000).

El *phyA* y el *phyB* son los más abundantes y han sido los más estudiados y caracterizados. Esto se debe en parte a que son los fotorreceptores mayoritariamente involucrados en la modulación fotomorfogénica de las plantas, y el fenotipo obvio de los mutantes simples de *phyA* y *phyB* han permitido que sean los primeros fitocromos en ser clonados y secuenciados en *Arabidopsis*.

¹ Algunas palabras se mantienen en el idioma original por no encontrar en español una traducción exacta de las mismas.

El *phyA* tiene la característica única dentro de la familia de los fitocromos de ser lábil a la luz, debido a que su forma Pfr es más inestable que la forma Pr. Es decir, que el *phyA* se acumula en altas cantidades relativas en plantas etioladas, pero sus niveles disminuyen dramáticamente luego de la exposición a la luz. Además el *PHYA* es negativamente regulado por la luz (Somers y Quail, 1995), y ocurre a nivel transcripcional (Lissemore y Quail, 1988).

Experimentos realizados con plantas mutantes que carecen de un fotorreceptor específico, o plantas transgénicas con niveles reducidos o incrementados ha permitido asignar funciones a los fotorreceptores. Las mutantes de *phyA* fueron seleccionadas por la falla en la inhibición del crecimiento del hipocotilo y apertura de los cotiledones en luz RL continua (RLc). Las mutantes de *phyA* en *Arabidopsis* (Dehesh *et al.*, 1993; Nagatani *et al.*, 1993; Whitelam *et al.*, 1993) o tomate (van Tuinen *et al.*, 1995) y plantas de papa que sobreexpresan el gen del *PHYA* en antisentido (Heyer *et al.*, 1995) son insensibles a la diferencia entre la luz RL y la oscuridad pero responden normalmente a la luz blanca (Whitelam *et al.*, 1993; Parks y Quail, 1993). En condiciones de radiación natural bajo canopeos densos, ricos en RL, el *phyA* es crucial para producir la des-etiolación, y las mutantes de *phyA* mueren prematuramente (Yanovsky *et al.*, 1995). El *phyA* estaría también involucrado en la detección temprana de plantas vecinas, indirectamente modulando la actividad del *phyB* (Yanovsky *et al.*, 1995; Casal y Sánchez, 1994). El *phyA* participa también de la sincronización del reloj endógeno (Yanovsky *et al.*, 2000). Además, el *phyA* promueve la iniciación de la floración, ya que el mutante de *phyA* florece más tarde que el genotipo salvaje (WT) en respuesta a extensiones del fotoperíodo (Johnson *et al.*, 1994).

El *phyA* es capaz de operar en dos modos de acción diferentes. El llamado VLFR (del inglés *Very Low Fluence Response*) se activa a muy bajos flujos de luz y se satura con niveles muy bajos de Pfr. Exposiciones a pulsos de luz RL (RLp) o incluso a luz verde son suficientes para saturar estas respuestas (Botto *et al.*, 1996; Shinomura *et al.*, 1996) (Casal *et al.*, 1994). Por otro lado, el *phyA* también puede operar a altos flujos de luz, son las

respuestas llamadas HIR (del inglés *High Irradiance Response*). Son respuestas que requieren intensidades de luz RL altas y por un tiempo prolongado y en las que no se cumple la ley de la reciprocidad. La ley de la reciprocidad establece que a igual cantidad de fotones la respuesta es la misma. Es decir, que en tratamientos con irradiaciones continuas, o irradiaciones con menor tiempo de exposición pero a mayor flujo (de manera tal que la cantidad de fotones sea la misma), se obtiene el mismo grado de respuesta. En las respuestas HIR, la exposición a luz RL continua (RLc) es más eficiente que pulsos horarios de RL (RLp) en la que se mantiene el flujo total. En otras palabras, en las respuesta del tipo HIR, el grado de respuesta no depende sólo de la cantidad de fotones recibidos sino también de la forma en la que los fotones son distribuidos en el tiempo. La evidencia contundente que el *phyA* media las respuestas al VLFR y HIR se sustenta en el hecho de que mutantes de *phyA* fallan en ambos tipos de respuesta (Botto *et al.*, 1996; Shinomura *et al.*, 1996; Casal *et al.*, 1994, Nagatani *et al.*, 1993). Hoy existen evidencias genéticas (Yanovsky *et al.*, 1997; 2000) y moleculares (Cerdán *et al.*, 2000) que muestran que el VLFR y el HIR serían parte de dos cascadas de señalización diferentes.

La sobreexpresión de *PHYA* causa hipersensibilidad tanto a tratamientos con RLc como con luz blanca (Cherry *et al.*, 1991; Boylan y Quail, 1991; Nagatani *et al.*, 1991a). Se considera que el *phyA* no participa de la percepción de luz R continua (Rc) ya que los niveles de *phyA* en plantas des-etioladas están fuertemente reducidos. Sin embargo, aún los bajos niveles de *phyA* presentes en plántulas verdes parecen suficientes para mediar algunas respuestas (Johnson *et al.*, 1994). Además, el *phyA* es capaz de responder a un pulso de R. En plántulas etioladas de *Arabidopsis*, pretratamientos con un pulso de R (Rp) aumentan la respuesta fototrópica a la luz azul, sin embargo este aumento se pierde en el mutante de *phyA* (Parks *et al.*, 1996). En semillas de *Arabidopsis*, las respuestas a muy bajos flujos (VLFR) son mediadas por el *phyA*, y pueden ser inducidas por un pulso subsaturante de R (Botto *et al.*, 1996). Estas observaciones sugieren la existencia de *phyA* activo bajo tratamientos de R. Sin embargo el rol del *phyA* bajo luz Rc no ha sido estudiado detalladamente.

Consistentemente con su función, el transporte de phyA hacia el núcleo se produce con Rp o RLp (traslocación mediada por una respuesta del tipo VLFR) o con exposiciones a luz RLc (traslocación mediada por una respuesta del tipo HIR) (Kim *et al.*, 2000).

Fitocromo B

El phyA y el phyB se asemejan en que ambos tienen el mismo espectro de absorción, y se expresan en todos los tejidos (Somers y Quail, 1995). La diferencia más importante entre phyA y phyB reside en su abundancia relativa en distintos estadios del desarrollo de la planta. Mientras que, los niveles de phyA se reducen con la luz, los niveles de phyB son 100 veces más bajos en plántulas etioladas pero superiores que phyA en plantas verdes, ya que el phyB es estable (Somers y Quail, 1995).

El phyB es el principal fotorreceptor involucrado en la percepción de Rc. Las mutantes de *phyB* de *Arabidopsis* (Nagatani *et al.*, 1991b; Somers *et al.*, 1991; Reed *et al.*, 1993) y de pepino (López Juez *et al.*, 1992) presentan un fenotipo alargado cuando crecen en luz R o luz blanca. Contrariamente, la sobreexpresión del phyB en *Arabidopsis* causa un fenotipo sumamente corto de los hipocotilos (Wagner *et al.*, 1991; McCormac *et al.*, 1993).

El phyB funcionaría en la percepción de las típicas respuestas R/RL reversibles. Esta respuesta es llamada LFR (del inglés *Low Fluence Response*), pueden ser inducidas con un pulso de R y esta inducción puede ser revertida por RL. El grado de respuesta muestra una muy buena correlación con los niveles de Pfr/P establecidos por los tratamientos lumínicos. En la germinación de semillas de lechuga, un pulso saturante de R que establece un 87% de Pfr induce la germinación. Si el pulso de R es seguido de RL que establece un 3 % de Pfr la germinación se inhibe. Si se emplean pulsos de R no saturantes que establecen niveles de Pfr intermedios, el porcentaje de germinación tiene una relación directa con el nivel de Pfr logrado. Otra característica es que las respuestas LFR obedecen la ley de la reciprocidad, es decir, se obtiene el mismo grado de respuesta con tratamientos de luz continua o pulsos con igual cantidad de fotones. El mutante de *phyB* presenta deficiencias en la germinación y la des-etiolación en respuesta al R en el rango del LFR pero responde normalmente al RLc (HIR) o pulsos de RL (VLFR) (Shinomura *et al.*, 1994,

Botto *et al.*, 1995; Reed *et al.*, 1993). Además, el phyB es el principal fotorreceptor de las disminuciones en la relación R/RL y pulsos de RL al final del día, asociadas al cambio en el ambiente luminoso como consecuencia de la presencia de plantas vecinas (Whitelam y Smith, 1991; Ballaré *et al.*, 1991; Robson *et al.*, 1993). El mutante *phyB* florece más tempranamente que el WT tanto en días cortos como en días largos, revelando un rol inhibidor del phyB sobre la iniciación floral (Goto *et al.*, 1991; Reed *et al.*, 1993).

Consistentemente con su función, se ha demostrado que el phyB migra al núcleo luego de ser expuesto a la luz R y puede ser inhibido por luz RL (traslocación mediada por una respuesta del tipo LFR) (Kircher *et al.*, 1999).

Fitocromos C/D/E

Experimentos realizados con mutantes *phyD* y *phyE* o transgénicas de phyC muestran que estos fotorreceptores tienen funciones sensoriales parecidas al phyB (Aukerman *et al.*, 1997; Devlin *et al.*, 1998; Devlin *et al.*, 1999). Los mutantes de *phyD* y *phyE* tienen un fenotipo sutil que se profundiza en ausencia del phyA y phyB, revelando el alto grado de redundancia entre estos fotorreceptores. Así, parecería ser que entre el phyA y el phyB son capaces de mediar todas las respuestas del desarrollo de las plantas en el rango del R y RL.

1.2.1.3 Caminos de señalización y componentes de la cadena de transducción de los fitocromos

Hoy en día existe fuerte evidencia que los fitocromos de angiospermas catalizan reacciones de fosforilación a través de los dominios carboxi terminales. La estructura de este dominio parece haber evolucionado a partir de una histidina kinasa ancestral de bacterias (Yeh y Lagarias, 1998), y se los denominó HKRD (del inglés, *histidine kinase related domain*). Sin embargo, a diferencia de su contraparte en cyanobacterias, los fitocromos fosforilan en residuos de Ser/Thr y no His/Asp.

Cuatro diferentes aproximaciones han sido utilizadas para identificar componentes de la cadena de transducción del fitocromo: fisiológica, farmacológica, genética y molecular. Las aproximaciones fisiológicas y farmacológicas han permitido identificar la participación del fitocromo en cambios en el potencial de membrana (Raculsen *et al.*, 1983) y la participación de proteínas G heterotriméricas, cGMP y calcio (Neuhaus *et al.*, 1993) como componentes tempranos de la señalización, respectivamente. Las aproximaciones genéticas, a través de la búsqueda de mutantes; y moleculares, a través de la identificación de los factores que interactúan directamente con el fitocromo, son las que han provisto la mayor información para comenzar a entender los caminos de transducción de señales. La identificación de plantas mutantes afectadas en componentes de la cadena de transducción ha permitido determinar un gran número de genes que actúan tempranamente río abajo del phyA (causando deficiencias en la respuesta a la luz RL) como el *fhyl* (Whitelam, *et al.*, 1993), *fin 2* (Soo Soh *et al.*, 1998) *far1* (Hudson *et al.*, 1999) y *spal* (Hoecker *et al.*, 1998), del phyB (causando deficiencias en la respuesta a la luz R) como *pef2*, *pef3* (Ahmad y Cashmere, 1996) y *red1* (Wagner *et al.*, 1997) así como también genes involucrados en ambas cadenas de señalización como el *pef1* (Ahmad y Cashmere, 1996) y *psi2* (Genoud *et al.*, 1998). Las mutantes con fenotipo des-etiolado cuando crecen en oscuridad son pleiotrópicas estando afectadas en varios aspectos del desarrollo de la planta y son considerados genes que actúan tardíamente como componentes de señalización. Este es el caso de los mutantes *cop* (Deng *et al.*, 1991) y *det* (Chory *et al.*, 1989).

Las aproximaciones moleculares han demostrado la asociación del phyB y el phyA con el factor de transcripción PIF3 (del inglés *phytochrome interactive factor 3*) (Ni, 1998; Ni *et al.*, 1999). La asociación del PIF3 al phyB se induce luego de exposiciones a la luz R y este efecto puede revertirse con luz RL (Ni *et al.*, 1999). En adición al PIF3, otras dos proteínas han sido identificadas como proteínas capaces de interactuar con el fitocromo: la PKS1 (del inglés *phytochrome kinase substrate 1*) (Fankhauser *et al.*, 1999) y la NDPKS2 (del inglés *nucleoside diphosphate kinase 2*) (Choi *et al.*, 1999). La PKS1, se ha encontrado únicamente en el citoplasma, e interactúa con el extremo carboxi terminal del phyA y del phyB. La fosforilación de la PKS1 está estimulada por la luz, sugiriendo la participación del fitocromo como kinasa. La NDPK2, se encuentra tanto en el citoplasma

como en el núcleo, e interactúa con el extremo carboxi terminal del phyA (Choi *et al.*, 1999), y su actividad enzimática está estimulada cuando interactúa con la forma Pfr del phyA. Las mutantes de *ndpk2* fallan en el R y RL sugiriendo la interacción tanto con el phyA como el phyB.

En resumen, la acción del fitocromo podría resultar en dos mecanismos separados, uno que operaría en la expresión de genes y otro más rápido operaría para modular el balance iónico citoplasmático.

1.2.2 Receptores de luz azul

Los receptores de luz azul se caracterizan por absorber en la región UV-A- azul del espectro. Entre las respuestas que modulan se encuentran: la inhibición del crecimiento del hipocotilo, la regulación del tiempo de floración, los ritmos circadianos, la apertura de estomas, y la curvatura fototrópica del hipocotilo. Una clase de pigmentos, parecidos a las fotoliasas tipo I de bacterias, se denominaron **criptocromos** (Cashmore *et al.*, 1999). Luego, el nombre **fototropina** fue inventado para el receptor de luz azul que media las respuestas fototrópicas (Briggs y Huala, 1999). Desde el descubrimiento de los criptocromos en plantas, este tipo de pigmentos similares a fotoliasas ha sido encontrado en animales. En humanos (*hCRY1* y *hCRY2*) y en ratón (*mCry1* y *mCry2*) (Hsu *et al.*, 1996, Todo *et al.*, 1997) se han encontrado dos criptocromos y *Drosophila* posee un criptocromo (*dCRY*) (Emery *et al.*, 1998). A diferencia de los criptocromos de plantas, los criptocromos animales se asemejan más a la 6-4 fotoliasa, además hay poca similitud de las secuencias entre los dominios carboxi terminales en los diferentes organismos (Emery *et al.*, 1998), sugiriendo que contrariamente a los fitocromos, los criptocromos derivaron de más de una línea evolutiva. Sin embargo, tanto en plantas como en animales los criptocromos están involucrados en la regulación de los ritmos circadianos.

1.2.2.1 Criptocromos

Criptocromo 1

Los criptocromos fueron identificados por primera vez en *Arabidopsis thaliana*. En 1980, se aisló en *Arabidopsis* una mutante llamado *hy4* que presentaba defectos en la inhibición del hipocotilo en luz azul (Koornneef *et al.*, 1980). La caracterización en 1993 de un alelo *hy4* (obtenido por inserción de T-DNA) reveló que el gen *HY4* codificaba para una proteína con características de fotorreceptor de luz azul, y *HY4* fue renombrado *CRY1* (por criptocromo 1) (Ahmad y Cashmore, 1993). El análisis de las secuencias de *CRY1* reveló la existencia de un extremo amino terminal de aproximadamente 500 aminoácidos con un 30 % de similitud con la enzima reparadora de DNA fotoliasa dependiente de luz azul (Sancar, 1994). Una serie de experimentos mostraron que el *cry1* es capaz de unir no covalentemente FAD, que sería el que absorbería en el azul UV-A (Sancar, 1994) (Malhotra *et al.*, 1995). Además, el *cry1* estaría asociado a un segundo cromóforo, una pterina (Malhotra *et al.*, 1995). El dominio carboxi terminal consta de una extensión de 180 aminoácidos, esencial para la función, que no se encuentra en las fotoliasas bacterianas. Al menos en oscuridad, el *cry1* presenta localización nuclear (Cashmore *et al.*, 1999).

El *cry1* es el principal responsable de mediar la inhibición del alargamiento del hipocotilo y la apertura de los cotiledones especialmente en respuesta a altas intensidades de luz azul (Koornneef *et al.*, 1980; Ahmad y Cashmore, 1993). Además participa en la inducción de las antocianinas mediadas por luz azul (Batschauer *et al.*, 1996).

Criptocromo 2

El segundo criptocromo, el *cry2*, fue aislado por homología al *cry1* (Lin *et al.*, 1998). A diferencia del *cry1* que es expresado constitutivamente, la concentración de la proteína de *cry2* disminuye rápidamente cuando las plántulas son expuestas la luz azul (Lin *et al.*, 1998). El *cry2* también tiene localización nuclear (Guo *et al.*, 1999; Kleiner *et al.*,

1999). El mutante de *cry2* de *Arabidopsis* es alélico a un mutante llamado *pha* previamente identificada como mutante de floración tardía (Koorneef *et al.*, 1991; Guo *et al.*, 1998). Experimentos realizados con mutantes *cry2* o plantas transgénicas que sobreexpresan el *CRY2* han indicado que este fotorreceptor tiene un rol fundamental en la promoción de la transición del estado vegetativo al reproductivo (Lin *et al.*, 1998). El *cry2* también estaría involucrado en la des-etiolación en respuesta a muy bajos flujos de luz azul (Lin *et al.*, 1998).

El mecanismo de señalización de los criptocromos en *Arabidopsis* estaría mediado a través de sus extremos carboxi terminales. Fusiones del extremo carboxi terminal con el gen reportero GUS muestran que los dominios de estos extremos tanto del *CRY1* como del *CRY2* presentan respuestas constitutivas a la luz (Yang *et al.*, 2000)

1.2.2.2 Fototropina

En plantas superiores, el fototropismo está controlado por receptores de luz azul (Briggs y Huala, 1999). Se han aislado y caracterizado en *Arabidopsis* mutantes deficientes en la respuesta fototrópica (*nph1-nph4*) (Liscum y Briggs, 1995), y tanto el *NPH1* como el *NPH3* han sido recientemente clonados (Huala *et al.*, 1997; Motchoulski y Liscum, 1999).

Hasta el momento, la naturaleza de los caminos de señalización de la luz azul es incierta. Se sabe que la proteína de *nph1* esta asociada la membrana (Reymond *et al.*, 1992) y es una kinasa que cataliza reacciones de autofosforilación en respuesta a la luz azul. Parecería ser que en la respuesta fototrópica mediada por fototropina estarían involucrados cambios en la concentración de calcio citosólico (Baum *et al.*, 1999)

1.2.3 Receptores de luz UV-B

EL UV-B (280-320 nm) en intensidades moderadas, tiene efectos específicos sobre el desarrollo de las plantas (Ballaré *et al.*, 1995; Ballaré *et al.*, 1996). Una serie de análisis a las respuestas UV-B sugieren la existencia de un fotorreceptor específico para UV-B

(Ballare, 1991). Sin embargo hasta el momento no se ha identificado ningún fotorreceptor de UV-B.

1.3 INTERACCIÓN ENTRE FOTORRECEPTORES

Las señales, percibidas por cada uno de estos fotorreceptores, convergen en la regulación de un número de procesos y no es extraño que los sistemas de fotorreceptores interactuen entre sí.

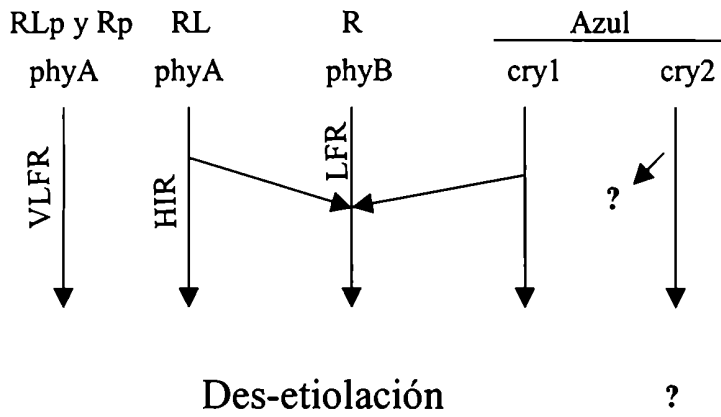
Los primeros trabajos realizados para estudiar la interacción entre los pigmentos mostraron que tratamientos de luz azul aumentaban la respuesta a un pulso subsecuente de R (Meijer y Engelsma, 1965), para la acumulación de antocianinas en *Sorghum* (Drumm y Mohr, 1978, Oelmüller y Mohr, 1985), y la actividad de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Oelmüller y Mohr, 1984). Mohr y colaboradores propusieron un modelo de coacción entre los fotorreceptores. Este modelo consideraba al fitocromo (en su forma Pfr) como 'efector' que opera directamente en la expresión de los genes, mientras que la luz azul absorbida por parte de los criptocromos modularía la respuesta del Pfr (Mohr, 1994).

El estudio de las interacciones entre fitocromos y criptocromos no es trivial, y puede conducir a interpretaciones erróneas si no se toman en consideración algunos aspectos propios de la fotobiología de los receptores. Si bien los fitocromos absorben principalmente en la región del espectro correspondiente al R y RL, también absorben en el rango de los 450 nm (luz azul) (Fig. 1.3A). La luz azul establece aproximadamente un 45 % de la forma Pfr. Es decir que irradiaciones con luz azul podrían estar produciendo una respuesta vía fitocromo y no vía fotorreceptor de luz azul.

La interacción entre dos productos génicos puede clasificarse como sinérgica o antagónica. La interacción es sinérgica cuando la actividad de un producto génico aumenta con la actividad de otro producto génico, y se dice que es antagónica cuando la actividad de un producto génico se reduce con la actividad de otro producto génico.

Experimentos realizados utilizando plantas mutantes simples de *phyA*, *phyB* o *cry1* en combinación con técnicas fotobiológicas clásicas han puesto en evidencia algunas interacciones entre estos fotorreceptores durante el proceso de des-etiolación. Uno de los

A



B

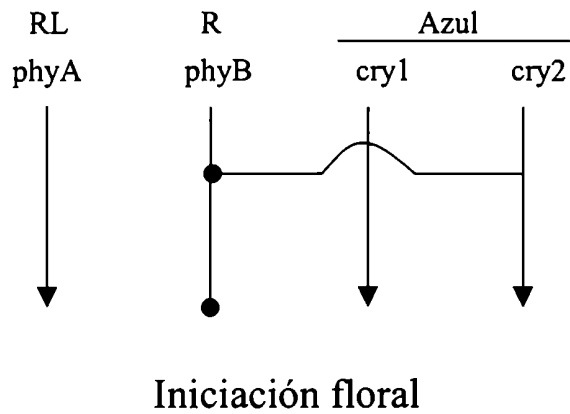


Figura 1. 5. Modelos esquemáticos que representan el estado del conocimiento de las interacciones entre fitocromos y criptocromos antes de comenzar la presente tesis para dos procesos, A) des-etiolación, B) iniciación floral. —▶ Interacciones positivas —● Interacciones negativas

fotorreceptores que media la des-etiolación bajo luz R es el phyB. Sin embargo, un simple pulso de luz R por día que fototransforma al phyB en Pfr no es suficiente para producir la des-etiolación (Casal y Boccalandro, 1995). Si el pulso de R es precedido por 3 h de luz RL se produce la inhibición del crecimiento del hipocotilo, y la apertura de los cotiledones (Casal y Boccalandro, 1995). Este efecto se pierde en el mutante de *phyB*, como era de esperarse ya que es el fotorreceptor que percibe el pulso de R, y el mutante de *phyA* muestra la misma respuesta al pulso de R con o sin un pretratamiento de RL, indicando la participación del phyA en la percepción de RL. Estos resultados muestran que el phyA y el phyB son sinérgicos ya que la activación del phyA (en su forma HIR) aumenta la actividad del phyB a los pulsos de R (Casal, 1995) (Fig. 1.5A). En este mismo sentido, la exposición a tratamientos de luz azul, percibidos por el *cry1*, es capaz de establecer la respuesta a pulsos de R percibidos por el phyB (Casal y Boccalandro, 1995). Esta combinación de exposición a la luz azul seguido de luz R no es efectiva ni en el mutante de *phyB* ni en el mutante de *cry1*. Nuevamente, la acción del *cry1* aumenta la actividad del phyB, es decir que estos fotorreceptores actúan sinérgicamente (Fig. 1.5A). Interacciones sinérgicas entre phyB y *cry1* también se han encontrado en otros procesos distintos al de la des-etiolación como en los cambios en turgencia de los protoplastos aislados de hipocotilos de *Arabidopsis* (Wang y Moritoshi, 1997) en respuesta a la luz azul.

Recientemente se ha aislado el mutante de *cry2* (Guo *et al.*, 1998) y experimentos realizados con dobles mutantes *phyB cry2* revelaron que el *cry2* actuaría antagonisticamente con el phyB (Mockler *et al.*, 1999) durante la iniciación floral (Fig. 1.5B). Sin embargo, las interacciones del *cry2* con otros fotorreceptores en ésta y otras respuestas son aún desconocidas.

Las interacciones entre fotorreceptores han sido evidentes en condiciones controladas que involucran flujos de luz constantes o exposiciones a longitudes de onda restringidas. Sin embargo, la ocurrencia de interacciones en condiciones de radiación natural, donde la irradiancia varía a lo largo del día y existen fotoperíodos, no ha sido hasta el momento analizada.

Un amplio número de procesos del desarrollo estudiados tanto en sistemas animales como de plantas muestran evidencias contundentes que los productos génicos

involucrados en la regulación de un determinado proceso del desarrollo forman parte de una extensa red en la cual los caminos de transducción entre ellos están interconectados.

Algunas de las interacciones entre fotorreceptores descritas sugieren que las cadenas de transducción de los mismos podrían involucrar una amplia red de conexiones, sin embargo, para el sistema de fotorreceptores el panorama es aún incompleto.

1.4 OBJETIVOS

Investigar la interacción entre los sistemas de fotorreceptores (fitocromos y criptocromos) en plantas, utilizando como modelo a *Arabidopsis thaliana*.

Para ello la aproximación elegida involucra obtener y caracterizar todos los dobles, triples y cuádruple combinaciones de mutantes a partir de los simples mutantes de *phyA*, *phyB*, *cry1* y *cry2* de *Arabidopsis thaliana*. Este material sería valioso como herramienta genética para estudiar el efecto de un fotorreceptor en ausencia / presencia de otro/s fotorreceptor/es. Además, al momento de escribir esta tesis este material no se encuentra (al menos en forma completa) disponible en ningún otro laboratorio.

Los patrones de interacción se presentan en tres secciones. En la primera se estudia el rol del *phyA* en la inhibición del alargamiento del hipocotilo bajo luz Rc y la existencia de interacciones con el *phyB* (principal fotorreceptor de luz R). En esta parte de la tesis no se utilizaron las combinaciones de mutantes con *cry1* y *cry2* ya que estos fotorreceptores no son activos en luz R.

En la segunda parte se presentan las interacciones entre *phyA*, *phyB*, *cry1* y *cry2* en plantas cultivadas en condiciones controladas utilizando luz blanca que activa a los cuatro fotorreceptores. Se analizó el comportamiento de los mutantes simples y múltiples en diferentes procesos del desarrollo: des-etiolación, crecimiento vegetativo, transición del estado vegetativo al estado reproductivo y fenotipo adulto. Durante el estudio del comportamiento de estos mutantes en la etapa vegetativa, encontramos que el doble mutante *phyB cry1* presentaba entrenudos alargados. Caracterizamos más ampliamente ésta respuesta en diferentes temperaturas y su correlación con la transición del estado

vegetativo al reproductivo. En la tercera sección se presentan las interacciones entre fitocromos y criptocromos durante la des-etiolación en condiciones de radiación natural. Las plantas fueron expuestas a distintos rangos de irradiancia y diferentes fotoperíodos.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Vegetal. Obtención de mutantes múltiples.

Se utilizaron semillas del genotipo salvaje (WT) de *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. cultivar Landsberg *erecta*. Se incluyeron los mutantes nulos de *phyA* (*phyA-201*, (Nagatani *et al.*, 1993), *phyB* (*phyB-5* (Reed *et al.*, 1994), y *phyB-1* (Koorneef *et al.*, 1980) (este último alelo sólo se usó para los experimentos de la sección 3.1), *cry1* (*cry1-1*, (Ahmad y Cashmore, 1993; Koorneef *et al.*, 1980) y *cry2* (alelo *fha-1*, (Guo *et al.*, 1998; Koorneef *et al.*, 1991). El doble mutante *phyA-201 phyB-1* fue obtenido a partir de cruces entre los mutantes simples *phyA-201* y *phyB-1*. En la F₁ se seleccionaron aquellas plantas que mostraron hipocotilos largos y cotiledones cerrados bajo RLc (mutantes de *phyA*). En la segunda generación F₂ se seleccionaron aquellas semillas incapaces de germinar bajo RLc pero con fenotipo alargado luego de transferirlas a luz blanca continua (mutante de *phyB*). La falta de segregación de la generación F₃ reveló la homocigocidad del doble mutante.

Los dobles mutantes *phyA-201 cry1-1* y *phyB-5 cry1-1* fueron obtenidos a partir de cruzamientos de las líneas parentales y posterior selección de las plantas con fenotipo alargado en la generación F₂ crecidas bajo luz RL más azul o luz R más azul, respectivamente. En la siguiente generación se confirmó el genotipo exponiendo las plantas a los tratamientos de luz correspondientes y se seleccionaron las líneas homocigotas. El triple mutante *phyA-201 phyB-5 cry1-1* fue obtenido por cruzamientos del doble mutante *phyA-201 phyB-5* con el simple mutante *cry1-1*. Las plántulas con fenotipo elongado luego de crecer en luz blanca fueron seleccionadas de la F₂. En la F₃ se realizaron las pruebas de confirmación como se describió para los dobles mutantes. Todos los mutantes que llevaban el alelo *cry2 cry1-1 cry2*, *phyA-201 cry2*, *phyB-5 cry2*, *phyA-201 phyB-5 cry2*, *phyA-201 cry1-1 cry2*, *phyB-5 cry1-1 cry2* y *phyA-201 phyB-5 cry1-1 cry2* fueron obtenidos con el cruzamiento del triple mutante *phyA-201 phyB-5 cry1-1* con el simple mutante *cry2*. Las semillas que llevaban la mutación *cry2* fueron identificadas en la generación F₂ identificando los alelos con pruebas de PCR. Aquellas plantas que presentaban hipocotilos alargados y cotiledones cerrados cuando eran crecidas bajo luz RL,

R o azul fueron seleccionados en las sucesivas generaciones para identificar las mutaciones *phyA*, *phyB* y *cry1*, respectivamente. Todos los mutantes utilizados en esta tesis pertenecen al ecotipo Landsberg *erecta*.

En algunos experimentos de la sección 3.1, se utilizaron semillas de tabaco WT (*Nicotiana tabacum* L. cv. xanthi) y de la línea isogénica 9A4, transformada con el gen de *PHYA* de Avena fusionado al promotor constitutivo del virus del mosaico (CaMV_35S) (Keller *et al.*, 1989).

2.2 Identificación de los alelos mutantes por PCR

El genotipo de los dobles, triples y cuádruple mutantes fue confirmado por PCR. Las mutaciones *phyA-201*, *phyB-5* y *cry1-1* fueron identificadas como se describe en Neff y Chory, 1998. La mutación *cry2* crea un marcador dCAPS. Los productos de PCR obtenidos amplificados con los primers 5'GACTATAGTTTGGTTTAGAAAGAGACCTAA 3'y 5'GATTGAGATAAGTGAGCAAGTGATTGTTTCATGCA 3' fueron resueltos en un gel de agarosa al 2.5 % luego de la digestión con la endonucleasa de restricción NsiI.

2.3 Condiciones experimentales

Se sembraron 15 semillas de cada genotipo en cajas de plástico transparente (40x 33 mm² x 15 mm de alto) separados por bandas de papel de filtro, conteniendo 3 mL de agar al 0.8 % (v/v). En los experimentos que involucraron a *Arabidopsis thaliana*, las cajas fueron incubadas durante 3 días en oscuridad a 7° C, expuestas a un pulso saturante de R para inducir la germinación, e incubadas en oscuridad por 24 h a 25° C antes de traspasarlas a los tratamientos lumínicos correspondientes a cada protocolo.

En los experimentos que involucraron des-etiolación, las plántulas permanecieron en las cajas con agar por 3 (sección 3.1) o 7 (sección 3.2 y 3.3) días antes de las mediciones. Para investigar las respuestas de los estadios posteriores del desarrollo, que involucraron plantas adultas, luego de 5 días de crecer sobre el agar, las plántulas fueron transplantadas a macetas conteniendo una mezcla de tierra y perlita (1/1) de 25mm x 25 mm² por 40 mm de alto para los experimentos de la sección 3.2 en los que se estudió

alargamiento de los entrenudos, y a macetas de 7 cm de alto x 4 cm de diámetro para los experimentos de la sección 3.2, en el que se estudiaron las plantas hasta su fenotipo adulto.

Los experimentos en las cámaras fueron realizados a temperatura constante de 20° C o 25° C. Se realizaron experimentos a distintas temperaturas: 6 ° C o 20 ° C constantes o alternancia 20° C /30° C (15h / 9h) para analizar el control del alargamiento de los entrenudos.

En los experimentos con plántulas de tabaco, las cajas fueron expuestas 24 h a luz blanca e incubadas 4 días en oscuridad a 25° C antes de los tratamientos.

En algunos experimentos se adicionó Norfluorazón inmediatamente antes del comienzo de los tratamientos de luz (concentración final 0.015 mg cm⁻³).

2.4 Tratamientos y características de las fuentes de luz

Para los experimentos de la sección 3.1 se utilizaron tratamientos de Rc y pulsos cada hora (3 min) de R (Rp) provistos por lámparas Phillips PLC Electronic de 11 W (Holanda) en combinación con filtros de acetato amarillo, otro naranja y otro rojo (La Casa del Acetato, Buenos Aires Argentina) (para filtrar la luz azul) y 18 mm de una solución de sulfato de cobre de concentración 25 g dm⁻³ (para filtrar la luz RL). La emisión máxima de esta fuente de luz estuvo a 612 nm. Para proveer una fuente de luz RL continua (0.6 μmol m⁻² s⁻¹) o pulsos cada hora (duración del pulso 3 min) (RLp) (12 μmol m⁻² s⁻¹) (Pfr/P de 10%) se utilizaron lámparas incandescentes en combinación con seis filtros de acrílico azules (Paolini 2031, Buenos Aires, Argentina) y dos filtros de acetato rojo. Los RLp (Pfr/P 3%, 42 μmol m⁻² s⁻¹, 3 min.) fueron provistos por una lámpara incandescente en combinación con 8 cm de agua destilada y un filtro RG9 (Schott, Mainz, Alemania). Los cálculos de cada fotoequilibrio están descriptos en Casal *et al* (1991) (Casal *et al.*, 1991)

En los experimentos de la sección 3.2 las plántulas fueron transferidas a luz blanca provistas por lámparas de sodio de alta presión (Phillips SON) (300 μmol m⁻² s⁻¹, entre 300 y 700 nm) expuestas a días largos (fotoperíodo= 16 h). En algunos experimentos, las plántulas fueron expuestas a días cortos (fotoperíodo= 7 h) o a días cortos (hasta los 21 días) seguidos de 5 días largos (para producir la inducción de la floración y luego volvieron a días cortos.

Para estudiar el alargamiento de los entrenudos basales (sección 3.2.1) las plantas fueron expuestas a luz blanca continua provista por lámparas fluorescentes ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en cada régimen de temperatura.

En los experimentos realizados bajo radiación natural, las cajas conteniendo las plántulas fueron transferidas a un invernáculo. Se usaron dichas cajas envueltas en aluminio como controles de oscuridad para cada experimento. En algunos experimentos, las cajas conteniendo las semillas fueron puestas en cajas sin tapa de color negro cubiertas con filtros neutros para obtener las distintas irradiancias (del 100% al 5%). Los valores de las temperaturas dentro de las cajas fueron aproximadamente de 23°C para los controles de oscuridad y 26°C para las cajas expuestas a 100 % de luz solar al mediodía. Teniendo en cuenta que altas temperaturas producen la elongación de los entrenudos (Grey *et al.*, 1998) estas pequeñas diferencias podrían en todo caso resultar en la subestimación de los efectos de la luz. En otros experimentos, las semillas fueron expuestas a fotoperíodos normales de luz solar (11 h) o a fotoperíodos más cortos (5 h), entre las 10:00 y 15:00 hora local.

2.5 Mediciones y Estadísticas

Des-etiolación: La longitud del hipocotilo fue medido con regla con un error de 0.5 mm. Las 10 plántulas más largas fueron utilizadas para calcular el promedio del largo del hipocotilo en cada caja (una repetición). Este valor fue relativizado a la longitud de los controles en oscuridad y usado para los análisis estadísticos. En los experimentos que involucraron diferentes irradiancias naturales, las longitudes de los hipocotilos relativos a los controles de oscuridad fueron ajustados por cuadrados mínimos al logaritmo de la irradiancia. El ángulo entre los cotiledones fue medido con un transportador.

Desarrollo vegetativo: Los entrenudos por arriba del hipocotilo fueron medidos con una regla con un error de 0.5 mm. El número visible de hojas (mayores que 2 mm) fue medido cada día (aproximadamente) para analizar la tasa de aparición de hojas.

Transición del estado vegetativo al estado reproductivo: El número final de hojas en el vástago principal (hojas en la roseta más hojas en el tallo) fue utilizado como una mediada de escala biológica del tiempo a floración (Koomneef *et al.*, 1991). Como algunos mutantes de fotorreceptores usados en este estudio no muestran un fenotipo normal de

roseta, el número de hojas en la roseta no fue usado como indicación del tiempo de floración. El tiempo de aparición de primer pimpollo visible fue medido a ojo desnudo y utilizado como una escala cronológica del tiempo a floración. Para investigar el tiempo de transición entre el estado vegetativo y reproductivo en el ápice (sección 3.2.1), tres plantas de cada genotipo fueron cosechadas cada 2 o 3 días. La disección de los ápices fue observada a la lupa. Los ápices vegetativos eran sutilmente convexos y estaban parcialmente cubiertos por primordios foliares (Hempel *et al.*, 1997; Smyth *et al.*, 1990). La presencia de yemas florales a los costados del meristema apical fue tomada como indicio de una transición completa del estadio vegetativo al reproductivo (Smyth *et al.*, 1990). El número de repeticiones está indicado en la leyenda de las figuras y tablas.

3. RESULTADOS

3.1 INTERACCIÓN ENTRE EL PHYA Y EL PHYB BAJO LUZ ROJA CONTINUA.

En esta primera parte de la tesis investigamos con mayor detalle el rol del phyA bajo Rc y las interacciones con el phyB, comparando la respuesta a diferentes flujos de luz R en el WT, los mutantes simples de *phyA*, y *phyB* y el doble mutante *phyA phyB* de *Arabidopsis thaliana*, así como también en plántulas salvajes y sobreexpresantes de phyA en *Nicotiana tabacum*.

Respuesta a la luz Roja continua

Las plántulas WT de *Arabidopsis* mostraron una respuesta bifásica cuando fueron expuestas a distintos flujos de luz Rc (hasta $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Fig. 3.1), cuya transición se encontró en $10^{-2} \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La primera fase (flujos más bajos) estuvo ausente en el mutante de *phyA* y presente en el mutante *phyB*. La segunda fase (flujos más altos) fue más pronunciada en el mutante de *phyA* comparado con el WT (diferencia entre las pendientes de respuesta), mientras que estuvo ausente en el mutante de *phyB*. El doble mutante *phyA phyB* no presentó respuesta a la luz Rc (Fig. 3.1).

En plántulas de tabaco la respuesta al Rc mostró dos fases separadas por un *plateau* (Fig. 3.2). En el WT, la primera fase se saturó con $10^{-3} \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de Rc. Las plántulas sobreexpresantes de phyA de avena mostraron una mayor respuesta en la primera fase, que también puede ser observada a flujos más altos que $10^{-2} \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 3.2).

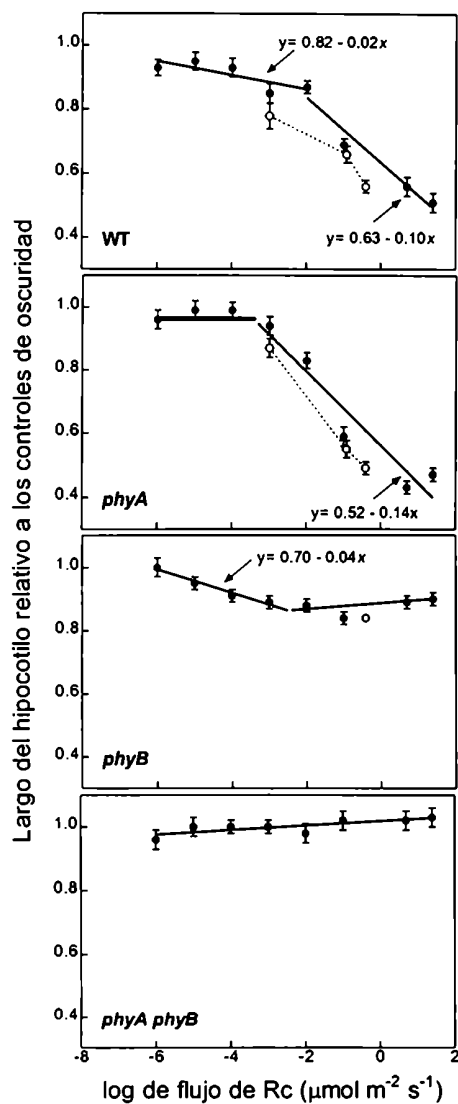


Figura 3.1. Efectos de diferentes flujos de Rc en el largo del hipocotilo de plántulas de *Arabidopsis thaliana*: WT, simples mutantes *phyA* y *phyB* y el doble mutante *phyA phyB*. Los círculos blancos indican el largo del hipocotilo en plántulas expuestas a pulsos horarios de 3 min de R (Rp) (la posición de las abscisas corresponde al flujo de Rc y al mismo flujo total de Rp). Los datos representan la media \pm error estándar (E.E) de 18 repeticiones.

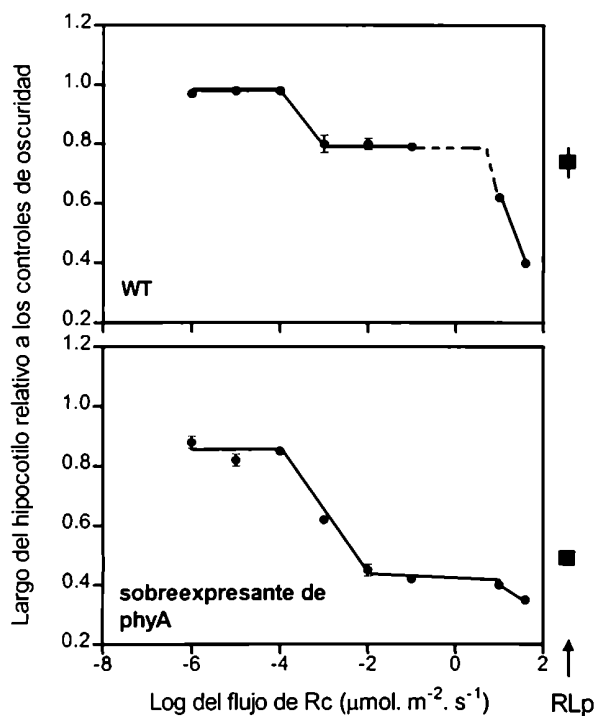


Figura 3.2. Efecto de distintos flujos de Rc en el largo del hipocotilo de plántulas de tabaco WT o sobreexpresantes de phyA de avena. Los efectos de los RLP (fotoequilibrio = 2.7 %) se muestran a la derecha de cada gráfico. Los datos representan la media \pm E.E de 9 repeticiones.

Genotipo	Norfluorazón	Largo del hipocotilo relativo a los controles en oscuridad	
		Rc	Rp
<i>Arabidopsis</i> WT	-	0.62 \pm 0.02	0.66 \pm 0.04
	+	0.54 \pm 0.03	0.52 \pm 0.04
<i>phyA</i>	-	0.59 \pm 0.02	0.59 \pm 0.05
	+	0.52 \pm 0.03	0.50 \pm 0.05
<i>Nicotiana</i> WT	-	0.45 \pm 0.02	0.34 \pm 0.02
	+	0.34 \pm 0.02	0.30 \pm 0.01
sobreexpresante phyA	-	0.31 \pm 0.01	0.28 \pm 0.02
	+	0.28 \pm 0.01	0.25 \pm 0.01

Tabla 3.1. Largo del hipocotilo del WT y mutante de *phyA* de *Arabidopsis* o WT y sobreexpresante de *phyA* en *Nicotiana* expuestos a Rc (6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o Rp (3 min./h 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Se agregó Norfluorazón a algunas cajas inmediatamente antes de comenzar los tratamientos lumínicos. Los datos son las medias y los E.E de 10-15 (*Arabidopsis*) o 5 (*Nicotiana*) réplicas.

Efectos comparativos de Rc versus Rp

La luz RLc induce la respuesta del tipo HIR, que se caracteriza por el requerimiento de exposiciones largas y de altos flujos de luz, y la falla en cumplir la ley de la reciprocidad. Para analizar si la respuesta al Rc era una respuesta del tipo HIR, los distintos genotipos fueron expuestos a un pulso de luz R de 3 min por hora (Rp) o a luz Rc, de manera tal que la cantidad de fotones recibidos por hora por las plántulas fuera el mismo. La inhibición del hipocotilo causada por Rp fue similar o aún mayor que aquella causada por Rc (Fig. 3.1 y Tabla 3.1). La clorofila absorbe luz R y por lo tanto podría estar reduciendo el efecto de tratamientos de Rc comparados con Rp. Para investigar este punto

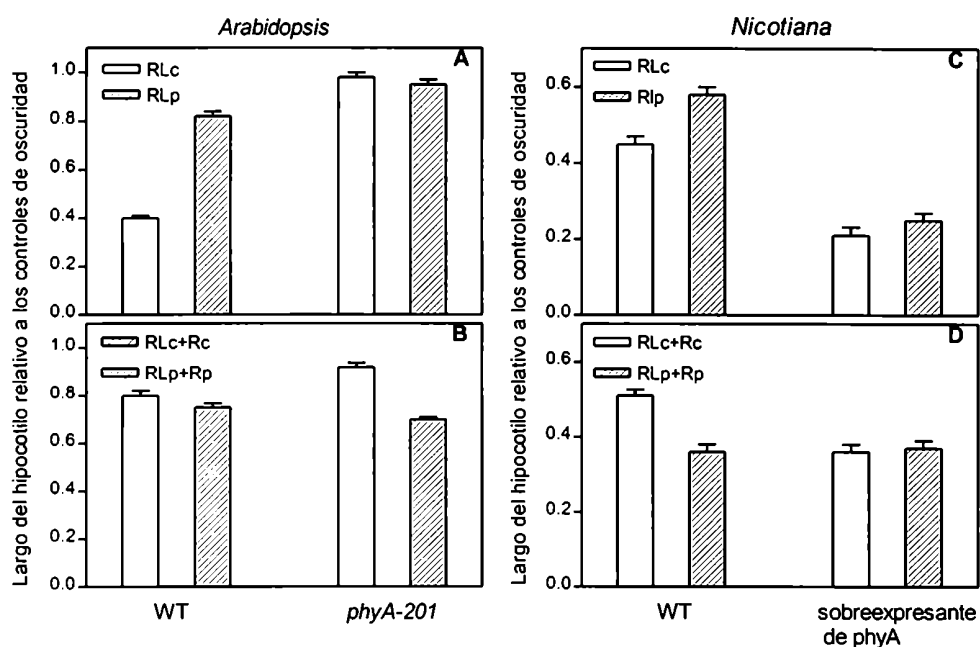


Figura 3.1. Efectos de RLp (3 min por hora: $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) comparados con RLc ($0.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con el mismo flujo total (A y C) y RLp + Rp (3 min por hora RL= $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; R= $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) comparado con RLc+Rc (RL: $0.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; R= $0.65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (B y D). Los datos representan las medias \pm E.E de al menos 8 (A, C) o 21 (B, D) repeticiones.

plántulas de *Arabidopsis* y tabaco fueron cultivadas en un medio con Norfluorazón (produce la destrucción de la clorofila). El efecto inhibitorio del R fue ligeramente mayor en plántulas cultivadas con Norfluorazón, sin embargo, el Rc no fue más eficiente que Rp (Tabla 3.1).

En contraste, cuando se compararon tratamientos de RLc *versus* RLp, el RLc fue más eficiente en la inhibición del crecimiento del hipocotilo tanto en *Arabidopsis* como en tabaco (Fig. 3. 3A y C) (HIR). Es decir, que no se cumplió la ley de reciprocidad que predice igual respuesta a la misma cantidad de fotones recibidos, independientemente de si el tratamiento fue realizado con luz continua o pulsos. La adición de R a los tratamientos de RL anuló la habilidad del RLc de producir una mayor inhibición del crecimiento del hipocotilo que con RLp (Fig. 3.3B y D). En otras palabras redujo la respuesta HIR del RLc.

Respuesta a distintos flujos de pulsos de luz R

Se investigó con mayor detalle la respuesta a 3 min por hora de Rp. Las plántulas WT mostraron una respuesta bifásica al flujo, con un punto de inflexión en $10^{-2} \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 3.4). Los RLp causaron un grado de inhibición que coincidió con el final de la primera fase de la respuesta a Rp (Fig. 3.4). Tanto la primera fase como la respuesta a RLp estuvo ausente en el mutante de *phyA* y presente en el mutante de *phyB*. La segunda fase fue más pronunciada en el mutante de *phyA* comparada con el WT, y ausente en el mutante de *phyB* (Fig.3.4). El doble mutante no presentó respuesta a los Rp (Fig. 3.4)

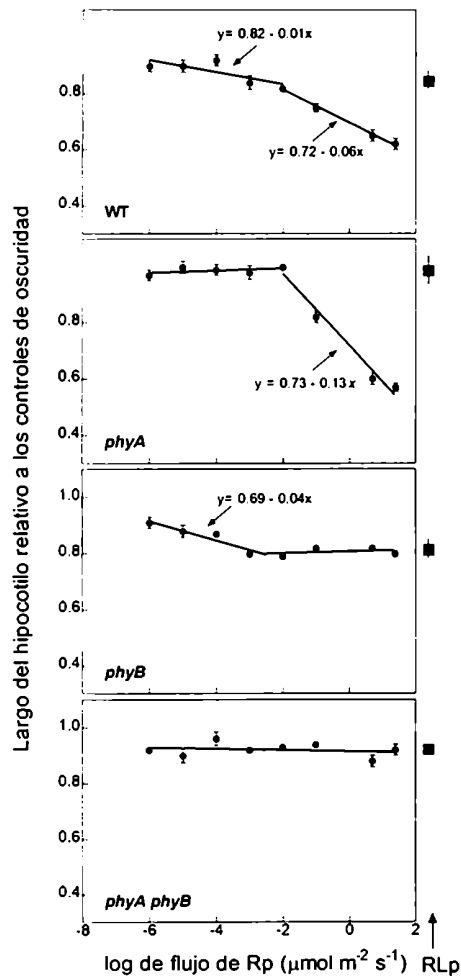


Figura 3.4. Efecto de diferentes flujos de Rp en el largo del hipocotilo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* del WT, *phyA*, *phyB* y *phyA phyB*. Los efectos de RLP (fotoequilibrio= 2.7 %) se muestran a la derecha de cada gráfico. Los datos representan la media \pm E.E de al menos 13 repeticiones.

Estos resultados muestran que el *phyA* es el fotorreceptor involucrado en la percepción de muy bajos flujos de luz R. La eficiencia en la inhibición del alargamiento del hipocotilo fue similar cuando se realizaron exposiciones a luz R continua o a pulsos. El hecho que el mutante de *phyA* presente una mayor pendiente de respuesta en la segunda fase de la curva comparada con la del WT indicaría que el *phyA* interactúa antagonísticamente con el *phyB*.

3.2 DESARROLLO VEGETATIVO Y REPRODUCTIVO EN *ARABIDOPSIS* CON O SIN PHYA, PHYB CRY1 Y CRY2.

Para estudiar las interacciones entre *phyA*, *phyB*, *cry1* y *cry2*, analizamos el comportamiento de todos sus simples, dobles, triples y cuádruple mutantes en diferentes respuestas durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

Des-etiolación

Cuando las plántulas WT son cultivadas bajo luz blanca presentan un desarrollo fotomorfogénico o des-etiolación que incluye la inhibición del crecimiento del hipocotilo ($80\% \pm 1.5\%$ de inhibición comparado con los controles de oscuridad) (Fig. 3.5). Comparado con el WT, la inhibición del crecimiento del hipocotilo fue similar en el mutante simple de *phyA* ($P > 0.01$; Whitelam *et al.*, 1993) y se redujo en los mutantes simples de *phyB* y *cry1* ($P < 0.05$, (Ahmad y Cashmore, 1993; Koornneef *et al.*, 1980; Reed *et al.*, 1993). El mutante de *cry2* fue similar al WT ($P > 0.1$) y esta observación es consistente con resultados previos que muestran un efecto del *cry2* a muy bajos flujos de luz azul (Lin *et al.*, 1998). Con el propósito de analizar el efecto del *cry2* en el crecimiento del hipocotilo con mayor detalle, comparamos los largos de los hipocotilos en aquellas plántulas con o sin *cry2* en los diferentes *backgrounds* genéticos de *phyA* y/o *phyB*, y/o *cry1* (Fig. 3.5). Si bien el mutante de *cry2* no fue más alto que el WT, el doble mutante *cry1 cry2* fue significativamente más alto que el simple mutante *cry1* (largo del hipocotilo (mm) \pm E.E. WT = 1.0 ± 0.1 , *cry2* = 0.9 ± 0.1 , $P > 0.1$; *cry1* = 1.7 ± 0.1 , *cry1 cry2* = 2.3 ± 0.1 , $P < 0.0001$) (Fig. 3.5). Este efecto del *cry2* no fue detectable, sin embargo, en la ausencia de *phyA* y/o *phyB* ($P > 0.1$, Fig. 3.5) (diferencia entre las longitudes de los hipocotilos del *phyA cry1 cry2* y *phyA cry1*, *phyB cry1 cry2* y *phyB cry1* y del *phyA phyB cry1 cry2* y *phyA phyB cry1*). En otras palabras, el *cry2* fue redundante con el *cry1* en la inhibición del crecimiento del hipocotilo pero dependiente de *phyA* y *phyB*.

En luz blanca, el WT, todos los simples, dobles mutantes y triples mutantes *phyA phyB cry2*, *phyA cry1 cry2* y *phyB cry1 cry2* presentaron cotiledones abiertos (ángulo entre los cotiledones \pm E.E., $180^\circ \pm 0^\circ$) (Fig. 3.5). El triple mutante *phyA phyB cry1* presentó

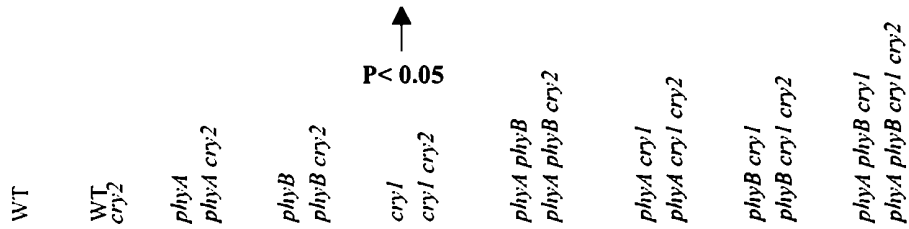


Figura 3.5. Des-etiolación en altos flujos de luz blanca. El WT, y los simples, dobles, triples y cuádruple mutantes de *phyA*, *phyB cry1* y *cry2*, fueron cultivados en fotoperíodos de luz blanca (16 h) u oscuridad (O) por 7 días. No se observaron diferencias significativas entre los genotipos en los controles de oscuridad por esta razón se muestra el WT. La mutación de *cry2* sólo presentó diferencias significativas en el largo del hipocotilo en el *background PHYA PHYB cry1* (el análisis fue realizado con 10 repeticiones (100 semillas) por genotipo). Los recuadros internos muestran (de izquierda a derecha) los cotiledones del WT, *phyA phyB cry1* y *phyA phyB cry1 cry2*.

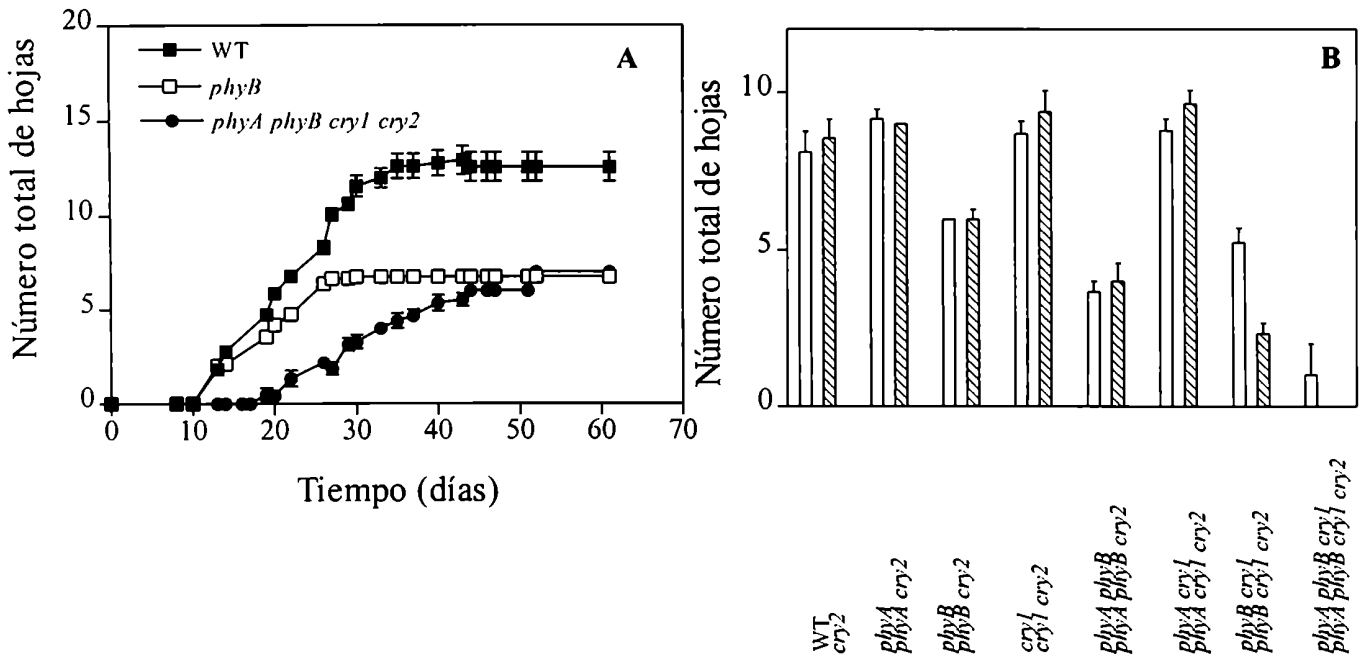


Figura 3. 6. A Tasa de producción de hojas en el WT, y en los mutantes de *phyB* y *phyA phyB cry1 cry2*. B. Número de hojas totales luego de 22 días de crecimiento en fotoperíodos (16 h) de luz blanca. Las barras blancas representan el *background CRY2*, las barras rayadas representan el *background cry2*.

los cotiledones casi completamente abiertos ($150^\circ \pm 29^\circ$), mientras que los cotiledones del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* permanecieron casi completamente cerrados ($6^\circ \pm 2^\circ$) (Fig. 3.5). Así, en la ausencia de *phyA*, *phyB* y *cry1* (comparación entre el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* y el triple mutante *phyA phyB cry1*), el *cry2* fue capaz de mediar la apertura de los cotiledones ($P < 0.05$, Fig. 3.5). Es decir, que el *cry2* fue redundante con el *phyA*, *phyB* y *cry1* para la respuesta de apertura de los cotiledones.

Desarrollo vegetativo: tasa de aparición de hojas.

El número de hojas en un determinado momento está determinado por la tasa en que se producen dichas hojas en el ápice durante la fase vegetativa, y la transición del ápice entre el estado vegetativo y reproductivo (esto trae como consecuencia la detención en la producción de hojas). El mutante de *phyB* fue la única mutación simple que redujo la tasa de aparición de hojas en la fase vegetativa (0.31 ± 0.09 hojas por día) comparada con la del WT (0.57 ± 0.03 hojas/ día) (Fig. 3.6A). En el cuádruple mutante las primeras hojas (aquellas posteriores a los cotiledones) fueron detectadas 10 días mas tarde que en el WT (Fig. 3.6A). Consistentemente con la deficiencia en la des-etiolación del cuádruple mutante, la tasa de aparición de hojas permaneció mas baja en el *phyA phyB cry1 cry2* que en el WT o el simple mutante de *phyB* (Fig. 3.6A). Estos resultados muestran que la consecuencia de una deficiencia en la percepción de luz durante el desarrollo vegetativo no está restringida a la des-etiolación sino que continúa luego de este estadio (ver Fig. 3.7)

La tasa de producción de hojas en los mutantes *phyA*, *cry1* y *cry2* fue similar a aquella del WT (Fig. 3.6B). Sin embargo, la mutación de *phyA* fue perjudicial en el *background* de *phyB* ($P < 0.0001$), la mutación de *cry1* redujo la producción de hojas en los *backgrounds* de *phyA phyB* ($P < 0.001$) o *phyB cry2* ($P < 0.0001$), y la mutación de *cry2* fue efectiva en el *background* de *phyB cry1* ($P < 0.01$) (Fig. 3.6B).

Número final de hojas

Comparado con el WT, la mutación de *cry2* aumentó el número final de hojas ($P < 0.001$, Fig. 3.8A), mostrando un retraso en la transición de la fase vegetativa a la

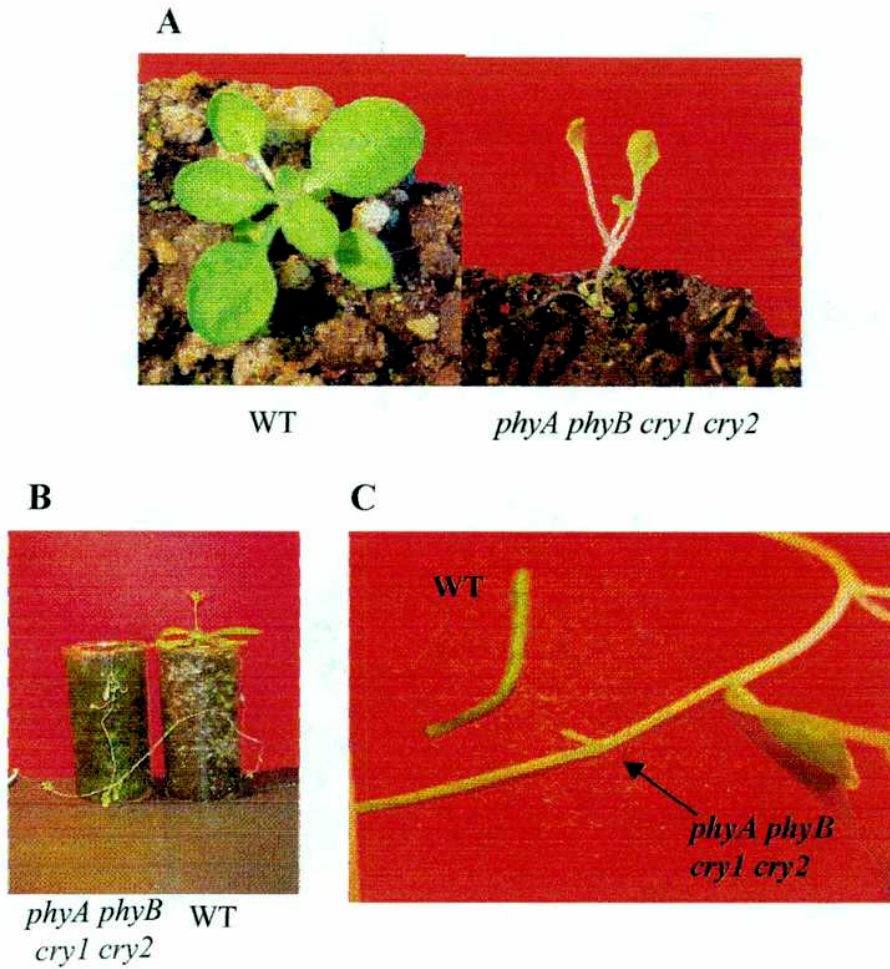


Figura 3.7. A. Desarrollo del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*. El WT y el cuádruple mutante 3 semanas después de la siembra. B. El cuádruple mutante 10 semanas después de la siembra. Para comparar la morfología se muestra un WT de 4 semanas ya que luego de 10 semanas ya ha terminado su ciclo de vida y senesce completamente. C. Desarrollo defectuoso de las primeras silicuas en el cuádruple mutante. Para la comparación se muestra un WT.

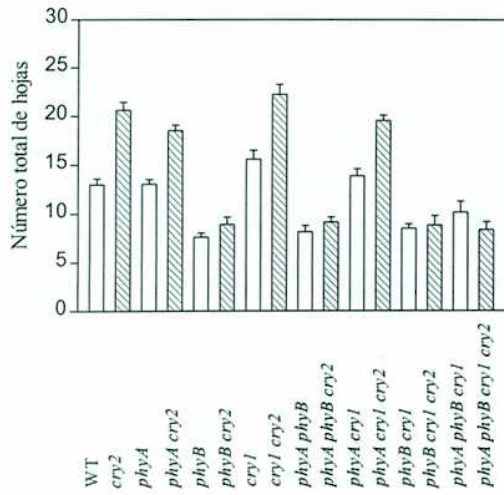
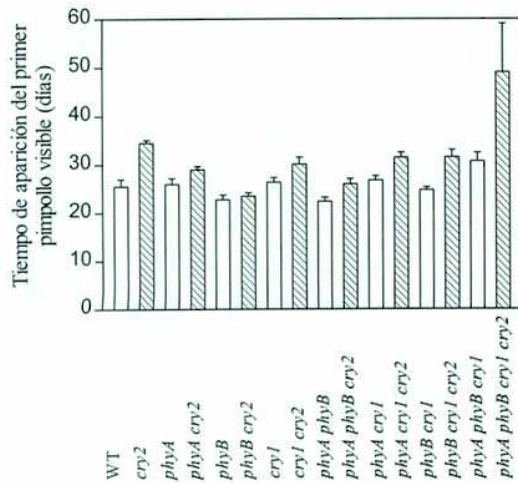
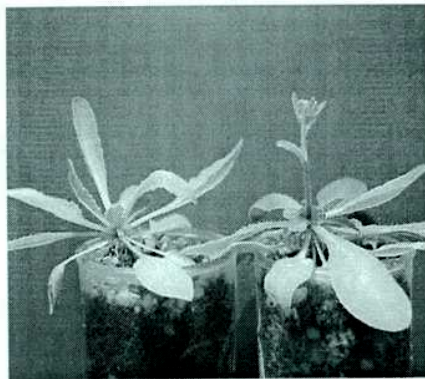
A**B****C***cry2**phyA cry2*

Figura 3.8. A. Tiempo a floración en escala biológica, medida como el número final de hojas en el WT, y todos los simples, dobles, triples y cuádruple mutantes. B. Tiempo a floración en escala cronológica, medido como el tiempo de aparición del primer pimpollo en los mismos genotipos. Las barras blancas representan el *background CRY2* y las rayadas el *background cry2*. C. El mutante *phyA cry2* floreció más tempranamente que el mutante *cry2*.

reproductiva en días largos (Guo *et al.*, 1998). Es interesante notar que, en nuestras condiciones la mutación de *cry1* también aumentó el número de hojas. El doble mutante *cry1 cry2* mostró los efectos aditivos de ambas mutaciones por separado. La mutación de *phyB* redujo el número final de hojas (Mozley y Thomas, 1995), indicando una transición temprana entre la fase vegetativa y reproductiva expresadas como escala biológica (Fig. 3.8A). La mutación de *phyB* fue epistática al *cry2* y al *cry1*. Todas las combinaciones de mutantes que llevaban el alelo *phyB*, incluyendo al cuádruple mutante, florecieron con 7 u 8 hojas ($P > 0.1$; Fig. 3.8A). Es decir que, que grandes diferencias en la tasa de producción de hojas no resultan necesariamente en diferencias en el número final de hojas.

La mutación de *phyA* se sabe que retrasa la floración en plantas de *Arabidopsis* cultivadas en días cortos extendidos con luz incandescente de baja intensidad (ricas en RL)

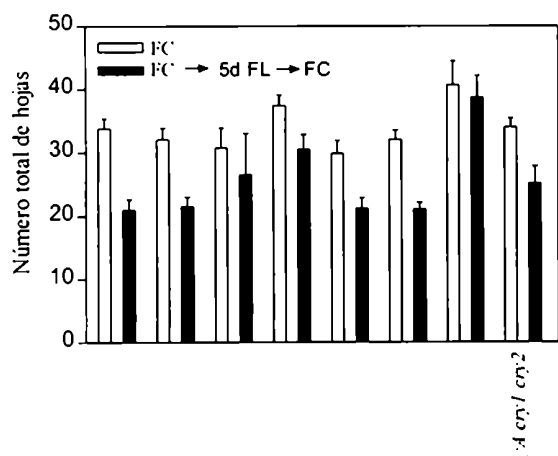


Figura 3. 9. Número final de las hojas totales (hojas de la roseta más hojas del tallo) en plántulas expuestas a fotoperíodos cortos (FC= 8 h), barras vacías; o 21 días en fotoperíodos cortos transferidas 5 días a fotoperíodos largos (16 h) y devueltas a fotoperíodos cortos, barras sombreadas, en el WT y distintos mutantes.

(Johnson *et al.*, 1994). En nuestras condiciones, sin embargo, el mutante de *phyA* produjo el mismo número de hojas que el WT. Además, la mutación de *phyA* causó una pequeña pero estadísticamente significativa reducción en el número final de hojas en los *backgrounds* de *cry1*, *cry2* y *cry1 cry2* (Fig. 3.8A y C). Los efectos de la mutación *phyA* fueron observados en segregaciones independientes de *phyA cry2* y *phyA cry1 cry2* (datos no mostrados). Estos resultados indicarían que no sólo la mutación de *phyB*, sino también la mutación de *phyA* anularía parcialmente el retraso en la floración observadas en los *backgrounds* de *cry1*, *cry2* y *cry1 cry2*.

El inesperado impacto de la mutación de *phyA* fue cuantitativamente más importante en plantas cultivadas en días cortos por 21 días, transferidas a días largos por 5 días consecutivos, y devueltas a días cortos por el resto del ciclo. Comparados con los controles que permanecieron en días cortos, la exposición a 5 días de fotoperíodos largos redujo el número de hojas (es decir, aceleró la floración) en el WT y el mutante de *phyA* (Fig. 3.9). Los efectos de 5 días de fotoperíodos largos fueron menores o nulos en los mutantes *cry1*, *cry2*, y *cry1 cry2*. Interesantemente, la mutación de *phyA* produjo la recuperación parcial de la respuesta a fotoperíodos largos en los *backgrounds* de *cry1*, *cry2* y *cry1 cry2* (Fig. 3.9).

Tiempo de aparición del primer pimpollo visible

El tiempo de aparición del primer pimpollo visible sigue solo *parcialmente* el patrón observado para el número final de hojas. Si bien ambas variables dependen de la transición entre la fase vegetativa y reproductiva, la escala cronológica está afectada por los retrasos generales del desarrollo.

La mutación de *cry2* retrasa el tiempo de aparición del primer pimpollo visible ($P < 0.0001$, Fig. 3.8B) pero no se observaron diferencias significativas entre el WT y el mutante *cry1* ($P > 0.1$, Fig. 3.8B). No se detectaron pimpollos más tempranamente en el mutante de *phyB* comparado con el WT y esto podría reflejar el balance entre la transición a la fase reproductiva en una escala biológica temprana (menor número de hojas) (Fig. 3.8A) y el desarrollo retrasado (como se muestra en la reducción de la tasa de aparición de hojas, Fig. 3.6).

La mutación *phyB* fue epistática a la mutación de *cry2*, y la mutación de *phyA* fue parcialmente epistática a la mutación de *cry2*, como en el caso del número total de hojas. En otras palabras, el retraso observado en el mutante de *cry2* requiere la presencia de *phyB* y en menor medida de *phyA*. Sin embargo, los efectos en el retraso de la floración de la mutación de *cry2* reaparecieron en el *background* de dobles mutantes y fueron muy fuertes en el *background* del triple mutante *phyA phyB cry1*. Este patrón de dependencia y redundancia entre el *cry2* y *phyA* y *phyB* podría ser explicado por el hecho que el tiempo de aparición del primer pimpollo deriva del tiempo de transición entre el estado vegetativo

y reproductivo (donde la actividad del *cry2* depende del *phyA* y *phyB*, Fig. 3.8A) y el desarrollo en general (donde el *cry2* es redundante con otros fotorreceptores, como el observado para la apertura de cotiledones).

Tiempo entre el primer pimpollo visible y antesis

El tiempo entre la aparición del primer pimpollo visible y antesis fue analizado como una medida de la tasa de desarrollo luego de la transición al estado reproductivo. Este período fue largo en los triples mutantes que llevaban el alelo *phyB* (*phyA phyB cry1*, *phyA phyB cry2*, *phyB cry1 cry2*) y en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* ($P < 0.0001$; Fig. 3.10). Comparado con el WT, el mutante de *cry2* mostró retraso en la floración (Fig. 3.8A y B), pero no fue afectado en el tiempo entre la aparición del primer pimpollo visible y antesis ($P > 0.1$). Sin embargo los efectos de la mutación de *cry2* fueron evidentes cuando se compararon los mutantes *phyA phyB* y *phyA phyB cry2* ($P < 0.0001$, Fig. 3.10) así como

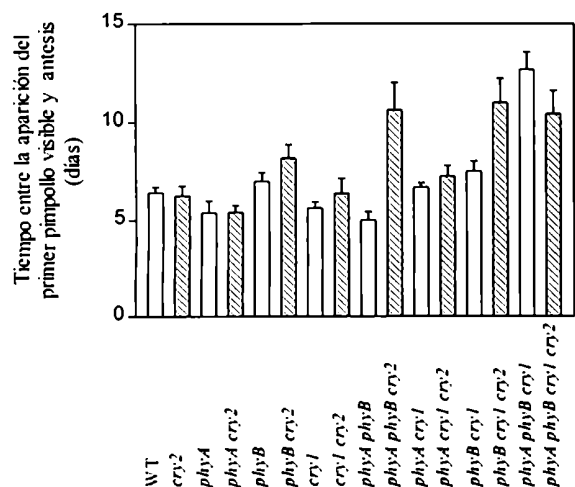


Figura 3.10. Tiempo transcurrido entre la aparición del primer pimpollo visible y antesis. Las barras blancas representan el *background* de *CRY2*, y las rayadas el *background* de *cry2*.

también entre el *phyB cry1* y *phyB cry1 cry2* ($P < 0.0001$, Fig. 3.10), indicando redundancia del *cry2* con el *phyA*, *phyB* y *cry1*.

El cuádruple mutante está severamente afectado en el desarrollo

La mutación de *phyB* incrementó el largo final del vástago pero el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* no fue más alto que el WT y aproximadamente un 30% más corto que el triple mutante *phyA phyB cry1* ($P < 0.05$). Los tallos son débiles y no presentan una posición erecta típica de del ecotipo Landsberg *erecta* (Fig. 3.7B). El cuádruple mutante no produce ramificaciones basales sino que están ubicadas en regiones más apicales. El tallo frecuentemente senece parcialmente mientras que la ramificación continua creciendo (Fig. 3.7B). Los primeros frutos del cuádruple mutante en general se abortan (Fig. 3.7C), sin embargo aquellos frutos que se desarrollan presentan una apariencia normal. Tanto el número reducido de ramificaciones como la falla en el desarrollo de los primeros frutos, reducen considerablemente la producción de semillas. La senescencia del cuádruple mutante está retrasada comparada con la del WT.

3.2.1 CONTROL DE LA ELONGACIÓN DE LOS ENTRENUDOS BASALES EN *ARABIDOPSIS* POR EL *PHYB* Y EL *CRY1*

Durante la caracterización del comportamiento de los mutantes de *Arabidopsis* durante el desarrollo vegetativo notamos que el doble mutante *phyB cry1* presentaba un fenotipo con entrenudos alargados bajo luz blanca. Con el propósito de investigar con mayor detalle el rol y las posibles interacciones entre el *phyB* y el *cry1* en el control del alargamiento de los entrenudos basales analizamos el comportamiento de los mutantes simples de *phyA*, *phyB* y *cry1* y todos sus dobles y triples mutantes cultivados bajo radiación natural o luz blanca y a diferentes temperaturas.

Por otro lado, la correlación entre el alargamiento del tallo y el desarrollo reproductivo es muy común en varias especies que forman rosetas durante las primeras etapas del desarrollo, y decidimos investigar esta correlación por primera vez en nuestro material genético.

Los mutantes *phyB cry1* y *phyA phyB cry1* no producen rosetas normales

Plantas WT, y los mutantes simples, dobles y triples de *phyA*, *phyB* y *cry1*, fueron cultivados bajo radiación natural en un invernáculo. La longitud de los dos primeros entrenudos basales fue de 0 mm en el WT y en los mutantes simples y dobles de *phyA* y *cry1*. La mutación *phyB* aumentó el largo a aproximadamente 0.5 mm, y la combinación simultánea de *phyB* y *cry1* los llevó a aproximadamente 3 mm. Es decir, que la mayoría de los genotipos formaron una roseta normal mientras que los mutantes *phyB cry1* y *phyA phyB cry1* produjeron plantas caulescentes (Fig. 3.11).

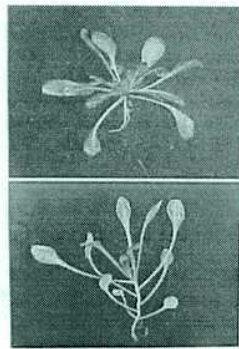


Figura 3.11. Fenotipo del simple mutante *cry1* (arriba) y del triple mutante *phyA phyB cry1* (abajo) de *Arabidopsis* cultivados bajo radiación natural (fotoperíodo: 10 h)

El alargamiento del tallo depende de la temperatura

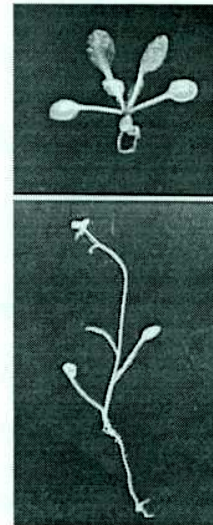
Todos los genotipos fueron cultivados bajo luz blanca continua con tres regímenes de temperatura diferentes: 6° C, 20° C, o alternancia entre 20° C (15 h) y 30° C (9 h). La elongación del primer y segundo entrenudo se observó en los mutantes *phyB cry1* y *phyA phyB cry1* y en menor grado en los mutantes de *phyB* y *phyA phyB* cuando fueron cultivados a 20° C y a 20/30° C (Tabla 3.2). Es decir, a estas temperaturas, el *phyB* y el *cry1* fueron redundantes en el hábito de hacer rosetas ya que la diferencia entre el doble mutante *phyB cry1* con el WT fue mucho mayor que las sumas de las diferencias entre el WT con cada uno de los simples mutantes.

Genotipo	Largo del 1 ^{er} más 2 ^{do} entrenudo (mm)		
	6 °C	20 °C	20-30 °C
WT	0.0± 0.0	0.0± 0.0	0.0± 0.0
<i>phyA</i>	0.0± 0.0	0.0± 0.0	0.0± 0.0
<i>phyB</i>	0.0± 0.0	0.9± 0.1	4.2± 0.7
<i>cry1</i>	0.0± 0.0	0.0± 0.0	0.0± 0.0
<i>phyA phyB</i>	0.0± 0.0	1.3± 0.2	5.9± 1.1
<i>phyA cry1</i>	0.0± 0.0	0.0± 0.0	0.0± 0.0
<i>phyB cry1</i>	0.0± 0.0	3.3± 0.2	7.0± 1.5
<i>phyA phyB cry1</i>	0.0± 0.0	3.9± 0.3	8.4± 0.8

Tabla 3.2. Largo final del primer más segundo entrenudo del WT y los simples mutantes *phyA*, *phyB*, y *cry1* y todas sus combinaciones de dobles y triples mutantes cultivados bajo luz blanca continua a 6 °C, 20 °C o 20/30 °C (15 h/ 9 h). Los datos representan la media ± E.E. de 18 repeticiones.

A estas temperaturas, el primer entrenudo en ausencia de *phyB* y *cry1* ya estaba elongado mientras que las plantas WT comenzaron la extensión en el quinto (20° C) o cuarto (20/30° C) entrenudo (datos no mostrados). A bajas temperaturas (6° C) todos los genotipos formaron rosetas normales (Fig. 3.12) ya que no se observó elongación del primer entrenudo basal para ningún caso (Tabla 3.12).

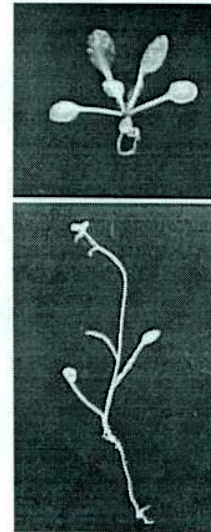
Figura 3.12. Fenotipos del triple mutante *phyA phyB cry1* de *Arabidopsis* cultivados bajo luz blanca a 6 ° C (arriba) o a 20 ° C (abajo).



Si bien el hábito de hacer rosetas en los mutantes *phyB cry1* y *phyA phyB cry1* fue totalmente dependiente de la temperatura, la elongación de los hipocotilos en plántulas jóvenes de estos mutantes fue evidente tanto a bajas como altas temperaturas (Tabla 3.3). Otra diferencia entre plántulas jóvenes y plantas más maduras fue que el hipocotilo del doble mutante *phyA phyB* fue más largo que en el simple mutante de *phyB*, y el del triple mutante *phyA phyB cry1* fue más largo que el del doble mutante *phyB cry1*. En otras palabras, el efecto de la mutación de *phyA* fue evidente en la elongación del hipocotilo pero no se observó un efecto sobre la elongación de los entrenudos.

A estas temperaturas, el primer entrenudo en ausencia de *phyB* y *cry1* ya estaba elongado mientras que las plantas WT comenzaron la extensión en el quinto (20° C) o cuarto (20/30° C) entrenudo (datos no mostrados). A bajas temperaturas (6° C) todos los genotipos formaron rosetas normales (Fig. 3.12) ya que no se observó elongación del primer entrenudo basal para ningún caso (Tabla 3.12).

Figura 3.12. Fenotipos del triple mutante *phyA phyB cry1* de *Arabidopsis* cultivados bajo luz blanca a 6 ° C (arriba) o a 20 ° C (abajo).



Si bien el hábito de hacer rosetas en los mutantes *phyB cry1* y *phyA phyB cry1* fue totalmente dependiente de la temperatura, la elongación de los hipocotilos en plántulas jóvenes de estos mutantes fue evidente tanto a bajas como altas temperaturas (Tabla 3.3). Otra diferencia entre plántulas jóvenes y plantas más maduras fue que el hipocotilo del doble mutante *phyA phyB* fue más largo que en el simple mutante de *phyB*, y el del triple mutante *phyA phyB cry1* fue más largo que el del doble mutante *phyB cry1*. En otras palabras, el efecto de la mutación de *phyA* fue evidente en la elongación del hipocotilo pero no se observó un efecto sobre la elongación de los entrenudos.

Genotipo	Longitud del hipocotilo (mm)		
	6 °C	20 °C	20-30 °C
WT	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	3.1 ± 0.1
<i>phyA</i>	1.8 ± 0.2	1.3 ± 0.1	3.3 ± 0.1
<i>phyB</i>	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1	3.3 ± 0.3
<i>cry1</i>	3.2 ± 0.3	2.7 ± 0.2	6.0 ± 0.2
<i>phyA phyB</i>	5.4 ± 0.5	3.4 ± 0.4	7.8 ± 0.4
<i>phyA cry1</i>	2.8 ± 0.4	2.1 ± 0.1	5.0 ± 0.4
<i>phyB cry1</i>	3.9 ± 0.4	4.7 ± 0.3	7.3 ± 0.2
<i>phyA phyB cry1</i>	6.6 ± 0.5	9.3 ± 0.4	10.7 ± 0.4

Tabla 3.3. Longitud del hipocotilo del WT y los simples mutantes *phyA*, *phyB* y *cry1* y todas sus combinaciones de dobles y triples mutantes cultivados bajo luz blanca continua a 6 ° C, 20 ° C o 20/30 ° C (15 h/ 9 h). Los datos representan la media ± E.E de 13 repeticiones.

La elongación de los entrenudos basales no se correlaciona con el número de hojas finales

Teniendo en cuenta que la elongación del tallo acompaña la floración en *Arabidopsis*, investigamos si la extensión de los entrenudos basales estaba asociada a una floración más temprana. El número total de hojas fue utilizado como escala de tiempo biológica para comparar las plantas en los distintos regímenes de temperatura. Si la extensión del tallo estuviera inevitablemente ligada al desarrollo reproductivo, la mayor elongación del mismo debería estar correlacionada con un menor número de hojas totales (indicación de floración temprana). A 20° C, los mutantes *phyB cry1* y *phyA phyB cry1* mostraron elongación de sus entrenudos basales (Tabla 3.2) sin embargo no produjeron menor número de hojas que el WT (Tabla 3.4). Esto indicaría que la elongación temprana de los entrenudos no está inevitablemente asociada a un cambio temprano del ápice de producir hojas a producir flores.

Genotipo	Número total de hojas		
	6 °C	20 °C	20-30 °C
WT	24.4± 1.1	7.0± 0.3	5.9± 0.1
<i>phyA</i>	24.7± 0.9	8.0± 0.5	6.2± 0.2
<i>phyB</i>	32.1± 1.3	7.0± 0.3	5.1± 0.1
<i>cry1</i>	27.4± 1.5	8.8± 0.6	6.4± 0.2
<i>phyA phyB</i>	27.1± 1.0	7.2± 0.3	5.1± 0.1
<i>phyA cry1</i>	25.7± 1.4	9.9± 0.4	5.9± 0.1
<i>phyB cry1</i>	26.2± 0.9	7.8± 0.4	4.7± 0.1
<i>phyA phyB cry1</i>	24.1± 1.0	7.2± 0.3	5.1± 0.1

Tabla 3.4. Número total de hojas del WT y los simples mutantes *phyA*, *phyB*, *cry1* y todas sus combinaciones de dobles y triples mutantes cultivados bajo luz blanca continua a 6° C, 20° C o 20/30 ° C (15 h/ 9 h). Los datos representan la media ± E.E. de 18 repeticiones.

Es interesante destacar que el número de hojas resultó de la interacción entre los genotipos y la temperatura. Por ejemplo, el doble mutante *phyA cry1* mostró el mismo número de hojas que el WT a 20/30° C, pero tuvo un número mayor de hojas a 20° C (Tabla 3.4).

La elongación del entrenudo en la ausencia de *phyB* y *cry1* anticipa la transición al desarrollo reproductivo

Si bien la elongación del entrenudo no estaba asociada a una floración más temprana, los datos anteriormente mostrados no excluyen la posibilidad que el crecimiento del tallo suceda sólo una vez que el ápice ya halla sufrido la transición al desarrollo reproductivo. Para investigar esta posibilidad, plántulas WT y dobles mutantes *phyB cry1* fueron cultivadas bajo fotoperíodos cortos (7 h) de luz blanca para retrasar la floración. Luego de 30 días a 18° C, no se observó elongación de los entrenudos. Entonces las

plántulas fueron transferidas a 25° C donde se observó un rápido incremento en la elongación del tallo de los mutantes *phyB cry1* (Fig 3.13).

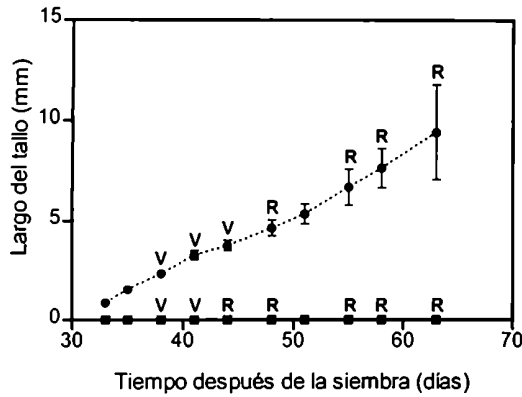


Figura 3.13. Largo del tallo en función del tiempo (elongación de todos los entrenudos) en el WT (cuadrados) y el *phyB cry1* (círculos) expuestos a fotoperíodos cortos (7 h luz/17 h oscuridad). El estadio del desarrollo del ápice se indica arriba de cada dato (V= vegetativo, R= reproductivo). Los datos de largo del tallo son las medias de 30 plantas \pm E.E. Al menos tres plantas fueron cosechadas para la disección del ápice

La disección del ápice indicó que el alargamiento del tallo se produjo antes de la transición del ápice del estado vegetativo al estado reproductivo (Fig. 3.13). En el WT, la elongación del tallo no se detectó incluso luego de varios días de haberse producido la transición del ápice al estado reproductivo (Fig. 3.13). Esto es consistente con la observación que la elongación de la inflorescencia y el alargamiento del tallo ocurren sólo luego de que se forman cuatro a siete yemas cubiertas por sépalos en el ápice (Smyth *et al.*, 1990).

3.3 INTERACCIONES ENTRE PHYA, PHYB, CRY1 Y CRY2 EN CONDICIONES DE RADIACIÓN NATURAL

Para investigar la ocurrencia de interacciones entre fotorreceptores durante la des-etiolación en condiciones de radiación natural analizamos el comportamiento de los mutantes simples, dobles, triples y cuádruple de *phyA*, *phyB*, *cry1* y *cry2* en respuesta a diferentes irradiancias y diferentes fotoperíodos.

Des-etiolación bajo diferentes niveles de irradiancia

El comportamiento de los mutantes simples

La longitud de los hipocotilos del WT cultivados en invernáculo (fotoperíodo aprox. 10 h) decreció linealmente con el logaritmo de la proporción de la radiación natural incidente (Fig. 3.14A). Comparado con el WT, la ausencia de *phyA* tuvo pocos efectos sobre el crecimiento del hipocotilo en cualquiera de los flujos estudiados (Fig. 3.14A). La ausencia de *phyB* redujo la inhibición del hipocotilo independientemente del flujo, ya que el mutante de *phyB* mostró una respuesta lineal con una pendiente WT pero corrida hacia flujos más altos (Fig. 3.14A). El mutante *cry1* fue más largo que el WT sólo a flujos altos de irradiancia (Fig. 3.14A y B), ya que mostró una reducción de la pendiente de respuesta a la irradiancia ($P < 0.001$). La longitud del hipocotilo de la mutante de *cry2* fue similar al del WT para cualquier irradiancia (Fig. 3.15A)

*Los efectos mediados por el *phyB* fueron mayores en ausencia de *phyA**

A cualquier irradiancia, el impacto de la falta simultánea de *phyA* y *phyB* fue mayor que el impacto de la falta de cada uno por separado. El doble mutante *phyA phyB* fue más alto que el simple mutante *phyB*, si bien el mutante de *phyA* no mostró diferencias con el WT (Fig. 3.14A). Es decir, que el *phyA* y el *phyB* mostraron redundancia. Comparado con el WT, la recta de respuesta del doble mutante *phyA phyB* estuvo no sólo corrida hacia flujos más altos, sino que también mostró menor pendiente en respuesta a la irradiancia

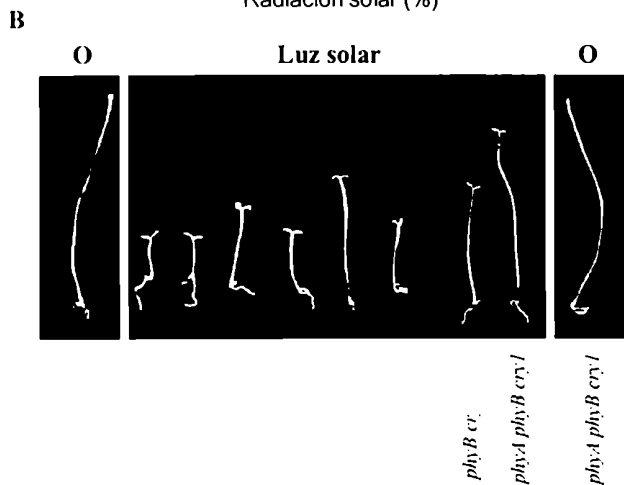
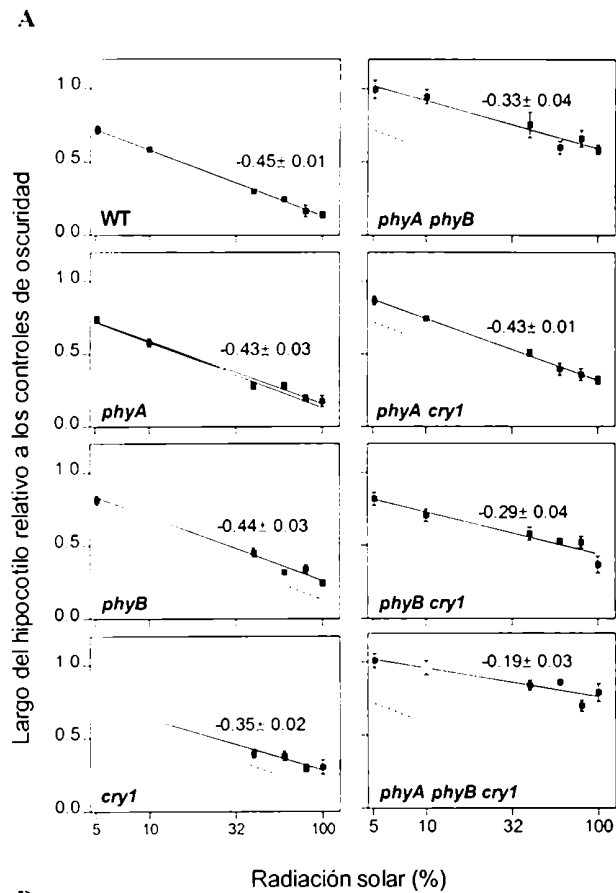


Figura 3.14. Longitud de los hipocotilos relativa a la de los controles en oscuridad en el WT, y mutantes simples, dobles y triples de *phyA*, *phyB* y *cry1* cultivados bajos distintos flujos de radiación natural (escala logarítmica). Están indicadas las pendientes \pm E.E. La línea punteada representa la respuesta del WT. B. Plántulas del WT y mutantes simples, dobles y triples de *phyA*, *phyB* y *cry1* cultivados bajos luz solar (100%). O: controles de oscuridad.

($P < 0.05$). Esta característica no se observó en ninguno de los dos simples mutantes (Fig. 3.14A). La redundancia observada podría ser explicada por la interacción antagónica observada en condiciones controladas entre el phyA actuando en la forma VLFR sobre el LFR del phyB (Fig. 3.1). El phyA activado en su forma VLFR produce por un lado la inhibición del alargamiento del hipocotilo, y por otro lado reprime la acción del phyB sobre esta misma respuesta (Fig. 3.1). Por esta razón el fenotipo del simple mutante *phyA* no presenta diferencias con respecto al WT. Sin embargo, en ausencia del phyB se pierde el efecto negativo del phyA sobre el phyB (diferencia en los hipocotilos entre el *phyB* y el *phyA phyB*). La respuesta del VLFR podría operar en plántulas expuestas a la luz solar ya que se encontraría muy por arriba del mínimo requerimiento de luz necesario para inducir este tipo de respuestas.

A bajas irradiancias la actividad del cry1 es obvia en presencia del phyB y ausencia del phyA

El comportamiento del doble mutante de *phyA cry1* no puede ser explicado por el comportamiento de los simples mutantes. La pendiente del mutante *cry1* se redujo mientras que la del doble mutante *phyA cry1* no se vio afectada comparada con la del WT (Fig. 3.14A). En otras palabras, en los flujos más bajos, el mutante de *phyA*, y el mutante de *cry1* mostraron la misma inhibición del crecimiento del hipocotilo que el WT, mientras que la doble mutante *phyA cry1* fue mayor (Fig. 3.14A). Esto indicaría que la actividad del *cry1* podría ser observada no sólo a altas sino también a bajas irradiancias. Sin embargo, la actividad del *cry1* a 5% de luz solar no fue evidente ni en la ausencia de phyB (diferencia en la inhibición de los hipocotilos entre el *phyB cry1* y el mutante *phyB*) ni en la presencia de phyA (diferencia en la inhibición de los hipocotilos entre el WT y el mutante *cry1*). El requerimiento de phyB es consistente con observaciones realizadas bajo condiciones controladas que mostraron que la actividad del *cry1* necesita phyB activo cuando las condiciones de luz son sub-óptimas, es decir que el *cry1* y el phyB operan sinérgicamente (Casal y Mazzella, 1998). El requerimiento de la mutación de *phyA* podría resultar del hecho que el phyA actuando en su forma HIR también puede operar sinérgicamente con el phyB (Casal, 1995; Cerdán *et al.*, 1999; Hennig *et al.*, 1999a). En

otras palabras el *phyA* y el *cry1* podrían ser redundantes en su interacción sinérgica con el *phyB*. Aún el 5 % de irradiancia contendría la suficiente cantidad de RL para activar al *phyA* vía HIR (Casal, 2000).

La actividad del cry2 es evidente en ausencia del cry1 y presencia de phyA y phyB

Bajo luz solar directa, el mutante de *cry2* no mostró diferencias con el WT, pero el doble mutante *cry1 cry2* fue más alto que el simple mutante de *cry1* (Fig. 3.15A). El *cry2* es capaz de inhibir el crecimiento del hipocotilo en ausencia del *cry1* indicando que ambos fotorreceptores actúan redundantemente. La respuesta del *cry2* no mostró dependencia de la irradiancia (Fig. 3.15B). El efecto de la mutación de *cry2* fue obvia en la ausencia de *cry1* pero no en la ausencia simultánea de *phyA* y *cry1*, *phyB* y *cry1* o *phyA*, *phyB* y *cry1* (Fig. 3.15C). Es decir, que la inhibición del hipocotilo mediada por el *cry2* requiere la ausencia de *cry1* y la presencia simultánea de *phyA* y *phyB*. Estos resultados fueron consistentes con aquellos obtenidos en laboratorio con plántulas expuestas a fotoperíodos largos de luz blanca (Fig. 3.5). Este comportamiento se asemeja en algún punto a los efectos del *cry2* sobre la inducción de la floración, donde el *cry2* y el *cry1* son también redundantes y el *cry2* requiere la presencia de *phyB* (Lin *et al.*, 1998). Sin embargo, hay una diferencia importante, ya que el rol del *cry2* en las respuestas de floración es dominante sobre el de *cry1*. En condiciones controladas, la inhibición del crecimiento del hipocotilo mediada por el *cry2* ha sido documentada en plántulas cultivadas a muy bajos flujos de luz azul (Lin *et al.*, 1998). La deficiencia a flujos altos ha sido explicada por la reducción de los niveles de la proteína *cry2* en luz azul (Lin *et al.*, 1998). Los efectos observados aún bajo luz solar directa podrían eventualmente reflejar la reacumulación de *cry2* durante la noche.

La inhibición del crecimiento del hipocotilo en el cuádruple mutante es muy débil

El cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* retiene aún el 10 % de la inhibición del crecimiento del hipocotilo en respuesta a la luz solar (Fig. 3.15C), sugiriendo que otro/s fotorreceptor/s podrían estar involucrados en la inhibición del hipocotilo. *A priori*, el *phyD*

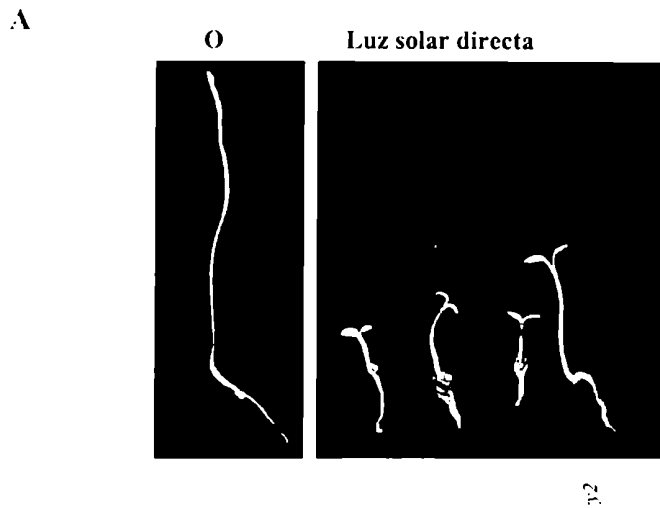
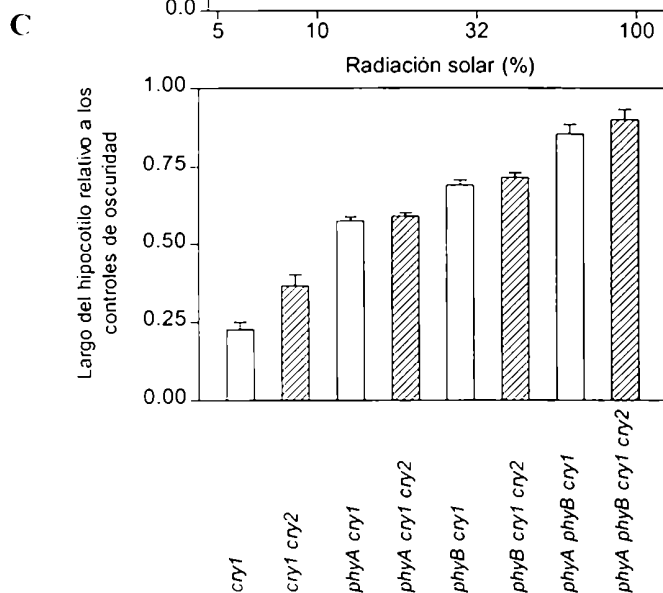
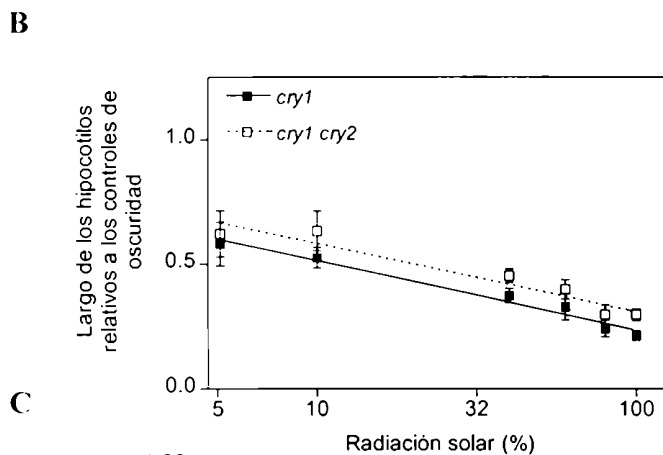


Figura 3. 15. A. Plántulas del WT, y los mutantes *cry1*, *cry2* y *cry1 cry2* cultivados bajo luz solar. (100%). O: controles de oscuridad. B. Longitud del hipocotilo de los mutantes *cry1* y *cry1 cry2* cultivados bajo distintos flujos de radiación natural (escala logarítmica). C. Efectos de la mutación *cry2* en la longitud del hipocotilo en diferentes *backgrounds* bajo luz solar (100 %). Las barras vacías representan el *background* de *CRY2*, las barras rayadas representan el *background* de *cry2*.



podría ser un candidato (Aukerman *et al.*, 1997). Sin embargo, el efecto residual en el cuádruple mutante fue observado bajo radiación natural pero no bajo luz artificial (Fig. 3.5). Esto sugeriría que las longitudes de onda corta (proporcionalmente más importantes bajo luz solar que en las fuentes de laboratorio) podrían ser percibidas por fotorreceptores nuevos (por ejemplo UV-B).

Des-etiolación en diferentes fotoperíodos

Plántulas del WT, mutantes de *phyA*, *phyB* y *cry1* y todos los dobles y triples mutantes fueron expuestas durante 6 días a diferentes fotoperíodos (11 h o 5 h) (Fig. 3.16). Las plántulas WT cultivadas bajo fotoperíodos más largos produjeron hipocotilos más cortos (Fig. 3.16). La respuesta al fotoperíodo fue similar al WT en cualquiera de los simples y dobles mutantes (Fig. 3.16). El triple mutante *phyA phyB cry1* fue el único mutante que falló en la inhibición del crecimiento del hipocotilo en respuesta a fotoperíodos más largos (Fig.3.16). Así, el *phyA*, *phyB* y *cry1* fueron mutuamente redundantes en la inhibición del crecimiento del hipocotilo en respuesta al fotoperíodo.

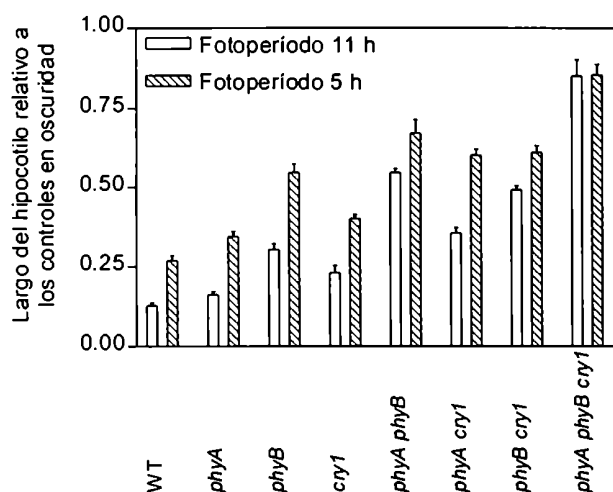


Figura 3.16. Longitud del hipocotilo del WT, y los mutantes simples, dobles y triple de *phyA*, *phyB* y *cry1* cultivados en diferentes fotoperíodos (11 h o 5 h) bajo radiación natural.

El *cry2* tiene un rol fundamental en la percepción del fotoperíodo para la inducción de la floración (Guo *et al.*, 1998). Para investigar el rol del *cry2* en la percepción del fotoperíodo en la inhibición del hipocotilo, plántulas del WT, los mutantes *cry1*, *cry2* y el

doble mutante *cry1 cry2* fueron expuestos a fotoperíodos de 11 h o 5 h (Fig. 3.17). La respuesta al fotoperíodo fue normal en los simples mutantes *cry1* y *cry2* pero se redujo significativamente ($P < 0.05$) en el doble mutante *cry1 cry2* (Fig. 3.17). Es decir, que el *cry1* y el *cry2* fueron redundantes en el control del crecimiento del hipocotilo en respuesta al fotoperíodo. La respuesta al fotoperíodo mediada por el *cry2* se pierde en el triple mutante *phyA phyB cry1* (Fig. 3.16), apoyando la idea que el *cry2* requiere la presencia de *phyA* y *phyB*.

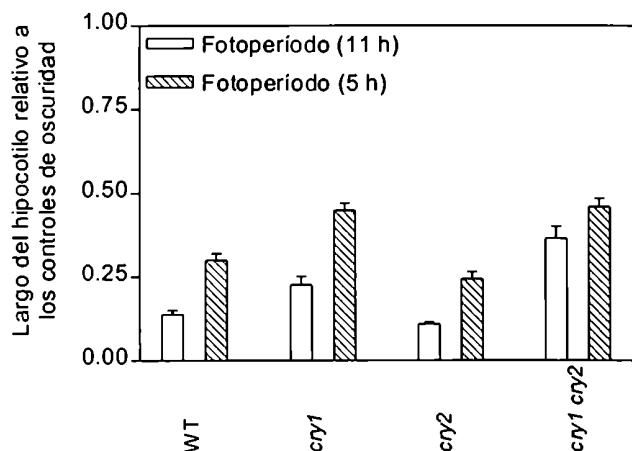


Figura 3.17. Longitud del hipocotilo en el WT y los mutantes *cry1*, *cry2* y *cry1 cry2*, cultivados bajo distintos fotoperíodos de radiación natural.

El impacto de las interacciones

El efecto de la irradiancia

Para investigar el impacto de las interacciones en respuesta a la irradiancia, se calculó la inhibición del crecimiento del hipocotilo incluyendo o excluyendo las interacciones. La diferencia en las longitudes entre el WT y el triple mutante *phyA phyB cry1* da una estimación de la actividad de cada uno de estos fotorreceptores más las interacciones entre ellos. Las sumas de las diferencias en las longitudes entre los mutantes *phyA phyB cry1* y el *phyB cry1*, entre el *phyA phyB cry1* y *phyA cry1* y entre *phyA phyB cry1* y *phyA phyB*, da una estimación de la inhibición del crecimiento del hipocotilo causada por el *phyA*, *phyB* y *cry1* en ausencia de interacciones., respectivamente. Hay que destacar que si bien los efectos del *cry2* fueron obvios en el *background* de *PHYA PHYB*

cry1, no fueron observados en el background de *phyA PHYB cry1*, *PHYA phyB cry1* o *phyA phyB cry1* (Fig. 3.15C). Por lo tanto el *cry2* no interfiere en los cálculos anteriores.

Comparado con el modelo aditivo (suma independiente de la actividad de cada fotorreceptor), el modelo incluyendo interacciones reduce la pendiente de la relación entre inhibición del crecimiento del hipocotilo e irradiancia en un 44 % (Fig. 3.18). Es decir, que las interacciones entre *phyA*, *phyB* y *cry1* pueden proveer homeostasis contra cambios en la irradiancia.

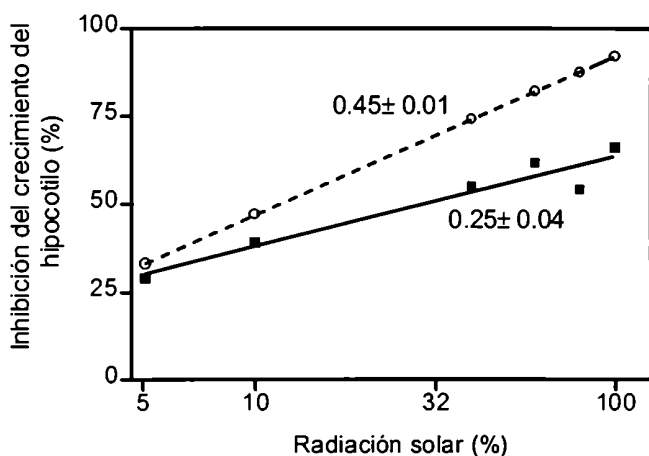


Figura 3.18. El impacto de las interacciones entre el *phyA phyB* y *cry1* en el alargamiento del hipocotilo bajo diferentes irradiancias de luz natural. Los efectos individuales del *phyA*, *phyB* y *cry1* y las interacciones entre ellos (línea sólida) fueron calculados como la diferencia en los largos de los hipocotilos (relativos a los controles en oscuridad) entre el triple mutante *phyA phyB cry1* y el WT para cada nivel de irradiancia. Los efectos de *phyA*, *phyB* y *cry1* en la ausencia de interacciones (línea punteada) fueron calculados como las diferencias en los largos de los hipocotilos (relativos a los controles de oscuridad) entre los mutantes *phyA phyB cry1* y *phyB cry1*, más la diferencia entre el *phyA phyB cry1* y *phyA cry1*, más la diferencia entre el *phyA phyB cry1* y *phyA phyB* para cada nivel de irradiancia. Se muestran los valores de las pendientes \pm E.E.

El efecto del fotoperíodo

El efecto de diferentes fotoperíodos en la inhibición del crecimiento del hipocotilo fue calculado incluyendo o excluyendo las interacciones. Dado que el triple mutante *phyA phyB cry1* falló en responder a los fotoperíodos (Fig. 3.16), la diferencia entre el WT cultivado en días largos en comparación con días cortos provee una estimación de la acción

de *phyA*, *phyB* y *cry1* y sus interacciones. La suma de las respuestas al fotoperíodo en los mutantes *phyB cry1*, *phyA cry1* y *phyA phyB* da una estimación de la acción del *phyA*, *phyB* y *cry1* sin interacciones (en estos *backgrounds* el *cry2* no es efectivo). Las interacciones entre *phyA*, *phyB* y *cry1* causaron un 70% de reducción del efecto del fotoperíodo (Fig. 3.19). Es decir, que las interacciones entre *phyA*, *phyB* y *cry1* pueden proveer homeostasis contra los cambios en la longitud del fotoperíodo.

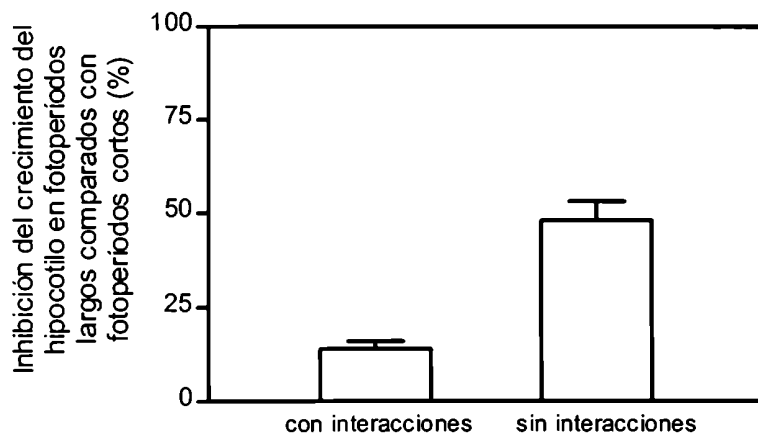


Figura 3.19. El impacto de las interacciones entre el *phyA phyB* y *cry1* en el alargamiento del hipocotilo en respuesta a fotoperíodos largos comparados con fotoperíodos cortos. Los efectos individuales del *phyA*, *phyB* y el *cry1* y las interacciones entre ellos fueron calculados como la diferencia en los largos de los hipocotilos (relativos a los controles en oscuridad) entre el WT cultivado en fotoperíodos largos y fotoperíodos cortos. Los efectos de *phyA*, *phyB* y *cry1* en la ausencia de interacciones fueron calculados como la suma de la respuesta al fotoperíodo de los mutantes *phyB cry1*, *phyA cry1* y *phyA phyB*.

Cuál es el impacto de las interacciones del cry2?

El efecto del *cry2* fue indetectable en presencia del *phyA*, *phyB* y *cry1* (WT comparado con el mutante *cry2*) pero también fue indetectable en ausencia de *phyA*, *phyB* y *cry1* (*phyA phyB cry1* comparado con *phyA phyB cry1 cry2*). Es decir, que el balance de las interacciones que involucran al *cry2* es nulo. Si el análisis se restringe a las interacciones entre *cry1* y *cry2*, la redundancia entre estos fotorreceptores no afecta la respuesta a la irradiancia (el *cry1* y el doble mutante *cry1 cry2* tienen la misma pendiente

de respuesta, Fig. 3.15B) pero reduce el efecto de los fotoperíodos (Fig. 3.17). De hecho, la respuesta al fotoperíodo del WT menos la respuesta del doble mutante *cry1 cry2* (efecto del *cry1* y del *cry2* más interacciones) es menor que la respuesta del mutante *cry1* menos la respuesta del *cry1 cry2* (efecto del *cry2* solo) más la respuesta del *cry2* menos la respuesta del *cry1 cry2* (efecto del *cry1* solo).

4. DISCUSIÓN

Las plantas obtienen información del ambiente que las rodea, mediante la percepción de los cambios en la cantidad, calidad y dirección de la luz, que se traducen en modificaciones en el estado de los fotorreceptores, y así ajustan sus patrones de crecimiento y desarrollo. Los fitocormos (phyA y phyB), que perciben principalmente luz R y RL y los criptocromos (cry1 y cry2), que perciben la luz azul y UV-A, son los dos sistemas de fotorreceptores fotomorfogénicos hasta el momento identificados y clonados, y por lo tanto los más estudiados.

Para acomodar el metabolismo y el desarrollo a las condiciones ambientales las plantas integran diferentes estímulos con señales internas. Hasta hace unos años atrás, las secuencias de los caminos bioquímicos iniciados luego de la percepción eran representados como cascadas independientes de señalización. La evidencia experimental comienza a mostrar, sin embargo, que la interacción entre los caminos de transducción es significativa en plantas. Por ejemplo, se ha observado interacción entre los caminos de transducción iniciados por la percepción de luz R y los derivados por el ataque de patógenos en el control del sistema de defensa (Genoud *et al.*, 1998), entre los caminos iniciados por la luz y la sacarosa en la des-etiolación (Dijkwel *et al.*, 1997), entre las señales ontogénicas, la luz y la temperatura en el control de la floración (Levy y Dean 1998), y entre sistemas de fotorreceptores en el control de distintos aspectos del desarrollo (Casal, 2000). El análisis del comportamiento de los mutantes múltiples realizado en esta tesis ha permitido explorar el circuito de señalización de los fotorreceptores y revelar funciones no conocidas de los mismos. Así mismo, los experimentos realizados en condiciones de radiación natural proveen un nuevo escenario en relación al significado ecológico de las interacciones.

4.1 El phyA media las respuestas a muy bajos flujos de luz R continua.

Los resultados presentados en la sección 3.1 muestran que la fotomorfogénesis bajo luz R no está exclusivamente mediada por el phyB, dado que el phyA es necesario para detectar muy bajos flujos de luz Rc. Las plántulas WT mostraron dos fases lineares en respuesta a distintos flujos de Rc (Fig. 3.1 y 3.2). Clásicamente se han definido tres modos

de acción de los fitocromos: el VLFR, el LFR y el HIR (Kronenberg y Kendrick, 1986; Mancinelli, 1994). La primera parte de la respuesta al Rc puede considerarse una respuesta del tipo VLFR ya que la máxima inhibición alcanzada fue equivalente a la causada por RLp (que establecen una muy baja proporción de Pfr, aproximadamente 2.7 %) (Fig. 3.2 y 3.4). En *Arabidopsis*, esta primera fase de la respuesta (el VLFR) no fue afectada por la mutación de *phyB* pero fue eliminada en el mutante de *phyA* y doble mutante de *phyA phyB* (Fig. 3.1 y 3.4). En tabaco, la sobreexpresión de *phyA* aumentó la respuesta en la región del VLFR (Fig. 3.2). Puede concluirse entonces que bajo luz R el *phyA* actúa en el modo VLFR. La segunda parte de la curva puede considerarse del modo LFR pues este tipo de respuestas son R/RL reversibles y los tratamientos con Rc pueden ser substituidos por Rp (efectos inductivos) (Fig. 3.1 y 3.4), además este efecto puede ser revertido por RLp (Casal *et al.*, 1995). La fase correspondiente al LFR es mediada por el *phyB* y no por el *phyA*.

Si bien ya se había demostrado que un pulso de R era capaz de inducir respuestas del tipo VLFR mediadas por el *phyA* (Botto *et al.*, 1996), lo novedoso de las observaciones presentada aquí radica en demostrar que el R es incapaz hacer actuar al *phyA* en el modo HIR, que es el modo de acción del *phyA* más importante bajo luz RLc. La característica distintiva de las respuestas del tipo HIR es que no obedecen la ley de la reciprocidad (los tratamientos con luz continua son más efectivos que los pulsos a igual cantidad de fotones en cada tratamiento) (Mancinelli, 1980). Los Rp fueron igual o incluso más (no menos) efectivos que la luz Rc (Fig. 3.1 y Tabla 3.1). Es decir, que usando la falla en la ley de reciprocidad como criterio, no se observó una respuesta del tipo HIR bajo Rc, y esto es consistente con observaciones previas realizadas en plántulas etioladas de *Sinapis alba* (Heim y Schäfer, 1984; 1982; Schäfer *et al.*, 1981). El hecho de que no exista falla en la reciprocidad en Rc no fue debido a una reducción en la eficiencia del Rc por absorción de la clorofila (Tabla 3.1). Bajo RLc existe falla de la ley de reciprocidad (Heim y Schäfer, 1984) y este efecto está mediado por el *phyA* (Fig. 3.3A y C).

La adición de Rc a un background de RLc redujo la respuesta HIR provocada por el RLc (Fig. 3.3B). Bajo luz R se reducen fuertemente los niveles de *phyA* permitiendo explicar la ausencia de una respuesta del tipo HIR bajo luz Rc. Sin embargo, por un lado, en la ausencia de *phyB*, la inhibición del crecimiento del hipocotilo mediada por el *phyA* puede ser detectada a flujos relativamente altos de Rc (Fig. 3.1); y por el otro, las grandes

cantidades de phyA en plántulas de tabaco son suficientes para incrementar la inhibición del crecimiento del hipocotilo pero no para causar una respuesta del tipo HIR bajo Rc (Tabla 3.1). Estos resultados han contribuido al desarrollo de la idea que el phyA es capaz de operar por dos vías de señalización diferentes, dando lugar a las respuestas del tipo VLFR y HIR. Desde la publicación de estas observaciones (Mazzella *et al.*, 1997) se han obtenido evidencias genéticas y moleculares a favor de esta idea. Por ejemplo, las respuestas VLFR y HIR son separables pues la caracterización de dos ecotipos naturales de *Arabidopsis*, Landsberg *erecta* y Columbia reveló diferencias entre los mismos en las respuestas VLFR, pero no en las HIR, identificándose dos loci que afectan diferencialmente a estos modos de acción (Yanovsky *et al.*, 1997). Por otro lado, el efecto dominante negativo de la sobreexpresión del phyB sobre el phyA (Short, 1999) afecta sólo la vía del HIR (Casal *et al.*, 2000). Además, deleciones en el promotor de *Lhcb 1*2* reducen significativamente la respuesta HIR comparada con el VLFR y LFR (Cerdán *et al.*, 2000). Finalmente, recientemente han sido aislados mutantes del dominio PAS2 del phyA que retienen respuestas VLFR pero pierden las HIR (Yanovsky, Staneloni y Casal, comunicación personal).

4.2 Patrones de interacción entre fitocromos y criptocromos durante el desarrollo de *Arabidopsis*

La luz blanca así como la radiación solar activan simultáneamente a todos los fotorreceptores y de los experimentos presentados en los resultados podemos concluir que, los fotorreceptores operan independientemente vía caminos de transducción específicos, pero además estas vías interactúan entre sí. Lo más interesante, a nuestro entender, de los mecanismos de interacción entre fotorreceptores radica en comprender cuál es la ventaja que las mismas pueden proporcionar a una planta en crecimiento, y este punto se discutirá más adelante. Sin embargo, aunque conozco lo tedioso que resulta, primeramente voy a describir algunos de los patrones de interacciones que se desglosan de los resultados, para lograr una visión más general que permita interpretar la compleja red de señalización entre fitocromos y criptocromos, que en estos últimos años comenzamos a dilucidar. Es interesante destacar que los patrones de interacciones son dinámicos, como podrán ser discutidos

en los siguientes párrafos éste cambia según el estadio del desarrollo, el contexto genético o las condiciones ambientales. Sobre este punto también volveré más adelante.

4.2.1 Des-etiolación

Interacción entre phyA y phyB

El phyA puede interactuar positivamente o negativamente con el phyB, y esto depende del modo de acción en el que opera el phyA. En plántulas etioladas, cuando el phyA es activado con R_{Lc}, es decir en su forma HIR, produce la amplificación de la respuesta a un pulso de R mediado por el Pfr del phyB (Casal, 1995; Casal y Boccalandro, 1995). Es decir, que el modo HIR del phyA y el modo LFR del phyB interactúan sinérgicamente (Fig 4.1). En *Arabidopsis*, bajo R_c no existe amplificación de la respuesta al Pfr del phyB (Casal, 1995). Como mencionamos anteriormente el phyA es capaz de percibir muy bajos flujos de luz R y producir la inhibición del alargamiento del hipocotilo. Primeramente entonces estudiamos el patrón de interacción entre el phyA y el phyB (principal fotorreceptor de luz R_c). En la segunda fase de la curva de las Figs. 3.1 y 3.4 (considerada una respuesta LFR mediada por el phyB), el mutante de *phyA* presentó una pendiente mayor que la del WT. Si bien estas diferencias fueron pequeñas, el hipocotilo del mutante de *phyA* fue significativamente más corto que los del WT en los flujos más altos (ver también Casal, 1995). Es decir que el phyA tiene un efecto dual bajo R_c: por un lado inhibe el crecimiento del hipocotilo vía VLFR y por otro lado reduce la respuesta LFR mediada por el phyB. El efecto dual del phyA en R_c explica la similitud en el largo del hipocotilo entre el WT y el mutante de *phyA* a flujos intermedios de R_c y la falta de efecto de la mutación de *phyA* en la ausencia de phyB (Reed *et al.*, 1994). El efecto negativo del phyA sobre el LFR del phyB fue observado en R_c y R_p (Fig. 3.1 y 3.4). Por esta razón, ésta interacción es interpretada como una conexión entre el VLFR del phyA y el LFR del phyB. Con posterioridad a la publicación de los datos relativos de la acción del phyA bajo R presentados en esta tesis (Mazzella *et al.*, 1997), el efecto antagónico entre phyA y phyB ha sido descrito para la regulación de la expresión del gen *Lhcb 1*2* (Cerdán *et al.*, 1999).

Interacción del cry1 con el phyA y phyB

Cuando el *cry1* es activado con exposiciones a la luz azul puede actuar sinérgicamente con el *phyB* en el control del alargamiento del hipocotilo y la apertura de los cotiledones (Casal y Boccalandro, 1995; Casal y Mazzella 1998) (Fig 4.1A). En plántulas expuestas a 3 h de luz naranja (sin azul), el WT es capaz de responder a la adición de luz azul, y esta respuesta se pierde en los mutantes simples de *phyB* y *cry1* (Casal y Boccalandro, 1995). En plántulas de *Arabidopsis* expuestas a 3 h de luz R más azul puede observarse que la acción del *phyB* es mayor en presencia que en la ausencia del *cry1* y viceversa (Casal y Mazzella, 1998). Sin embargo, el sinergismo entre *phyB* y *cry1* es condicional ya que cuando se realizan exposiciones a luz R más azul de manera continua los efectos del *phyB* y *cry1* son independientes (Casal y Mazzella, 1998). En condiciones de radiación natural el *phyB* y el *cry1* también fueron sinérgicos cuando la irradiancia recibida fue del 5 %, pero independientes en exposiciones del 100 % de irradiancia (Fig. 3.14A). El *cry1*, además actuaría sinérgicamente con otros fitocromos distintos del *phyB*. La actividad de *cry1* en el doble mutante *phyA phyB* fue mayor cuando se utilizó luz R más azul que cuando se utilizó luz RL más azul (Casal y Mazzella, 1998). Por otro lado, en ausencia de *phyB*, los pulsos de R fueron solo efectivos en presencia del *cry1* y *phyD* (Henning *et al.*, 1999b).

En ningún caso se han observado efectos sinérgicos entre el *cry1* y el *phyA* durante la des-etiolación (Casal y Boccalandro, 1995; Casal y Mazzella, 1998; Neff y Chory, 1998). Contrariamente, Ahamad y Cashmore (1997) propusieron una dependencia funcional del *cry1* en el *phyA* y *phyB*, basados en la observación que la respuesta a la luz azul en el doble mutante *phyA phyB* estaba reducida con respecto a los controles de oscuridad. Sin embargo, la explicación más probable del fenotipo observado en el doble mutante *phyA phyB* en luz azul por estos autores es que el *phyA* y *phyB* directamente absorben luz azul (ver Casal y Mazzella, 1998 y Neff y Chory, 1998 para más discusión sobre este punto).

Interacción del cry2 con el phyA, phyB y cry1

Durante la des-etiolación los efectos del cry2 fueron obvios en ausencia del cry1 indicando el alto grado de redundancia entre estos fotorreceptores (Fig. 3.5, 3.15 y 3.17). La inhibición del alargamiento de los hipocotilos mediada por el cry2 fue observada en ausencia de cry1 pero sólo en presencia de phyA y phyB (Fig. 3.5, 3.15 y 3.17). Es decir, que el phyA y el phyB sinergizan la acción del cry2. El patrón de interacción del cry2 con phyA y phyB en el control de la apertura de los cotiledones fue diferente, ya que la actividad del cry2 sobre esta respuesta fue evidente sólo en ausencia simultánea de phyA y phyB, es decir, el phyA y phyB fueron redundantes con el cry2.

4.2.2 Desarrollo vegetativo

El phyB y el cry1 fueron redundantes en la inhibición del crecimiento del tallo y la formación normal de rosetas (Fig 3.11 y Tabla 3.2). Esto es diferente de la situación observada para las respuestas de des-etiolación como la inhibición del crecimiento del hipocotilo (Casal y Mazzella, 1998) (Fig. 3.14), pero no indica necesariamente distintos mecanismos. Casal y Mazzella, (1998), han propuesto que el phyB y el cry1 operarían en caminos paralelos que se volverían funcionalmente dependientes sólo bajo condiciones sub-óptimas de luz. Este modelo que involucra caminos paralelos podría explicar las respuestas del crecimiento del tallo observado en plantas adultas. Si estas respuestas son más sensibles a las señales derivadas del phyB o del cry1 que el crecimiento del hipocotilo o la apertura de los cotiledones, el efecto vía alguno de estos fotorreceptores podría ser suficiente para producir el arresto del crecimiento del tallo en plantas vegetativas.

En el caso de la tasa de producción de hojas durante el desarrollo vegetativo, la mutación de *phyB* fue la única mutación simple que redujo esta respuesta y los efectos de las mutaciones de *phyA*, *cry1* y *cry2* se observaron principalmente en ausencia de phyB, y en general se acentuaron en los múltiples mutantes revelando un patrón de redundancia entre fotorreceptores (Fig. 3.6).

El crecimiento del tallo y el desarrollo reproductivo puede ser desacoplado

En plantas WT de *Arabidopsis thaliana*, el crecimiento del tallo está completamente inhibido cuando la elongación del hipocotilo se ha completado y sólo reanuda cuando se producen en el meristema apical múltiples yemas florales cubiertas por sépalos, y primordios de estambres y pétalos (Hanzawa *et al.*, 1997; Smyth *et al.*, 1990). Este comportamiento resulta en la formación de una roseta compacta de hojas en las plantas vegetativas y la presencia de entrenudos elongados que llevan flores o ramificaciones en las plantas reproductivas. Así, el alargamiento del entrenudo parece estar ligado al programa reproductivo del desarrollo. A favor de esta idea, el mutante *acl5* presenta defectos severos en la elongación celular del tallo restringido sólo al estado reproductivo y el fenotipo es evidente sólo luego de la inducción floral (Hanzawa *et al.*, 1997).

El doble mutante *phyB cry1* muestra elongación del entrenudo antes de producirse la transición del ápice del estado vegetativo al reproductivo (Fig. 3.13). En el mutante *pin* de *Arabidopsis* la mayoría de los pedúnculos florales carecen de hojas, y cuando se forman las flores tienen pistilos alargados, pétalos múltiples, no poseen estambres y los sépalos están reducidos (Haughn y Somerville, 1988). Esto indica que si bien las plantas WT que tienen alargamiento normal del entrenudo siguen la formación de primordios florales en el meristema, la presencia normal de yemas florales no sería el disparador de la elongación del tallo. Nuestras observaciones indican que en ausencia de la inhibición impuesta por *phyB* y *cry1* la elongación del tallo puede suceder antes de la transición del estado vegetativo al reproductivo del ápice.

En experimentos realizados con mutantes triples que carecen de *phyA*, *phyB* y *phyD* o *phyE* se mostró que no producen una roseta normal debido a la elongación de los entrenudos (Devlin *et al.*, 1998; Devlin *et al.*, 1999). Un fenotipo similar fue observado en el doble mutante *phyA phyB* expuestos a tratamientos de un pulso al final del día con luz RL (Devlin *et al.*, 1996). En contraste con el mutante *phyB cry1*, los mutantes *phyA phyB phyE* y *phyA phyB phyD* y el mutante *phyA phyB* expuesto a pulsos al final del día de luz RL, mostraron que la elongación de los entrenudos fue más obvia bajo condiciones que aceleraban la floración (Devlin *et al.*, 1999). Es decir, el crecimiento del tallo y el desarrollo reproductivo pueden ser desacoplados únicamente en el *phyB cry1*.

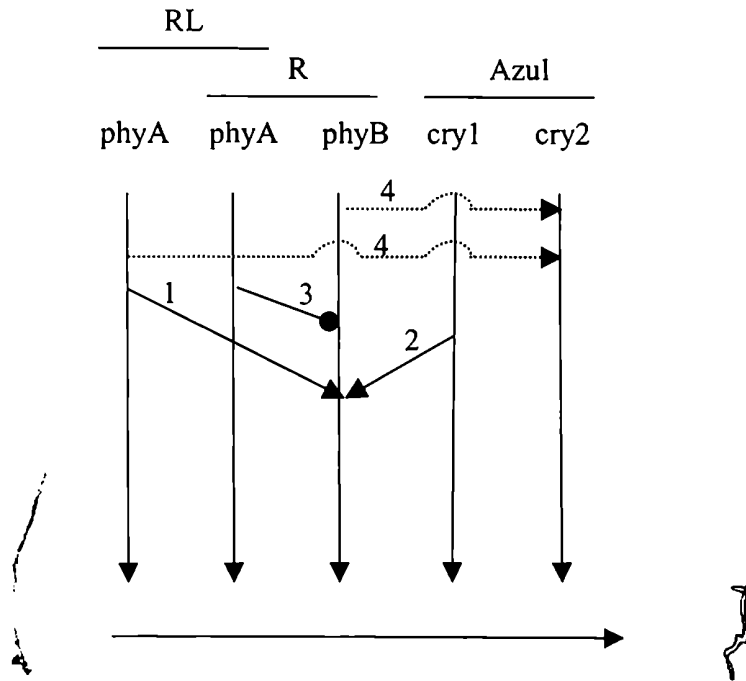
4.2.3 Iniciación floral

La mutación de cry2 reveló nuevos roles del phyA

A partir del estudio con mutantes simples de *Arabidopsis*, se ha propuesto al phyB como un inhibidor de la floración y al cry2, phyA, y cry1 como promotores de la floración. Mockler *et al.* (1999) y Guo *et al.* (1998) observaron que el doble mutante *phyB cry2* florece tan tempranamente como el simple mutante *phyB* en luz R más azul y propusieron que el cry2 promovería la floración vía un efecto antagónico sobre la inhibición de esta respuesta mediada por el phyB. Consistentemente con esta hipótesis el doble mutante *phyB cry2* tuvo el mismo comportamiento en nuestras condiciones (Fig. 3.8A). El análisis de nuevas combinaciones de mutantes presentadas en esta tesis revelan además que el phyA podría tener un efecto inhibidor de la inducción floral. Los efectos de la mutación de *cry2* en el número final de hojas fueron reducidos no sólo por la mutación de *phyB* sino también por la mutación de *phyA* (Fig. 3.8A). Si bien en trabajos anteriores se ha documentado que la mutación de *phyA* retrasa la floración en plantas cultivadas bajo fotoperíodos cortos extendidos con bajos flujos de luz rica en RL (Johnson *et al.*, 1994), la mutación de *phyA* produjo la aceleración de la floración en los *backgrounds* de *cry1*, *cry2* y *cry1 cry2* (Fig. 3.8 A y 3.9). Además, el doble mutante *cry1 cry2* cultivado en fotoperíodos cortos no muestra respuesta a la floración cuando es inducido con tratamientos de 5 días de fotoperíodos largos, pero la mutación de *phyA* restituyó el efecto de días largos ya que el triple mutante *phyA cry1 cry2* respondió al fotopríodo (Fig. 3.9). El retraso o aceleración de la floración por parte del phyA dependería del *background* genético y las condiciones lumínicas. De hecho el efecto inhibidor del phyA se observa en los *backgrounds* de *cry1*, *cry2* y *cry1 cry2* (Fig. 3.8A y 3.9). Blázquez y Weigel (comunicación personal) han observado que el doble mutante *phyA cry2* (los mismos alelos usados aquí florece más tarde que el simple mutante de *cry2* (tendría un efecto promotor), sin embargo las fuentes de luz utilizadas fueron diferentes.

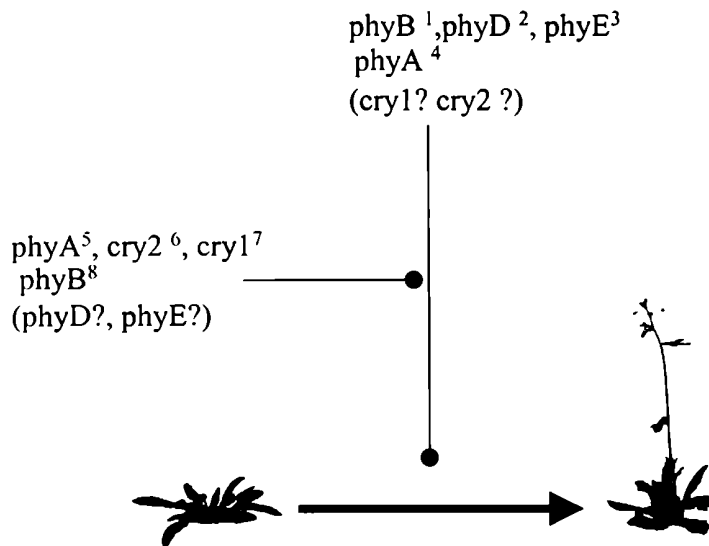
La luz tiene un efecto dual sobre la floración en días largos, un efecto positivo dependiente del fotoperíodo y un efecto negativo que se satura con fotoperíodos cortos (De

A Des-etiolación



¹ Casal, 1995, ² Casal y Boccalandro, 1995; Casal y Mazzella, 1998, ³ esta tesis Mazzella *et al.*, 1997
⁴ esta tesis Mazzella *et al.*, 2001 a y b.

B Transición del estadio vegetativo al reproductivo



¹ Reed *et al*, 1993, ² Devlin *et al*, 1999, ³ Devlin *et al*, 1998, ⁴ esta tesis Mazzella *et al*, 2001b,
⁵ Johnson *et al*, 1994, ⁶ Guo *et al*, 1998, ⁷ Bagnall *et al*, 1996, ⁸ Bagnall *et al*, 1995

Figura 1. Modelos genéticos del patrón de interacciones entre fitocromos y criptocromos durante A) la des-etiolación y B) la transición del estadio vegetativo al reproductivo. La explicación se encuentra en el texto. —▶ Interacciones positivas —● Interacciones negativas.

Las referencias bibliográficas se indican al pie de cada modelo.

Lint, 1960). La integración de las señales mediadas por fotorreceptores que regulan el proceso de floración está representada en el modelo de la Fig. 4.1B. El *cry2* (Guo *et al.*, 1998), *phyA* (Johnson *et al.*, 1994) y *cry1* (Bagnall *et al.*, 1996) mediarían el efecto positivo, mientras que el *phyB* (Reed *et al.*, 1993), *phyD* (Devlin *et al.*, 1999) y *phyE* (Devlin *et al.*, 1998) mediarían el efecto negativo. El hecho que el *phyA* pueda acelerar o retrasar la floración y que tanto el mutante de *phyB* como el sobreexpresante de *phyB* (Bagnall *et al.*, 1995) aceleran la floración, sugiere que los fotorreceptores podrían operar de manera integrada y ser reguladores positivos o negativos.

4.3 El patrón de interacciones depende del estado ontogénico, de la luz y la temperatura

Durante el crecimiento y desarrollo de las plantas, los patrones de interacciones entre los fotorreceptores cambia. El *phyB* y el *cry1* interactúan sinérgicamente en el control de la inhibición del crecimiento del hipocotilo (Fig. 3.14). Sin embargo, son redundantes en el control del alargamiento del tallo durante el desarrollo reproductivo (Tabla 3.2). Como se mencionó anteriormente, el patrón de interacción del *cry2* con *phyA* y *phyB* muestra dependencia o redundancia. Durante la inhibición del alargamiento del hipocotilo y la transición del estado vegetativo al reproductivo medido en escala biológica, la actividad del *cry2* dependió del *phyA* y/o del *phyB*. Para el caso de la apertura de los cotiledones y la tasa de producción de hojas estos fotorreceptores fueron en general redundantes entre sí. Es decir que, aún en respuestas que forman parte del mismo proceso del desarrollo como inhibición del alargamiento del entrenudo y apertura de los cotiledones, el patrón de interacciones puede ser diferente.

El fenotipo del doble mutante *phyB cry1* fue condicional a la temperatura. A 20°C el *phyB cry1* presentó entrenudos alargados, mientras que a bajas temperaturas, el crecimiento del entrenudo está inhibido y las plantas forman una roseta normal (Tabla 3.2 y Fig. 3.12). Las bajas temperaturas podrían incrementar los efectos inhibitorios de los fotorreceptores remanentes en el triple mutante *phyA phyB cry1* (*phyD* y *phyE*) o bien producir que el crecimiento del tallo sea totalmente dependiente del programa reproductivo. Existen varios ejemplos en la literatura que muestran interacción entre la luz y la

temperatura en el control de diversas respuestas. En *Arabidopsis*, bajas temperaturas y tratamientos de luz son necesarios para la inducción de la germinación de semillas y la expresión de los genes *Fenilalanil Ammonia-Lyase* y *Chalcona Sintetasa* (Leyva *et al.*, 1995).

Durante la des-etiolación, la interacción sinérgica entre phyB y cry1 fue condicional al ambiente lumínico. En condiciones sub-óptimas de luz (5% de la luz solar (Fig 3.14), o exposiciones cortas de R más azul, Casal y Mazzella, 1998) el phyB y el cry1 interactúan sinérgicamente, mientras que en condiciones de luz óptimas (100% de luz solar (Fig. 3.14) o exposiciones prolongadas de R más azul, Casal y mazzella 1998) sus efectos se vuelven totalmente independientes.

4.4 Mecanismos moleculares de las interacciones

Trabajos publicados por éste y otros grupos proveyeron una fuerte evidencia genética de las interacciones entre los fotorreceptores (ver Fig. 4.1). Esto despertó la inquietud en varios grupos que dedicaron sus esfuerzos a investigar cuáles podrían ser los mecanismos moleculares de las interacciones.

Las interacciones entre dos cadenas de transducción podría ser el resultado de la interacción a nivel del receptor mismo o en un paso intermediario de las cadenas. Se sabe que el cry1 y el cry2 pueden ser fosforilados por el phyA (Ahmad *et al.*, 1998). Estudios de interacción en el sistema de dos híbridos confirman que existe una interacción física entre los extremos carboxi terminales del phyA y cry1. En las respuestas analizadas en esta tesis (des-etiolación, crecimiento vegetativo e iniciación floral) no hay evidencias de interacción entre phyA y cry1, sin embargo se ha encontrado al menos para la pérdida de turgencia de protoplastos de *Arabidopsis* (Wang y Moritoshi, 1997) y la regulación del ritmo de expresión de *CAB* (Devlin y Kay, 2000). En experimentos de co-inmuno-precipitación en plantas sobreexpresante de cry2 se observó que el phyB interactúa directamente con el cry2 en partículas nucleares que se forman luego de la exposición a la luz (Mas *et al.*, 2000). Finalmente el efecto sinérgico entre el phyB y cry1 podría ser parte del resultado de una mayor traslocación al núcleo del phyB en presencia del cry1 (Gil *et al.*, 2000). En estos

casos la interacción entre fitocromos y criptocromos parecería ser el resultado de la interacción física entre las moléculas de los mismos.

El mecanismo molecular de la interacción entre phyA y phyB no parecería deberse a una interacción a nivel del fotorreceptor, sino al *crossstalk* entre sus cadenas de transducción. Es más, varios mutantes de la cadena de señalización que afectan tanto la vía del phyA como del phyB indican elementos comunes en sus cadenas de transducción. El mutante *phy1*, mutante de la cadena de transducción del phyA, presenta reducidos los efectos antagonicos y sinérgicos del phyA sobre el phyB, a pesar de poseer niveles normales de phyA (Cerdán *et al.*, 1999; Yanovsky *et al.*, 2000b).

4.4 Significado de las interacciones

El cuádruple mutante está severamente afectado durante todo el ciclo de vida de Arabidopsis

En un trabajo reciente se muestra que el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* no muestra defectos en los ritmos circadianos (Yanovsky *et al.*, 2000c). Sin embargo el cuádruple mutante está severamente afectado en el crecimiento y desarrollo: los hipocotilos son alargados asemejándose a aquellos de una planta en completa oscuridad (Fig. 3.5), los cotiledones se abren 20 días más tarde que el WT y sólo parcialmente (Fig. 3.5), las plantas no forman una roseta normal (Fig. 3.7A); la tasa de producción de hojas es baja (Fig. 3.6A), el número de ramificaciones es bajo y aparecen en las posiciones superiores (Fig. 3.7C); la transición entre el desarrollo vegetativo y reproductivo es temprana medida en una escala biológica (Fig. 3.8A) pero tardía en una escala cronológica (Fig. 3.8B); la estabilidad del vástago es pobre y como consecuencia las plantas crecen por sobre la superficie del suelo (Fig. 3.7B); los primeros frutos no se desarrollan (Fig. 3.7C) y el ciclo de vida es significativamente más largo. Las plantas cultivadas en completa oscuridad en un medio conteniendo azúcares, son capaces de desarrollarse y florecer (Roldan *et al.*, 1999), a pesar de no haber actividad de los pigmentos fotosintéticos o fotorreceptores. Esta tesis resalta la contribución del phyA phyB, cry1 y cry2.

Durante la des-etiolación la interacción entre fotorreceptores genera homeostasis de la información

La transición entre la oscuridad completa y los ciclos de luz-oscuridad experimentados por arriba del suelo es la señal que inicia la des-etiolación cuando emerge el tallo del suelo. Sin embargo, el ambiente luminoso con el que se encuentran las plántulas está afectado por factores no relacionados a la posición del tallo por abajo o por arriba de la superficie. La irradiancia está afectada por ejemplo por nubes transitorias y por el ángulo solar. El fotoperíodo varía de acuerdo a la época del año. La composición espectral de la luz (en particular la relación R/RL) se ve afectada por la densidad de la cobertura vegetal. Un patrón de crecimiento etiolado favorece el crecimiento por debajo de la superficie del suelo, pero aún bajo relaciones R/RL reducidas y bajas irradiancias característicos de los canopeos densos, la des-etiolación es necesaria para la supervivencia (Yanovsky *et al.*, 1995). En otras palabras, la respuesta a la señal que inicia la des-etiolación (pasaje de oscuridad a ciclos de luz-oscuridad) debe ocurrir independientemente del "ruido" (irradiancia, fotoperíodo, composición espectral del ambiente luminoso).

Estos resultados muestran que las interacciones entre los fotorreceptores reducen el impacto de los cambios en la irradiancia y el fotoperíodo (Fig. 3.18 y 3.19). En esta misma línea, la presencia de múltiples fotorreceptores (en particular phyA y phyB) amortigua la des-etiolación contra cambios en la relación R/RL (Smith *et al.*, 1997; Yanovsky *et al.*, 1995). Así, la complejidad de la red generada por la acción múltiple de los fotorreceptores provee homeostasis de la información (Pickett y Meeks-Wagner, 1995) y como consecuencia se reduce el impacto de las señales lumínicas que no son ecológicamente relevantes. Sin embargo, luego que se completa la des-etiolación, una alta sensibilidad a pequeñas reducciones en la relación R/RL es evidente en las respuestas tempranas a la presencia de vecinos (Ballaré *et al.*, 1987; Holmes *et al.*, 1982; Johnson *et al.*, 1994).

La redundancia y jerarquías entre genes concilia la estabilidad y la modulación a la luz durante el desarrollo Arabidopsis

Los resultados presentados en esta tesis muestran que los roles de phyA, phyB, cry1 y cry2 afectan diferentes etapas del desarrollo, sin embargo, muchos de estos efectos fueron evidentes solo en múltiples mutantes, indicando redundancia en el control del desarrollo. La redundancia es entonces considerada una fuente de **estabilidad** (Hartman *et al.*, 2001).

Los fotorreceptores se acoplan durante el crecimiento y desarrollo con diferentes jerarquías. Evidentemente el phyB contribuye fuertemente en todos los procesos del desarrollo (des-etiolación, crecimiento vegetativo y floración), ya que el simple mutante presenta defectos durante todo el ciclo de vida. El phyB y el cry1 son los fotorreceptores más importantes durante el proceso de des-etiolación bajo luz solar directa (Yanovsky *et al.*, 1995) (Fig. 3.14), mientras que la contribución del phyA (Yanovsky *et al.*, 1995) (Fig. 3.14) y cry2 (Fig 3.15) no es evidente. Bajo canopeos densos ricos en RL la contribución de estos fotorreceptores cambia y la des-etiolación esta mediada exclusivamente por el phyA (Yanovsky *et al.*, 1995). El cry2 por otra parte es el más efectivo en la promoción de la transición del estado vegetativo al reproductivo (Guo *et al.*, 1998).

La jerarquía relativa de los fotorreceptores depende fuertemente del contexto del desarrollo. Para la expresión del promotor del *Lhcb1*2* el efecto de la mutación de *cry2* fue mayor que aquella provocada por la mutación *cry1* en el background *PHYA PHYB* pero el patrón complementario se observó en el *background phyA phyB* (Cerdán, 1999). En la ausencia simultánea de phyA y phyB, el cry1, phyD y phyE son todos necesarios para suprimir la elongación del entrenudo (Devlin *et al.*, 1998; Devlin *et al.*, 1999) (Tabla 3.2). Para el alargamiento del entrenudo, la mutación de *phyA* tuvo efectos pequeños en el *background* de *phyB cry1* pero fue crítica en el *background phyB phyE* (Devlin *et al.*, 1999). Sin embargo, los efectos de la mutación de *phyA* aumentaron la extensión del hipocotilo durante la des-etiolación aún en el *background* de *phyB* y *cry1* (Tabla 3.3).

La jerarquía de los distintos fotorreceptores podría ser el resultado de distintas compartimentalización subcelular, estabilidad de la proteína y/o la eficiencia en el camino de transducción (Cashmore *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 1998; Kleiner *et al.*, 1999). Una alta

jerarquía del cry2 podría conferir regulación fotoperiódica a un proceso dado (como floración), mientras que una alta jerarquía del phyB podría resultar en la modulación del patrón de desarrollo por la percepción de R/RL.

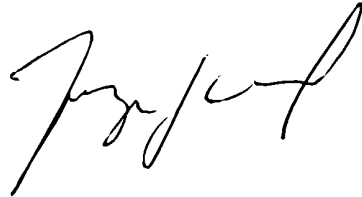
En muchos procesos en plantas, como en el camino de las auxinas, ácido absísico, señales lumínicas y la floración están involucradas regulaciones negativas. La mayoría de las respuestas de las plantas a las señales ambientales que percibe son irreversibles, y lentas, para permitir así un reaseguro múltiple. Esto podría explicar el hecho que las plantas controlen un gran número de procesos a través de regulaciones negativas controlando el grado de respuesta. En sistemas animales, por ejemplo, las regulaciones negativas permiten reajustar el desarrollo cuando hay perturbación (Golembo *et al.*, 2000). Para la inhibición del alargamiento del hipocotilo durante la des-etiolación en respuesta a la irradiancia o al fotoperíodo, las interacciones negativas fueron más fuertes que las positivas, ya que se produjo como resultado neto (balance entre interacciones positivas y negativas) la reducción del grado de inhibición del alargamiento del hipocotilo (Fig. 3.18 y 3.19).

En conclusión, mientras que la redundancia y la regulación negativa podrían prevenir patrones aberrantes del desarrollo (como aquel observado en el cuádruple mutante) en condiciones ambientales extremas; es decir, permitirían mantener la estabilidad, la jerarquía de los fotorreceptores tendrían como consecuencia la modulación de aspectos específicos del crecimiento y desarrollo por señales lumínicas particulares.

4.6 CONCLUSIONES

Las plantas como organismos sésiles utilizan la información provista por el ambiente lumínico para aclimatarse a los cambios que ocurren en su entorno. La presencia de phyA, phyB, cry1 permiten la percepción de distintos rangos de irradiancia, distintos fotoperíodos y diferentes relaciones R/RL. Las interacciones entre dichos fotorreceptores provee homeostasis. Esto significa que el crecimiento y desarrollo a) son modulados por cambios en el ambiente luminoso que constituyen señales ecológicamente relevantes y B) permanecen estables frente a fluctuaciones en el ambiente luminoso sin una obvia relevancia ecológica. Las interacciones entre estos cuatro fotorreceptores durante diferentes procesos del desarrollo de *Arabidopsis* forman una compleja red de señalización

con regulaciones positivas y negativas. El balance neto de las interacciones en general muestra que las regulaciones negativas son más fuertes generando un alto grado de redundancia entre los fotorreceptores. La redundancia es una fuente de estabilidad contra variaciones en el ambiente que no forman parte de las señales que desencadenan o modulan el desarrollo de las plantas. El phyA, phyB, cry1 y cry2 se acoplan durante el desarrollo con diferentes jerarquías que permiten un patrón de crecimiento y desarrollo específicos en condiciones particulares del ambiente luminoso.

Handwritten signature in black ink, appearing to read "Christopher J. Boyer" with a horizontal line underneath.Handwritten signature in black ink, appearing to read "Joseph" in a cursive style.

5. BIBLIOGRAFIA

- Abe, H., Takio, K., Titani, K., and Furuya, M. (1989). Amino-terminal amino acid sequences of pea phytochrome II fragments obtained by limited proteolysis. *Plant Cell Physiol* 30, 1089-1097.
- Adam, E., Deak, M., Kay, S., Chua, N.-H., and Nagy, F. (1993). Sequence of a tobacco (*Nicotiana tabacum*) gene coding for type A phytochrome. *Plant Physiol* 101, 1401-1408.
- Ahmad, M., and Cashmore, A. R. (1993). *HY4* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366, 162-166.
- Ahmad, M., Lin, C., and Cashmore, A. R. (1995). Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive antocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. *Plant J* 8, 653-658.
- Ahmad, M., and A. R. Cashmore. (1996). The *pef* mutants of *Arabidopsis thaliana* define lesions early in the phytochrome signaling pathway. *Plant J* 10, 1103-1110.
- Ahmad, M., and A. R. Cashmore. (1997). The blue light receptor cryptochrome 1 shows a functional dependence on phytochrome A or phytochrome B in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 11, 421-427
- Ahmad, M., Jarrillo, J. A., Smirnova, O., and Cashmore, A. A. (1998). The CRY1 Blue Light Photoreceptor of *Arabidopsis* Interacts with Phytochrome A In Vitro. *Molecular Cell* 1, 939-948.
- Ahmad, M., Jarrillo, J. A., and Cashmore, A. R. (1998). Chimeric proteins between and cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell* 10, 197-208.
- Aukerman, M. J., Hirschfeld, M., Wester, L., Weaver, M., Clack, T., Amasino, R. M., and Sharrock, R. A. (1997). A deletion in the *PHYD* gene of the *Arabidopsis* Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/far-red light sensing. *Plant Cell* 9, 1317-1326.
- Bagnall, D. J., King, R. W., Whitelam, G. C., Boylan, M. T., Wagner, D., and Quail, P.

- H. (1995). Flowering responses to altered expression of phytochrome in mutants and transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* **108**, 1495-1503.
- Bagnall, D. J., King, R. W., and Hangarter, R. P. (1996). Blue-light promotion of flowering is absent in *hy4* mutants of *Arabidopsis*. *Planta* **200**, 278-280.
- Ballaré, C. L., Sánchez, R. A., Scopel, A. L., Casal, J. J., and Ghera, C. M. (1987). Early detection of neighbour plants by phytochrome perception of spectral changes in reflected sunlight. *Plant Cell Environ* **10**, 551-557.
- Ballaré, C. L., Sánchez, R. A., Scopel, A. L., and Ghera, C. M. (1988). Morphological responses of *Datura ferox* seedlings to the presence of neighbors. Their relationship with canopy microclimate. *Oecologia* **76**, 288-293.
- Ballaré, C. L., Scopel, A. L., and Sánchez, R. A. (1990). Far-red radiation reflected from adjacent leaves: an early signal of competition in plant canopies. *Science* **247**, 329-332.
- Ballaré, C. L., Scopel, A. L., and Sánchez, R. A. (1991). Photocontrol of stem elongation in plant neighbourhoods: effects of photon fluence rate under natural conditions of radiation. *Plant Cell Environ* **14**, 57-65.
- Ballaré, C. L., Barnes, P. W., and Flint, S. D. (1995). Inhibition of hypocotyl elongation by ultraviolet-B radiation in de-etiolating tomato seedlings. I. The photoreceptor. *Physiol Plant* **93**, 584-592.
- Ballaré, C. L., Scopel, A. L., Stapleton, A. E., and Yanovsky, M. J. (1996). Solar ultraviolet-B radiation affects seedling emergence, DNA integrity, plant morphology, growth rate, and attractiveness to herbivore insects in *Datura ferox*. *Plant Physiol* **112**, 161-170.
- Baum, G., J. C. Long, G. I. Jenkins, and A. Trewavas. (1999). Stimulation of blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic Ca^{2+} . *Proc Natl Acad Sci* **96**, 13554-13559.
- Bernier, G. (1988). The control of floral evocation and morphogenesis. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **39**, 175-219.
- Borthwick, H. A., Hendricks, S. B., Parker, M. W., Toole, E. H., and Toole, V. K.

- (1952). A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 38, 662-666.
- Botto, J. F., Sánchez, R. A., and Casal, J. J. (1995). Role of phytochrome B in the induction of seed germination by light in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* 146, 307-312.
- Botto, J. F., Sánchez, R. A., Whitelam, G. C., and Casal, J. J. (1996). Phytochrome A mediates the promotion of seed germination by very low fluences of light and canopy shade light in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 110, 439-444.
- Boylan, M. T., and Quail, P. H. (1991). Phytochrome A overexpression inhibits hypocotyl elongation in transgenic *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 10806-10810.
- Briggs, W. R., and Huala, E. (1999). Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 33-62.
- Casal, J. J., and Smith, H. (1989). The function, action and adaptive significance of phytochrome in light-grown plants. *Plant, Cell Environ* 12, 855-862.
- Casal, J. J., Sánchez, R. A., Benedetto, D., and De Miguel, L. C. (1991). Light promotion of seed germination in *Datura ferox* is mediated by a highly stable pool of phytochrome. *Photochem Photobiol* 53, 249-254.
- Casal, J. J., and Sánchez, R. A. (1992). Physiological relationships between phytochrome effects on internode extension growth and dry matter accumulation in light-grown mustard. *Photochem Photobiol* 56, 571-578.
- Casal, J. J., and Sánchez, R. A. (1994). Overexpression of oat phytochrome A gene differentially affects stem growth responses to red/far-red ratio signals characteristic of sparse or dense canopies. *Plant, Cell Environ* 17, 409-417.
- 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 Plantarum* 91, 263-267.
- Casal, J. J., Sánchez, R. A., and Vierstra, R. D. (1994). Avena phytochrome A

- overexpressed in transgenic tobacco seedlings differentially affects red/far-red reversible and very-low-fluence responses (cotyledon unfolding) during de-etiolation. *Planta* 192, 306-309.
- Casal, J. J., Sánchez, R. A., Boylan, M., Vierstra, R. D., and Quail, P. H. (1995). Is the far-red-absorbing form of Avena phytochrome A that is present at the end of the day able to sustain stem-growth inhibition during the night in transgenic tobacco and tomato seedlings? *Planta* 197, 225-232.
- Casal, J. J., Sánchez, R. A., Paganelli-Blau, A. R., and Izaguirre, M. (1995). Phytochrome effects on stem carbon gain in light-grown mustard seedlings are not simply the result of stem extension-growth responses. *Physiologia Plantarum* 94, 187-196.
- Casal, J. J., and Boccalandro, H. (1995). Co-action between phytochrome B and HY4 in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 197, 213-218.
- Casal, J. J. (1995). Coupling of phytochrome B to the control of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *Planta* 196, 23-29.
- Casal, J. J., Clough, R. C., and Vierstra, R. D. (1996). High-irradiance responses induced by far-red light in grass seedlings of the wild type or overexpressing phytochrome A. *Planta* 200, 132-137.
- Casal, J. J., and Mazzella, M. A. (1998). Conditional synergism between cryptochrome 1 and phytochrome B is shown by the analysis of *phyA*, *phyB* and *hy4* simple, double and triple mutants in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 118, 19-25.
- Casal, J. J., and R. A. Sánchez. (1998). Phytochromes and seed germination. *Seed Science Research*. 8:317-329.
- Casal, J. J., Yanovsky, M. J., Luppi, J. P. (2000). Two photobiological pathways of phytochrome A activity, only one of which shows dominant negative suppression by phytochrome B. *Photochem and Photobiol* 71, 481-486.
- Casal, J. J. (2000). Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants. *Photochem Photobiol* 71, 1-11.
- Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y.-J., Liu, D. (1999). Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284, 760-765.

- Cerdán, P. D., Yanovsky, M. J., Reymundo, F. C., Nagatani, A., Staneloni, R. J., Whitelam, G. C., Casal, J. J. (1999). Regulation of phytochrome B signaling by phytochrome A and FHY1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 18, 499-507.
- Cerdán, P. D., Staneloni, R.J., Ortega, J., Bunge, M.M., Rodriguez-Batiller, J., Sánchez, R.A., Casal, J.J. (2000). Sustained but not transient phytochrome A signaling targets a region of a *Lhcb1**2 promoter that is not necessary for phytochrome B action. *Plant Cell* 12, 1203-1211.
- 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 Mol Biol* 25, 413-427.
- Clough, R. C., Casal, J. J., Jordan, E. T., Christou, P., and Vierstra, R. D. (1995). Expression of functional phytochrome A in transgenic rice. *Plant Physiol* 109, 1039-1043.
- Clough, R. C., and Vierstra, R. D. (1997). Phytochrome degradation. *Plant Cell Environ* 20, 713-721.
- Cherry, J. R., Hershey, H. P., and Vierstra, R. D. (1991). Characterisation of tobacco expressing functional oat phytochrome: domains responsible for the rapid degradation of Pfr are conserved between monocots and dicots. *Plant Physiol* 96, 775-785.
- Choi, G., Yi, H., Lee, J., Kwon, Y-K., Soh, M.S., Shin, B., Luka, Z., Hahn, T-R., Song, P-S. (1999). Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature* 401, 610-613.
- Chory, J., Peto, C., Feinbaum, R., Pratt, L., and Ausubel, F. (1989). *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell* 58, 991-999.
- Dehesh, K., Franci, C., Parks, B. M., Seeley, K. A., Short, T. W., Tepperman, J. M., and Quail, P. H. (1993). *Arabidopsis* hy8 locus encodes phytochrome A. *Plant Cell* 5, 1081-1088.
- De Lint, P. J. A. L. (1960). An attempt to analysis of the effect of light on stem elongation

- and flowering in *Hyoscyamus Niger* L. *Mededelingen van de Landbouwhogeschool te Wageningen*, Nederland 60, 1-59.
- Deng, X. W., Caspar, T., and Quail, P. H. (1991). *cop1*: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 5, 1172-1182.
- Devlin, P. F., Halliday, K. J., Harberd, N. P., and Whitelam, G. C. (1996). The rosette habit of *Arabidopsis thaliana* is dependent upon phytochrome action: novel phytochromes control internode elongation and flowering time. *Plant Journal* 10, 1127-1134.
- Devlin, P., Patel, S. R., and Whitelam, G. C. (1998). Phytochrome E Influences Internode Elongation and Flowering Time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1479-1488.
- Devlin, P. F., Robson, P. R. H., Patel, S. R., Goosey, L., Sharrock, R. A., and Whitelam, G. C. (1999). Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time. *Plant Physiology* 119, 909-915.
- Devlin, P. F., and Kay, S. A. (2000). Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* 12, 2499-2509.
- Dijkwel, P. P., Huijser, C., Weisbeek, P. J., Chua, N.-H., and Smeekens, S. C. M. (1997). Sucrose control of phytochrome A signalling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9, 583-595.
- Drumm, H., and H. Mohr. (1978). The mode of interaction between blue (UV) light photoreceptor and phytochrome in anthocyanin formation of the Sorghum seedling. *Photochem Photobiol* 27, 241-248.
- Emery, P., So, W., Kaneko, M., Hall, J. C., and Rosbash, M. (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a mayor contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95, 681-692.
- Elich, T. D., and J. Chory. (1997). Phytochrome: if it looks and smells like a histidine kinase, is it a histidine kinase? *Cell* 91:713-716.
- Fankhauser, C., Yeh, K. C., Lagarias, J. C., Zhang, H., Elich, T. D., and Chory, J.

- (1999). PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* 284
- Gaba, V., Black, M., and Attridge, T. H. (1984). Photocontrol of hypocotyl elongation in De-etiolated *Cucumis sativus* L. *Plant Physiol* 74, 897-900.
- Genoud, T., Millar, A.J., Nishizawa, N., Kay, S.A., Schäfer, E., Nagatani, A., Chua, N.H. (1998). An *Arabidopsis* mutant hypersensitive to red and far-red light signals. *Plant Cell* 10:889-904.
- Gil, P., Kirrcher, S., Adam, E., Bury, E., Kozma-Boggnar, L., Schafer, E., and Nagy, F. (2000). Photocontrol of subcellular partitioning of phytochrome-B: GFP fusion protein in tobacco seedlings. *Plant J* 22, 135-145.
- Golembo, M., Raz, E., and Shilo, B. (1996). The *Drosophila* embryonic midline is the site of Spitz processing and induces activation of the EGF receptor in the ventral ectoderm. *Development* 122, 3363-3370.
- Goto, N., Kumagai, T., and Koornneef, M. (1991). Flowering responses to light-breaks in photomorphogenic mutants of *Arabidopsis thaliana*, a long-day plant. *Physiologia Plantarum* 83, 209-215.
- Gray, W., Ostin, A., Sandberg, G., Romano, C., and Estelle, M. (1998). High temperatures promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Aca Scie USA* 95, 7197-7202.
- Guo, H., Duang, H., Ma, N., and Lin, C. (1999). The *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism. *Plant J.* 19, 279-287
- Guo, H., Yang, H., Mockler, T. C., and Lin, C. (1998). Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* 279, 1360-1363.
- Halliday, K. J., M. Koornneef, and G. C. Whitelam. (1994). Phytochrome B and at least one other phytochrome mediate the accelerated flowering response of *Arabidopsis thaliana* L. to low red/far-red ratio. *Plant Physiol* 104:1311-1315.
- Hanelt, S. Braun, B., Marx, S. and Schneider (1992). Phytochrome evolution a phylogentic tree with the first complete sequence of phytochrome from (*Selaginella martensii* spring). *Photochem Photobiol* 56, 751-758.

- Hanzawa, Y., Takahashi, T., and Komeda, Y. (1997). *ACL5*: an *Arabidopsis* gene required for internodal elongation after flowering. *Plant J* 12, 863-874.
- Hartman, J., Gaarvik, B. and Hartwell, L. (2001). Principles for the buffering of genetic variation. *Science* 291, 1001-1004.
- Haughn, G. W., and Somerville, C. R. (1988). Genetic control of morphogenesis in *Arabidopsis*. *Developmental Genetics* 9, 73-89.
- Huang, Z., Edery, I., Roshbach, M. (1993). PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* and several transcription factors. *Nature* 364, 259-262
- Heide, O. M., Bush, M. G., and Evans, L. T. (1985). Interaction of photoperiod and gibberelin on growth and photosynthesis of high-latitude *Poa pratensis*. *Physiol Plant* 65, 135-145.
- Heim, B., and Schäfer, E. (1982). Light-controlled inhibition of hypocotyl growth in *Sinapis alba* L. seedlings. Fluence rate dependency of hourly light pulses and continuous irradiation. *Planta* 154, 150-155.
- Heim, B., and Schäfer, E. (1984). The effect of red and far-red light in the high irradiance reaction of phytochrome (hypocotyl growth in dark-grown *Sinapis alba* L.). *Plant Cell Environ* 7, 39-44.
- Hempel, F. D., Weigel, D., Mandel, M. A., Ditta, G., Zambryski, P. C., Feldman, L. J., and Yanofsky, M. F. (1997). Floral determination and expression of floral regulatory genes in *Arabidopsis*. *Development* 124, 3845-3853.
- Hennig, L., Büche, C., Eichenberg, K., Schäfer, E. (1999a). Dynamic properties of endogenous phytochrome A in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol* 121, 571-577.
- Henning, L., Funk, M., Whitelam, G., and Schaefer, E. (1999b). Functional interaction of cryptochrome 1 and phytochrome D. *Plant J* 20, 289-294.
- Heyer, A. G., Mozley, D., Landschütze, V., Thomas, B., and Gatz, C. (1995). Function of phytochrome A in *Solanum tuberosum* as revealed through the study of transgenic plants. *Plant Physiol* 109, 53-61.
- Hoecker, U., Xu, Y., and P. H. Quail. (1998). *SPA1*: a new genetic locus involved in phytochrome A-specific signal transduction. *Plant Cell* 10, 19-33.
- Holmes, M. G., Smith, H. (1977). The function of phytochrome in the natural

- environment. I Characterization of daylight for studies in photomorphogenesis and photoperiodism. *Photochem. Photobiol* 25, 533-538.
- Holmes, M. G., Beggs, C. J., Jabben, M., and Schaefer, E. (1982). Hypocotyl growth in *Sinapis alba* L.: the roles of light quality and quantity. *Plant Cell Environ* 5, 45-51.
- Hsu, D. S., Zhao, X. D., Zhao, S. Y., Kazantsev, A., Wang, R. P., Todo, T., Wei, Y. F., and Sancar, A. (1996). Putative human blue-light photoreceptor hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. *Biochemistry* 35, 13871-13877.
- Huala, E., Oeller, P. W., Liscum, E., Han, I-S., Larsen, E., Briggs, W. R. (1997). *Arabidopsis* NPH1: A protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278, 2120-2123.
- Hudson, M., C. Ringli, M. T. Boylan, and P. H. Quail. (1999). The FAR1 locus encodes a novel nuclear protein specific to phytochrome A signaling. *Gen Devel* 13, 2017-2027.
- Jabben, M., and E. Schäfer. (1982). Dependence of Pfr/Ptot ratios on light quality and light quantity. *Photochem Photobiol* 35:709-712.
- Johnson, E., Bradley, M., Harberd, P., and 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.
- Kasperbauer, M. J. (1971). Spectral distribution of light in a tobacco canopy and effects of end-of-day light quality on growth and development. *Plant Physiol* 47, 775-778.
- Keller, J. M., Shaklin, J., Vierstra, R., and Hershey, H. P. (1989). Expression of a functional monocotyledonous phytochrome in transgenic tobacco. *EMBO Journal* 8, 1005-1012.
- Kern, R., Gasch, A., Deak, M., Kay, S., and Chua, N.-H. (1993). phyB of tobacco, a new member of the phytochrome family. *Plant Physiol* 102, 1363-1364.
- Kircher, S., Wellmer, F., Nick, P., Rügner, A., Schäfer, E., and Harter, K. (1999). Nuclear import of the parsley bZIP transcription factor CPRF2 is regulated by phytochrome photoreceptors. *J Cell Biol* 144
- Kim, L., S. Kiercher, R. Toth, E. Adam, E. Schaefer, and F. Nagy. (2000). light induced

- nuclear import of phytochrome-A:GFP fusion proteins is differentially regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis*. *Plant J* 22,125-133.
- Kleiner, O., Kircher, S., Harter, K., and Batschauer, A. (1999). Nuclear localization of the *Arabidopsis* blue-light receptor cryptochrome 2. *Plant J* 19, 289-296.
- Koornneef, M., Rolf, E., and Spruit, C. J. P. (1980). Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 100, 147-160.
- Koornneef, M., Hanhart, C. J., and van der Veen, J. H. (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics* 229, 57-66.
- Kronenberg, G. H. M., and Kendrick, R. E. (1986). The physiology of action. In *Photomorphogenesis in plants* (eds R.E. Kendrick, G.H.M. Kronenberg), 99-114. Marthinus Nijhoff Publishers, Amsterdam.
- Lagarias, D., Wu, S.-H., and Lagarias, C. (1995). A typical phytochrome gene structure in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *Plant Mol Biol* 29, 1127-1142.
- Lagarias, J. C., and Lagarias, D.M. (1989). Self-assembly of synthetic phytochrome holoprotein *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 5778-5780.
- Levy, Y.Y and dean, C. (1998). The transition to flowering. *Plant Cell* 10, 1973-1990.
- Leyva, A., Jarillo, J. A., Salinas, J., and Martinez-Zapater, J. M. (1995). Low Temperature induces the accumulation of *Phenylalanine Ammonia-Lyase* and *ChalconeSynthase* mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiol* 108, 39-46.
- Lin, C., Yang, H., Guo, H., Mockler, T., Chen, J., and A, C. (1998). Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by blue light receptor cryptochrome 2. *Proc Natl Acad Sci* 95, 2686-2690.
- Lin, C. (2000). Photoreceptors and Regulation of flowering time. *Plant Physiology* 123, 39-50.
- Liscum, E., and Briggs, W. R. (1995). Mutations in the *NPH1* locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* 7, 473-485.
- López Juez, E., Nagatani, A., Tomizawa, K.-I., Deak, M., Kern, R., Kendrick, R. E., and

- Furuya, M. (1992). The cucumber long hypocotyl mutant lacks a light-stable PHYB-like phytochrome. *Plant Cell* 4, 241-251.
- Malhotra, K., Sang-Tae, K., Batschauer, A., Dawut, L., and Sancar, A. (1995). Putative blue light photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with a high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity. *Biochem* 34, 6892-6899.
- Mancinelli, A. L. (1980). The photoreceptors of the high irradiance responses of plant photomorphogenesis. *Photochem Photobiol* 32, 853-857.
- Mancinelli, A. L. (1994). The physiology of phytochrome action. In "Photomorphogenesis in plants" (R. E. Kendrick and G. H. M. Kronenberg, Eds.), pp. 211-269. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Martinez-Zapater, J. M., Coupland, G., Dean, C., and Koornneef, M. K. (1994). The transition to flowering in *Arabidopsis*. In "*Arabidopsis*" (E. M. Meyerowitz and C. R. Somerville, Eds.). Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mas, P., Devlin, P. F., Panda, S., and Kay, S. (2000). Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* 408, 207-211.
- Mathews, S., and Sharrock, R. A. (1997). Phytochrome gene diversity. *Plant Cell Environ* 20, 666-671.
- Mazzella, M.A. (1995) Control de los mecanismos de la partición de carbono por el fitocromo. Seminario de Licenciatura FCEyN.
- Mazzella, M. A., Alconada Magliano, T. M., and Casal, J. J. (1997). Dual effect of phytochrome A on hypocotyl growth under continuous red light. *Plant Cell Environ* 20, 261-267.
- Mazzella, M. A., Bertero, D., Casal, J. J. (2000). Temperature-dependent internode elongation in vegetative plants of *Arabidopsis* lacking phytochrome B and cryptochrome 1. *Planta*, 210, 497-501.
- Mazzella MA., and casal JJ (2001a). Interactive signaling between phytochromes and cryptochromes generates de-etiolation homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell Environ* 24, 155-163
- Mazzella, M.A, Cerdan, P. Staneloni, R, Casal, J. (2001b) Hierarchical coupling of

- phytochromes and cryptochromes reconciles stability and light modulation of modulation of *Arabidopsis* development. *Development*, en prensa
- McCormac, A. C., Wagner, D., Boylan, M. T., Quail, P. H., Smith, H., and 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.
- McDaniel, C. N., Singer, S. R., and Smith, S. M. E. (1992). Developmental stages associated with the floral transition. *Developmental Biology* 153, 59-69.
- Meijer, G., and Engelsma, G. (1965). The synergistic influence of a pre-irradiation on the photoinhibition of gherkin seedlings. *Photochem Photobiol* 4, 251-258.
- Mockler, T., Guo, H., Yang, H., Duong, H., and Lin, C. (1999). Antagonistic actions of *Arabidopsis* cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development* 126, 2073-2082.
- Mohr, H. (1994). Coaction between pigment systems. In "Photomorphogenesis in Plants" (R. E. Kendrick and G. H. M. Kronenberg, Eds.), pp. 353-373. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Motchoulski, A., and Liscum, E. (1999). *Arabidopsis* NPH3: a NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism. *Science* 286, 961-964.
- Mozley, D., and Thomas, B. (1995). Developmental and photobiological factors affecting photoperiodic induction in *Arabidopsis thaliana Heynh Landsberg erecta*. *J Exp Bot* 46, 173-179.
- Mustilli, A. C., and Bowler, C. (1997). Tuning in to the signals controlling photoregulated gene expression in plants. *EMBO J.* 16, 5801-5806.
- Nagatani, A., Kay, S. A., Deak, M., Chua, N.-H., and Furuya, M. (1991a). Rice type I phytochrome regulates hypocotyl elongation in transgenic tobacco seedlings. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 5207-5211.
- Nagatani, A., Chory, J., and Furuya, M. (1991b). 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., and Chory, J. (1993). Isolation and initial characterization of

- Arabidopsis* mutants that are deficient in phytochrome A. *Plant Physiol* 102, 269-277.
- Nagy, F., And Schaefer, E. (2000). Nuclear and cytosolic events of light induces, phytochrome-regulated signalling in higher plants. *EMBO J* 19, 157-163.
- Neff, M., and Chory, J. (1998). Genetic Interactions between Phytochrome A, Phytochrome B and Cryptochrome 1 during *Arabidopsis* Development. *Plant Physiol* 118, 27-36.
- Neuhaus, G., C. Bowler, R. Kern, and N.-H. Chua. (1993). Calcium/Calmodulin-dependent and independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell* 73, 937-952.
- Ni, M., Tepperman, J. M., Quail, P. H. (1998). PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* 95, 657-667.
- Ni, M., Tepperman, J. M., and Quail, P. H. (1999). Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light . *Nature* 400
- Oelmüller, R., and H. Mohr. (1984). Induction versus modulation in phytochrome-regulated biochemical processes. *Planta* 161:165-171.
- Oelmüller, R., and H. Mohr. (1985). Mode of coaction between blue/UV light and light absorbed by phytochrome in light-mediated anthocyanin formation in the milo (*Sorghum vulgare* Pers.) seedling. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 6124-6128.
- 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.
- Parks, B. M., Quail, P. H., and Hangarter, R. P. (1996). Phytochrome A regulates red-light induction of phototropic enhancement in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 110, 155-162.
- Pickett, F. B., and Meeks-Wagner, D. R. (1995). Seeing double: appreciating genetic redundancy. *Plant Cell* 7, 1347-1356.
- Pratt, L. H., Cordonnierpratt, M. M., Hauser, B., and Caboche, M. (1995). Tomato contains two differentially expressed genes encoding B-type phytochromes, neither of which can be considered an ortholog of *Arabidopsis* phytochrome B. *Planta* 197, 203-206.

- Quail, P. H. (1991). Phytochrome: a light-activated molecular switch that regulates plant gene expression. *Annu. Rev. Genet* 25, 389-409.
- Quail, P. H., Boylan, M. T., Parks, B. M., Short, T. W., Xu, Y., and Wagner, D. (1995). Phytochromes: Photosensory perception and signal transduction. *Science* 268, 675-680.
- Reed, J. W., Nagpal, P., Poole, D. S., Furuya, M., and Chory, J. (1993). Mutations in the gene for the Red/Far-Red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 5, 147-157.
- Reed, J. W., Nagatani, A., Elich, T. D., Fagan, M., and Chory, J. (1994). Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in *Arabidopsis* development. *Plant Physiology* 104, 1139-1149.
- Robson, P. R. H., Whitelam, G. C., and Smith, H. (1993). Selected components of the shade-avoidance syndrome are displayed in a normal manner in mutants of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica rapa* deficient in phytochrome B. *Plant Physiol* 102, 1179-1184.
- Sancar, A. (1994). Structure and function of DNA photolyase. *Biochem* 33, 2-9.
- Schäfer, E., Beggs, C. J., Fukshansky, L., Holmes, M. G., and Jabben, M. (1981). A comparative study of the responsivity of *Sinapis alba* L. seedlings to pulsed and continuous irradiation. *Planta* 153, 258-261.
- Scopel, A., Ballare, C., and Sánchez, R. A. (1991). Induction of extreme light sensitivity in buried weed seeds and its role in the perception of soil cultivation. *Plant Cell Environ* 14, 501-508
- Sharrock, R. A., and Quail, P. H. (1989). Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes and Development* 3, 1745-1757.
- Shinomura, T., Nagatani, A., Chory, J., and Furuya, M. (1994). The induction of seed germination in *Arabidopsis thaliana* is regulated principally by phytochrome B and secondarily by phytochrome A (vol 104, pg 363, 1994). *Plant Physiol* 105, 773.
- Shinomura, T., Nagatani, A., Hanzawa, M., Kubota, M., Watanabe, M., and Furuya, M.

- (1996). Action spectra for phytochrome A- and phytochrome B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93, 8129-8133.
- Short, T. W. (1999). Overexpression of *Arabidopsis* phytochrome B inhibits phytochrome A function in the presence of sucrose. *Plant Physiol* 119, 1497-1505.
- Smith, H. (1982). Light quality, photoperception and plant strategy. *Ann Rev Plant Physiol* 33, 481-518.
- Smith, H., Xu, Y., and Quail, P. H. (1997). Antagonistic but complementary actions of phytochromes A and B allow optimum seedling de-etiolation. *Plant Physiol* 114, 637-641.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L., and Meyerowitz E. M. (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2, 755-767.
- Somers, D. E., Sharrock, R. A., Tepperman, J. M., and Quail, P. H. (1991). The *hy3* long hypocotyl mutant of *Arabidopsis* is deficient in phytochrome B. *Plant Cell* 3, 1263-1274.
- Somers, D. E., and Quail, P. H. (1995). Temporal and spatial expression patterns of PHYA and PHYB genes in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 7, 413-427.
- Soo Soh, M., S. S. Hong, H. Hanzawa, M. Furuya, and H. G. Nam. (1998). Genetic identification of FIN2, a far red light-specific signaling component of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16, 411-419.
- Taylor, B. Zhulin, I. (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen redox potential and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 479-506.
- Thomas, B. (1991). Phytochrome and photoperiodic induction. *Physiol Plantarum* 81, 571-577.
- Thomas, B., and Vince-Prue, D. (1997). "Photoperiodism in plants." Academic Press. New York.
- Thummler, F., Dufner, M., Kreisler, P., and Dittrich, P. (1992). Molecular cloning of a novel phytochrome gene of the moss *Ceratodon purpureus* which encodes a putative light-regulated protein kinase. *Plant Mol Biol* 20, 1003-1017.
- Todo, T., Tsuji, H., Otoshi, E., Hitomi, K., Kim, S. T., and Ikenaga, M. (1997).

- Characterization of human homolog of (6-4) photolyase. *Mutant Research* 384, 195-204.
- Tokuhisa, J. G., S. M. Daniels, and P. H. Quail. (1985). Phytochrome in green tissue: spectral and in vivo chemical evidence for two distinct molecular species of phytochrome in light-grown *Avena sativa* L. *Planta* 164, 321-332.
- Van Tuinen, A., Kerckhoffs, L. H. J., Nagatani, A., Kendrick, R. E., and Koornneef, M. (1995). Far-red light insensitive, phytochrome A deficient mutants of tomato. *Mol Gen Genet* 246, 133-141.
- Vince-Prue, D. (1994). The duration of light and photoperiodic responses. In: Kendrick RE and Kronenberg GHM, eds. *Photomorphogenesis in plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 447-490. .
- Wagner, D., Tepperman, J. M., and Quail, P. H. (1991). Overexpression of phytochrome B induces a short hypocotyl phenotype in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell* 3, 1275-1288.
- Wagner, D., Fairchild, C.D., Kuhn, R. T., and Quail, P. H. (1996). Chromophore-bearing NH₂-terminal domains of phytochromes A and B determines their photosensory specificity and differential light lability. *Proc. Natl Acad Sci USA* 93, 4011-4015.
- Wagner, D., E. Hoecker, and P. H. Quail. (1997). *RED1* is necessary for phytochrome B-mediated red light specific signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9, 731-743.
- Wang, X., and I. Moritoshi. (1997). Blue light-induced shrinking of protoplasts from *Arabidopsis* hypocotyls: mediation by a blue-light receptor and responsiveness control by phytochrome. *Plant Physiol* 114:281.
- Wang, X., and Iino, M. (1998). Interaction of Cryptochrome 1, Phytochrome, and Ion Fluxes in Blue-light-Induced Shrinking of *Arabidopsis* Hypocotyl Protoplast. *Plant Physiol* 117, 1265-1279.
- Whitelam, G. C., and Smith, H. (1991). Retention of phytochrome-mediated shade avoidance responses in phytochrome-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., and

- Harberd, N. P. (1993). Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell* 5, 757-768.
- Yamaguchi, R., Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay, S. A., and Nagatani, A. (1999). Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*. *J Cell Biol* 145
- Yang, H., WU, Y., tang, R., Liu, D., Liu, Y., and Cashmore, A.R. (2000). The C-termini of *Arabidopsis* cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell* 103, 815-827.
- Yanovsky, M. J., Casal, J. J., and Whitelam, G. C. (1995). Phytochrome A, phytochrome B and HY4 are involved in hypocotyl growth responses to natural radiation in *Arabidopsis*: weak de-etiolation of the *phyA* mutant under dense canopies. *Plant Cell Environ* 18, 788-794.
- Yanovsky, M. J., Casal, J. J., and Luppi, J. P. (1997). The *VLF* loci, polymorphic between ecotypes Landsberg *erecta* and Columbia dissect two branches of phytochrome A signalling pathways that correspond to the very-low fluence and high-irradiance responses of phytochrome. *Plant J* 12, 659-667.
- Yanovsky, M. J., M. Izaguirre, J. A. Wagmaister, C. Gatz, S. D. Jackson, B. Thomas, and J. J. Casal. (2000). Phytochrome A resets the circadian clock and delays tuber formation under long days in potato. *Plant J.* 23, 223-232.
- Yanovsky, M. J., Mazzella, M. A., and Casal, J.J. (2000). A quadruple photoreceptor mutant still keeps track of time. *Current Biology* 10, 1013-1015.
- Yanovsky, M. J., Whitelam, G. C., and Casal, J.J. (2000). *phy3-1* retains inductive responses of phytochrome A. *Plant Physiol* 123.
- Yeh, K.-C., S.-H. Wu, J. T. Murphy, and J. C. Lagarias. (1997). A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science.* 277,1505-1508.
- Yeh, K.-C., Lagarias, C. (1998). Eukariotic phytochromes: Light-regulated serine / threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc Natl Acad Sci, USA* 95, 13976-13981.