

Tesis de Posgrado

Regulación de la sensibilidad a las señales percibidas por el fitocromo A en *Arabidopsis thaliana*

Oliverio, Karina Andrea

2003

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:

Oliverio, Karina Andrea. (2003). Regulación de la sensibilidad a las señales percibidas por el fitocromo A en *Arabidopsis thaliana*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3666_Oliverio.pdf

Cita tipo Chicago:

Oliverio, Karina Andrea. "Regulación de la sensibilidad a las señales percibidas por el fitocromo A en *Arabidopsis thaliana*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3666_Oliverio.pdf

EXACTAS UBA

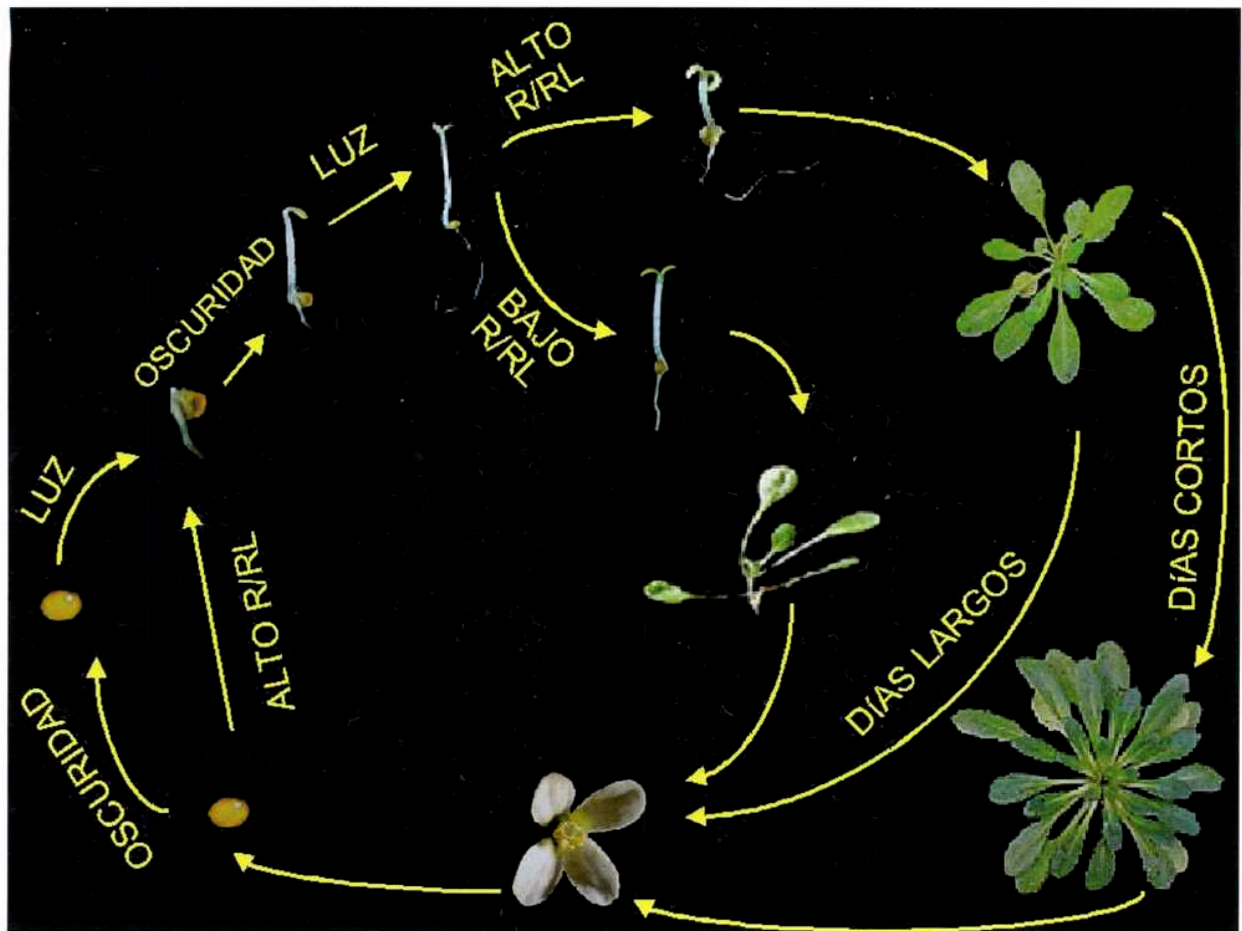
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

REGULACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LAS
SEÑALES PERCIBIDAS POR EL FITOCROMO A
EN *Arabidopsis thaliana*



3666

KARINA ANDREA OLIVERIO

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

REGULACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LAS SEÑALES
PERCIBIDAS POR EL FITOCROMO A EN *Arabidopsis thaliana*.

Tesis presentada para optar por el grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Licenciada: Karina Andrea Oliverio

Director: Dr. Jorge José Casal

Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas Vinculadas a la Agricultura
(IFEVA)
Departamento de Ecología
Facultad de Agronomía
Universidad de Buenos Aires
2003

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Casal por su guía y su excelencia académica. Por su dedicación y su trato amable. A su lado aprendí a ver las cosas con optimismo y me transmitió su entusiasmo en el fascinante mundo de los fitocromos.

Al Dr. Rodolfo Sánchez, por haberme dado la oportunidad de trabajar en el IFEVA, instituto que dirige.

Al Dr. Marcelo Yanovsky por su calidez humana y su solidaridad.

Al Dr. Roberto Staneloni por su buen trato y haberme guiado en los aspectos moleculares de esta tesis.

A Laura Luccioni y Hernán Boccalandro por estar a mi lado, por su afecto y estar siempre dispuestos a ofrecer su ayuda. Son mucho más que compañeros del grupo, son mis amigos del alma.

A todo el grupo de fotomorfogénesis que estuvo trabajando a mi lado estos años en especial a Sabrina Buchovsky, Verónica Arana, Mariana Rutitsky, Constanza Rossi, Gabriela Auge, Ana Faigon, Javier Botto y Santiago Tupkin por su enorme compañerismo y amistad.

A María Crepy y Silvina Garcia por su colaboración en muchos experimentos.

A Marina Omacini por hacerme cómplice de un sueño que cambió para siempre mi vida y desde entonces nos une una hermosa amistad.

A Alejandra Mella por su amistad, buenos consejos y solidaridad.

A Mariana Conte por su compañía, amistad y mantenerse firme en sus convicciones.

A Miriam Izaguirre por su amistad y su valiosísima colaboración en esta última etapa.

A la gente del Instituto en especial a Roxana Aragón, Pamela Graff, Alfonsina Szpeiner, Laura Yahdjian, Déborah Rondanini, Rafael Mc Donough, Verónica Pancotto, Pedro Tognetti, Carlos Mazza, Verónica Herrera, Silvia De Simone, Ana María Zima, María Isabel Miranda, Andrea Uchitel, Pedro Gundel, José Rotundo, Ignacio Garzarón, Carla Caputo, Javier Moreno, Santiago Verón, Marina Machera, Diego Ferraro, María Semmartin, Enrique Chaneton, Rolando León, Lucila De Miguel, Roberto Tornese, Jazmín Vrsalovic, Cebanda Villalba, Juan Carlos Villardi y Ana Garaño, por la incalculable ayuda que me brindaron durante todos estos años pero principalmente por su afecto.

A mis compañeros de oficina Carla Giordano, Marina González Polo, Fernando Biganzoli y Andrés Rolhauser por los recreos con mate y charlas y sobre todo por el aguante y buena onda.

A mis amigos de toda la vida, Liliana Jiménez, Alejandra Gutierrez, Gabriela Forastieri, Marcela Alampi, Karina Cardaci, Sandra Bilotto, Catalina Varia, Alicia Sansalone, Graciela Bevaqua, Susana Bregia, Adriana Novoa ,Edhit Albano, Valeria Escobar, Nilda Germano y Nélide Picciauoco, qué sería mi vida sin ustedes.

A León Gieco, Silvio Rodriguez, Pablo Milanés y Serrat por su arte y compañía en las horas de escritura.

A mis padres por estar siempre a mi lado.

A mi hermano, Mónica Bielsa, Julián y Nuria Oliverio que a pesar de la distancia que nos separa entán siempre en mi corazón.

Al hermoso recuerdo de mi abuela Luisa y Claudio López.

Finalmente gracias a Dios por poner en mi camino a toda esta gente tan maravillosa.

Esta tesis quiero dedicársela a todos los soñadores que como yo celebran la vida, la amistad y el amor. Y como dice Silvio Rodríguez, “no hacen falta alas para hacer un sueño, basta con las manos, basta con el pecho, basta con las piernas y con el empeño. No hacen falta alas para ser más bellos basta con el buen sentido del amor inmenso, no hacen falta alas para andar en vuelo”.

Por eso se la dedico a mis grandes amores: a mi mamá, mi papá, a Gaby mi hermano, a Mónica y a los soles de mi vida, mis sobrinos Julián y Nuria y a los que comparten mis sueños, mis amigos especialmente a Marina Omacini, Mariana Conte y Liliana Jiménez. Todos ustedes dan luz y regulan la sensibilidad de mi alma...

KARINA.

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

Quiin*, M. H. **Oliverio***, K. A. Yanovsky, M. J. and Casal, J. J. (2002) CP3 is involved in negative regulation of phytochrome A signalling in *Arabidopsis*. *Planta*. **215**: 557-564

Baumgardt*, R. L. **Oliverio***, K. A. Casal, J. J. and Hoecker, U. (2002) SPA1, a component of phytochrome A signal transduction, regulates the lighth signaling current. *Planta*. **215**: 745-753

Casal, J. J. Luccioni, L. G. **Oliverio, K. A.** Boccalandro, H. E. (2003) Lighth, phytochrome signalling and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Photochemical & Photobiological Sciences*. **2**: 1-13

* co-primeros autores

RESUMEN

Las plantas utilizan la luz no sólo como fuente de energía en la fotosíntesis sino también como fuente de información del ambiente circundante. Las señales lumínicas pueden ser percibidas por las plantas si estas poseen receptores adecuados. El fitocromo (phy) es un fotorreceptor que actúa principalmente en la región del espectro del R (rojo) y RL (rojo lejano). En *Arabidopsis thaliana* hay cinco fitocromos (phyA-phyE). Las señales lumínicas percibidas por los fitocromos afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas durante todo el ciclo de vida. Una de las características distintivas de las respuestas a la luz está dada por los cambios en la sensibilidad que se producen en distintos contextos del desarrollo.

El objetivo de esta tesis es identificar los mecanismos involucrados en la regulación de la sensibilidad a la luz, mediante la caracterización fisiológica y genética de mutantes de *Arabidopsis thaliana* para comprender las implicancias de las alteraciones en su capacidad de respuesta a la luz.

En esta tesis se caracterizaron nuevos componentes genéticos de la regulación de la sensibilidad de las respuestas a la luz mediadas por el phyA, que actúa en dos vías de señalización VLFR y HIR. Algunos de los mutantes estudiados fueron encontrados por su efecto sobre la acción del phyA, pero no se sabía si afectaban el VLFR y/o HIR como el mutante *spa1*. Otros eran conocidos porque presentaban morfología alterada en la planta adulta o defectos en el tiempo a floración pero no habían sido vinculados al phyA como el *cp3* y *gi5*. Finalmente el *eve2* es un nuevo locus identificado en esta tesis.

Los resultados de esta tesis muestran que los mutantes *cp3*, *spa1* y *eve2* presentan alta sensibilidad a la luz. El mutante *cp3* presenta un VLFR aumentado sin afectar el HIR en la señalización del phyA. El mutante *spa1* aumenta tanto las respuestas VLFR como las HIR pero el efecto de la mutación es mucho más pronunciado en el VLFR. El mutante *eve2* aumenta las respuestas VLFR y si bien presenta HIR normal afecta la transición del VLFR al HIR; *eve2* presenta un efecto más generalizado que el resto de los mutantes estudiados ya que afecta de alguna manera las señales mediadas por otros fotorreceptores. El CP3, SPA1 y EVE2 serían componentes negativos en la señalización del phyA. El mutante *gi*, presenta atenuadas las respuestas en el VLFR y esto sugiere que actuaría como un regulador positivo en la señalización del phyA. Debido a la participación de *GI* en los ritmos circadianos y en la inducción de la floración por la vía fotoperiódica; estudiamos el efecto de la mutación en el ritmo de la sensibilidad a la luz por parte del phyA. Los resultados muestran que el efecto del GI en la señalización del phyA sería independiente de su rol en el reloj.

La versatilidad en las respuestas mediadas por el phyA pone de manifiesto la existencia de finos mecanismos de regulación que les permiten a las plantas responder en forma precisa a las señales del ambiente lumínico y en virtud de esa información ajustar el crecimiento y desarrollo ignorando cambios del ambiente que no constituyan verdaderas señales.

Palabras claves: *Arabidopsis thaliana*, señales de transducción, fotorreceptores, phyA, VLFR, HIR

SUMMARY

Plants use the light not only as a source of energy in the photosynthesis, but also as an informational signals from the environment. Light signals can only provide information to the plants if they have the appropriate receptors to perceive them. Phytochromes (phy) are photoreceptors that act mainly in the R (red) and FR (far red) region of the spectrum. In *Arabidopsis thaliana* there are five phytochromes (phyA-phyE). Light signals perceived by phy affect growth and development throughout the entire life cycle of plants. One of the distinguishing characteristics of the responses to the light is given by the changes in sensitivity that take place in different contexts of development.

The aim of this thesis is to identify mechanisms involved in the regulation of sensitivity to the light, by means of physiological and genetic characterisation of *Arabidopsis* mutants. In this thesis, I present new genetic components of the circuit regulating the sensitivity to light signals perceived by phyA. phyA acts in two signalling pathways, VLFR and HIR. Some of the studied mutants (*spa1*) were known by their effect on the action of phyA, but it was not known if they affected VLFR and/or HIR. Others (*cp3*, *gi*) were known by this altered morphology or flowering time, but had not been connected to phyA signalling. Finally, *eve2* is a new locus identified in this thesis. *cp3*, *spa1* and *eve2* display high sensitivity to the light. *cp3* increased VLFR without affecting the HIR of phyA. *spa1* increases both VLFR and HIR, but the effect of the mutation is much more pronounced on VLFR. *eve2* increases the VLFR, the transition of the VLFR to the HIR, the LFR and the responses mediated by a specific blue light photoreceptor. *eve2* displays a generalised effect on the response mediated by different photoreceptors. CP3, SPA1 and EVE2 would be negative components in the signalling of phyA. The studied mutant *gi* attenuates the VLFR and this suggests that it would act as a positive regulator in the signalling of phyA. Based on the involvement of Gi in the circadian clock and in the control of flowering time (photoperiodic pathway), we studied the effect of the mutation on the gating to phyA. The results show that the effect of the GI in the signalling of phyA would be independent of its roll in the clock. The versatility in the responses mediated by phyA provides evidence for the existence of fine mechanisms of regulation that allow the plants to respond in a precise manner to the light signals. By virtue of this regulator plants would achieve their capacity to fit the growth and development in response to the environmental information ignoring changes that do not constitute true signals.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, signals transduction, photoreceptors, phyA, VLFR, HIR.

ABREVIATURAS

<i>cp3</i>	mutante semi-enano de <i>CP3</i>
<i>cry1</i>	criptocromo 1 (apoproteínas + cromóforo)
<i>cry2</i>	criptocromo 2 (apoproteínas + cromóforo)
e.e.	error standard
<i>eve1</i>	mutante de la cadena de transducción de señales del phyA
<i>eve2</i>	mutante de la cadena de transducción de señales del phyA
<i>GI</i>	gen <i>GIGANTEA</i>
<i>gi</i>	mutante de floración tardía
GI	proteína codificada por <i>GI</i>
HIR	respuestas a altas irradiancias de rojo lejano continuo
LFR	respuestas a flujos moderados de luz roja
P	fitocromo total = Pr + Pfr
Pfr	forma activa del fitocromo; $\lambda_{\text{máx}} = 730 \text{ nm}$
Pr	forma inactiva del fitocromo; $\lambda_{\text{máx}} = 660 \text{ nm}$
Pfr/P	proporción del fitocromo total que se encuentra en la forma activa
<i>PHY A-E</i>	genes que codifican para los fitocromos A-E
<i>phy A, B, C, D, E</i>	mutantes del fitocromo A, B, C, D o E.
phy A, B, C, D, E	fitocromos A, B, C, D o E (apoproteínas + cromóforo)
PM	peso molecular
R	luz roja
RL	luz rojo-lejana
<i>SPA1</i>	gen supresor de <i>phA-105</i>
<i>spa1</i>	mutante supresor de <i>phyA-105</i>
SPA1	proteína codificada por el gen <i>SPA1</i>
VLFR	respuestas a flujos muy bajos de luz
WT	genotipo salvaje

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. LAS SEÑALES LUMÍNICAS	1
1.1.2 Regulación del crecimiento y desarrollo por las señales del ambiente lumínico.....	2
1.1.2.1 Germinación.....	3
1.1.2.2 Etiolación y des-etiolación.....	3
1.1.2.3 Modulación de la competitividad con plantas vecinas.....	4
1.1.2.4 Inducción floral.....	5
1.2 PERCEPCIÓN DE LAS SEÑALES LUMÍNICAS	6
1.2.1 Diferentes fotorreceptores controlan la percepción de la luz en plantas.....	6
1.2.2 Receptores de luz azul.....	6
1.2.3 Los fitocromos.....	7
1.2.3.1 Los fitocromos son una familia de fotorreceptores.....	9
1.3 CAMINOS DE SEÑALIZACIÓN Y COMPONENTES DE LA CADENA DE TRANSDUCCIÓN DE LOS FITOCROMOS	19
1.3.1 Regulación de la sensibilidad a la luz.....	
1.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
2 MATERIALES Y MÉTODOS	23
OBJETIVO DE LA TESIS	24
3 RESULTADOS	30
3.1. CP3 está involucrado en la regulación negativa de la señalización del fitocromo A en <i>Arabidopsis</i>	31

3.2 SPA1, regula negativamente las respuestas en la vía de señalización del fitocromo A.....	43
3.3 GIGANTEA regula las respuestas mediadas por el phyA en la desetiología de <i>Arabidopsis thaliana</i> , independientemente de su rol en el reloj circadiano.....	51
3.4 Aislamiento y caracterización de nuevos mutantes que afecten las respuestas VLFR.....	61
4 DISCUSIÓN.....	77
5 BIBLIOGRAFÍA.....	I

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Para crecer y desarrollarse adecuadamente los organismos perciben y procesan la información del ambiente circundante. Los animales pueden moverse en búsqueda de condiciones ambientales favorables para su supervivencia, las plantas, en cambio como organismos sésiles son especialmente plásticas a las fluctuaciones del ambiente. El estímulo ambiental que más afecta el desarrollo de las plantas es la luz. Algunas fluctuaciones en el ambiente lumínico constituyen señales cruciales para la supervivencia de las plantas, que a través de sistemas fotosensoriales, perciben dichas señales del ambiente circundante y ajustan de modo dramático el crecimiento y desarrollo. No es sorprendente entonces que durante el proceso evolutivo las plantas hayan adquirido sofisticados mecanismos de percepción de las señales lumínicas (Smith, 2000).

1.1 LAS SEÑALES LUMINICAS

La luz cumple un rol principal a lo largo del ciclo biológico y es uno de los estímulos ambientales que mayor efecto tiene sobre las plantas. Representa la fuente de energía en la fotosíntesis que posibilita la formación y desarrollo de hojas, tallos, raíces y flores; constituye además una fuente de información sobre las diversas condiciones del ambiente circundante. Es posible al menos identificar cuatro características del ambiente lumínico que constituyen señales informativas para las plantas: la irradiancia (cantidad de luz por unidad de tiempo y superficie), la composición espectral (relación entre la cantidad de luz en determinadas zonas del espectro), el fotoperíodo (duración diaria del período lumínico) y la dirección de incidencia. Los cambios en estas variables constituyen señales que permiten a las plantas detectar (muchas veces en forma anticipada) situaciones ecológicas tan variadas como la proximidad a la superficie del suelo durante el proceso de emergencia, la proximidad de plantas vecinas que representan un riesgo de sombreado futuro y la llegada de la estación climática favorable para su crecimiento (Casal *et al.*, 2003). Utilizando esa información las plantas ajustan sus propios procesos, desde el momento de la germinación hasta la des-etiolación, fototropismo y floración para coordinar su crecimiento y desarrollo con el ambiente circundante (Kendrick y Kronenberg, 1994). A los fenómenos por medio de

los cuales las plantas sensan y responden a la información provista por el ambiente lumínico se los denomina colectivamente FOTOMORFOGENESIS, que literalmente significa influencia de la luz (foto) en el desarrollo (génesis) de la forma (morfo). La evolución ha provisto a las plantas de sofisticados mecanismos de percepción de las señales lumínicas, involucran fotorreceptores capaces de detectar diferentes longitudes de onda. Los fotorreceptores modulan el desarrollo y crecimiento de las plantas de acuerdo a la cantidad y calidad de luz que perciben. Básicamente son de tres tipos: los fitocromos que perciben la luz en la región del espectro del R (rojo) y RL (rojo lejano) pero que secundariamente trabajan en otras zonas principalmente en azul (Quail, 2002), los criptocromos y fototropinas, que absorben la luz azul y UV-A (Briggs *et al.*, 2001, Cashmore *et al.*, 1999).

1.1.2 Regulación del crecimiento y desarrollo por las señales del ambiente lumínico.

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 inducción floral (Fig. 1).

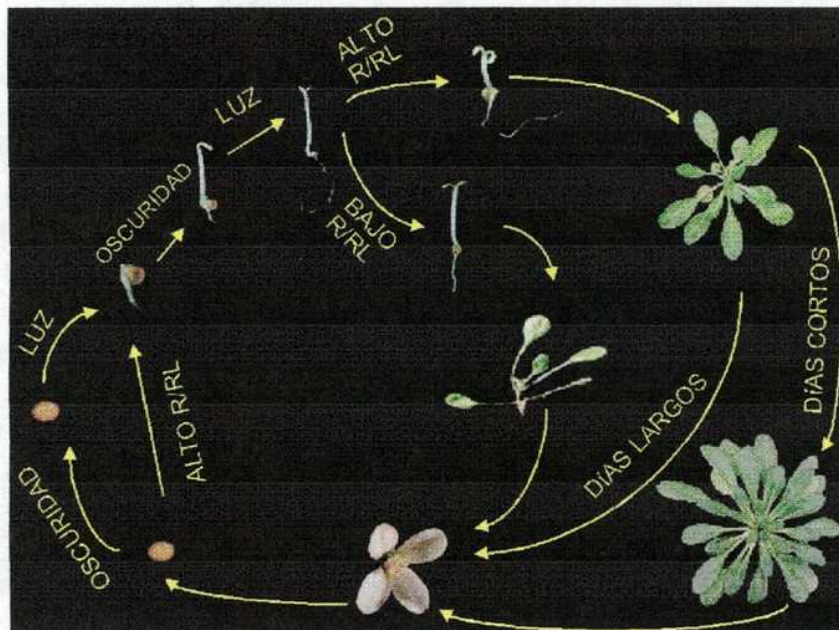


Figura:1: Diversas señales de lumínicas modulan el crecimiento y desarrollo en diferentes etapas del ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*.

1.1.2.1 Germinación

El tiempo y el lugar donde una semilla germina son críticos para la supervivencia de la planta. En *Arabidopsis* la germinación es promovida por la luz. (Fig. 1). Varias especies producen semillas que, dependiendo de las condiciones ambientales, requieren ser expuestas a la luz para la germinación (Casal y Sánchez, 1998). Este proceso puede ser desencadenado aún por breves transiciones de la oscuridad a la luz experimentadas por semillas bajo tierra durante la remoción del suelo (Scopel *et al.*, 1991).

La germinación de varias especies está afectada fuertemente por la calidad de luz. La presencia de otras plantas reduce el flujo y altera la composición espectral de la luz incidente. Los órganos verdes de las plantas absorben mucho más intensamente la luz R que la RL, por lo tanto la luz recibida por la semilla dispuesta sobre el suelo cubierto de vegetación es proporcionalmente más rica en RL. Las altas relaciones de R/RL que se producen cuando hay claros en la vegetación promueven la germinación, este control permite ajustar el establecimiento de nuevas plántulas de manera de evitar la competencia (Casal, et al., 2003).

1.1.2.2 Etiolación y Des-etiolación

El pasaje de oscuridad completa a ciclos de luz/oscuridad es la señal lumínica que desencadena el proceso de des-etiolación. Esta transición representa una fase crucial para el establecimiento futuro de la planta. El crecimiento en oscuridad (por debajo del suelo) depende de las sustancias de reserva mientras que luego del proceso de emergencia la provisión de energía para el crecimiento es posible vía el proceso fotosintético.

En oscuridad las plántulas siguen un patrón de crecimiento y desarrollo caracterizado por la etiolación, en el que se favorece el alargamiento del tallo o el hipocotilo en el caso de *Arabidopsis* y se reprime el desarrollo de las hojas. La etiolación incrementa así la posibilidad que las hojas sean elevadas por sobre la superficie del suelo y alcancen la fotoautotofía antes que se agoten las reservas de la semilla. Una vez que la planta alcanza la superficie, se produce un cambio profundo en el desarrollo llamado des-etiolación (Fig. 2). La des-etiolación involucra cambios morfológicos como la

inhibición del crecimiento del hipocotilo, la estimulación del desarrollo de las hojas, formación de la maquinaria fotosintética y la inducción de algunos genes como *LHCB* y *RBCS*. La existencia de mutantes en *Arabidopsis thaliana* que muestran un fenotipo des-etiolado cuando son cultivados 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).

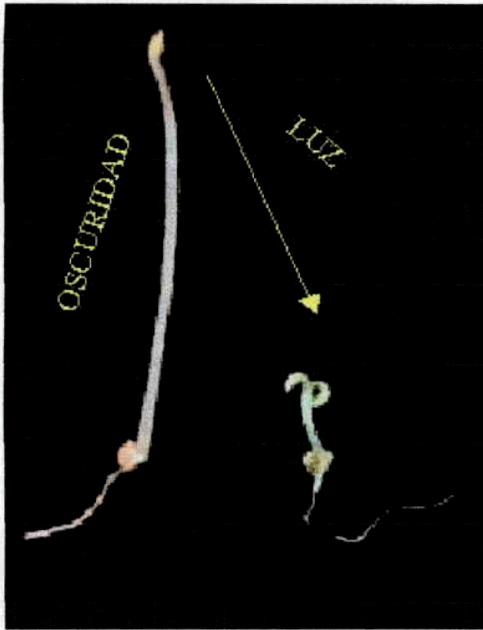


Figura 2: Fenotipo de una plántula de *Arabidopsis* crecida en oscuridad o en luz.

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 y las plantas ajustan el crecimiento y desarrollo a la competencia por la luz y otros recursos. La relación R/RL se correlaciona negativamente con plantas vecinas que pueden competir por la luz. Las plantas poseen dos estrategias opuestas en respuesta a la competencia por la luz: tolerancia al sombreado o respuestas de escape al sombreado (Morgan y Smith, 1976). Las plantas tolerantes al sombreado se caracterizan por conservar la energía y los recursos con bajas tasas de crecimiento y por el desarrollo de estructura fotosintéticas muy eficientes con bajos niveles de luz. La estrategia opuesta, es el “escape al sombreado”, en que las bajas relaciones R/RL como

consecuencia de la presencia de plantas vecinas produce un rápido aumento en la extensión del tallo permitiendo así proyectar las estructuras fotosintéticas hacia aquellas partes del ambiente en el que el recurso por la luz está disponible, se reduce el número de ramificaciones, y se acelera la floración, reduciendo la inversión de recursos en reservas y reproducción. Suele reducirse el número de semillas debido al desarrollo truncado de frutos (Ballaré, 1999, Smith y Whitelam, 1997). En varias especies estudiadas, como tabaco, mostaza y girasol, el incremento en la longitud del tallo está acompañada por una redistribución de fotoasimilados, produciéndose una mayor acumulación de materia seca en el mismo (Casal y Sánchez, 1992., Holmes y Smith, 1977, Kasperbauer, 1971, Mazzella, 1995) incluyendo hidratos de carbono (Casal *et al.*, 1995b, Mazzella, 1995). En algunas monocotiledóneas, las bajas relaciones R/RL reducen el macollaje (Casal *et al.*, 1995a)

1.1.2.4.Inducción floral

En muchas especies la floración representa una etapa crítica dada la particular sensibilidad de las plantas a los factores ambientales que provocan estrés durante esta etapa. Un factor ambiental que afecta el momento de la floración es la luz. Tanto la calidad como el fotoperíodo controlan el proceso de transición floral. En *Arabidopsis*, la luz azul y el RL promueven la floración mientras que el R parece tener un efecto inhibitorio del proceso floral (Simpson y Dean, 2002). La cantidad de luz también afecta a la floración, altas intensidades promueven la floración a través de su efecto en el aporte de carbohidratos (King y Bagnall, 1996). Cambios en la composición espectral de la luz también afectan la floración, bajas relaciones R/RL que ocurren a medida que un cultivo se hace más denso aceleran la floración (Halliday *et al.*, 1994). Por otro lado, muchas plantas responden a la duración del período diario de luz (fotoperíodo). En algunos casos la floración se acelera o sólo ocurre cuando el fotoperíodo es mayor a un determinado valor. Estas son las “las plantas de día largo” (PDL). En otros casos la floración es inducida por fotoperíodos inferiores a cierta cantidad de horas diarias. Estas son las “las plantas de día corto” (PDC). *Arabidopsis* es una especie que se comporta como una PDL facultativa es decir que la floración es acelerada por días largos en comparación a los días cortos. En algunos genotipos el fotoperíodo no tiene efectos marcados. Los días son más largos en verano y más cortos

en invierno, asumiendo valores intermedios en otoño y primavera. Las respuestas fotoperiódicas permiten el ajuste de la floración en determinada época del año. El control fotoperiódico de la floración se debe a las interacciones entre genes involucrados en el control de la iniciación floral, la regulación por medio de ritmos circadianos y las vías de transducción de señales mediadas por los fotorreceptores (Yanovsky y Kay, 2003) (Fig. 1).

1.2 PERCEPCIÓN DE LAS SEÑALES LUMÍNICAS

1.2.1 Diferentes fotorreceptores controlan la percepción de luz en plantas

La fotomorfogénesis se ve facilitada por una batería de pequeñas familias de fotorreceptores que son capaces de detectar diferentes longitudes de onda cooperando y complementándose en la percepción de las señales. Por el momento se conocen tres tipos: los fitocromos, que perciben luz en la región del espectro de luz roja (R) y luz roja lejana mediante un tetrapirrol de cadena lineal (Quail, 2002), y los criptocromos y fototropinas, que absorben luz azul a través de flavinas (Briggs, et al., 2001, Cashmore, et al., 1999).

1.2.2 Receptores de luz azul

En *Arabidopsis* se han descrito 2 criptocromos (*cry1* y *cry2*) y dos fototropinas (*phot1* y *phot2*). Los criptocromos presentan en su extremo amino cierta homología con las fotoliasas tipo I bacterianas y unen FAD (Flavín-adenin-dinucleótido) y MTHF (5,10-meteniltetrahidrofolato) como cromóforos, al igual que las fotoliasas, si bien carecen de dicha actividad (Cashmore, et al., 1999). A diferencia *cry1*, el fotorreceptor *cry2* es rápidamente degradado en condiciones de día corto y en respuesta a altas intensidades de luz azul (Ahmad *et al.*, 1998a). Mientras que *cry1* media la inhibición por luz azul de la elongación del hipocotilo (Ahmad y Cashmore, 1993), *cry2* ha sido implicado en el control del tiempo de floración (Guo *et al.*, 1998). Observaciones recientes han demostrado que la sobreexpresión del extremo carboxilo de *cry1* y de *cry2* inicia la fotomorfogénesis en ausencia de luz. Este dominio normalmente estaría inactivado por el dominio amino-terminal en la oscuridad, y sería liberado de esta represión vía una

reacción redox intra o intermolecular, iniciada por la acción de la luz azul sobre la flavina unida al extremo amino-terminal (Yang, 2000).

Cambios fisiológicos transitorios en respuesta a la luz azul que sirven para incrementar la eficiencia fotosintética tales como el fototropismo, el movimiento de los cloroplastos hacia la luz azul si es poca o fuera de la luz para evitar elevadas intensidades y la apertura de los estomas, son moduladas en *Arabidopsis* por una familia separada de fotorreceptores, las fototropinas phot 1 (Huala, 1997) y phot 2 (Jarillo *et al.*, 2001, Kagawa *et al.*, 2001). Estos fotorreceptores unen de manera no covalente FMN (flavina mononucleótida) como cromóforo a través de un tipo de dominio PAS (POR ARNT SIM) llamado LOV (Light Organ Voltage) y son kinasas de proteínas que fosforilan en serinas y que se autofosforilan en respuesta a la irradiación de luz azul (Christie *et al.*, 1998).

1.2.3 Los fitocromos

Estructura de los fitocromos

En *Arabidopsis* hay cinco fitocromos (phyA-phyE). Los fitocromos son cromoproteínas (moléculas que combinan una parte proteica o apoproteína y un cromóforo) dimericas solubles compuestas por dos polipéptidos de aproximadamente 125 Kda. La apoproteína de cada monómero se encuentra unida covalentemente a su cromóforo, un tetrapirrol de cadena abierta denominado fitocromobilina (Quail, 1991). La acción de los fitocromos requiere dos procesos a nivel de la molécula de fitocromo mismo: la percepción de la señal luminosa y la transducción en una señal bioquímica. En cada monómero se puede distinguir dos grandes dominios estructurales y funcionales. El dominio amino terminal, de aproximadamente 70 Kda, se encuentran los sitios necesarios para la unión del cromóforo y mantener la especificidad fotosensorial (Wagner *et al.*, 1996) (Fig. 3). El dominio carboxi-terminal, de aproximadamente 55 Kda se encuentran los sitios necesarios para la dimerización y la actividad regulatoria del fitocromo (Quail, 1997). Este último dominio contiene dos regiones con homología a los dominios PAS (Lagarias *et al.*, 1995), dominios encontrados originalmente en un gran número de proteínas regulatorias en moscas y mamíferos (Huang *et al.*, 1993). Se ha demostrado que en general 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 manifestada en el hecho de que mutantes de fitocromo afectados en estos dominios tienen defectos en sus propiedades espectrales y la capacidad de interactuar con componentes río abajo de la cadena transducción (Elich y Chory, 1997, Ni, 1998). Aunque el extremo carboxilo de todos los fitocromos se caracteriza por poseer un sub-dominio relacionado con histidinas kinasas, al menos phyA parece funcionar como una proteína serina kinasa (Yeh y Lagarias, 1998).

El cromóforo es la parte de la molécula que primero se modifica al recibir la luz de la longitud apropiada, la excitación del cromóforo altera a la apoproteína y, por ende, su capacidad de acción fisiológica. La apoproteína condiciona las características fotoquímicas del cromóforo.

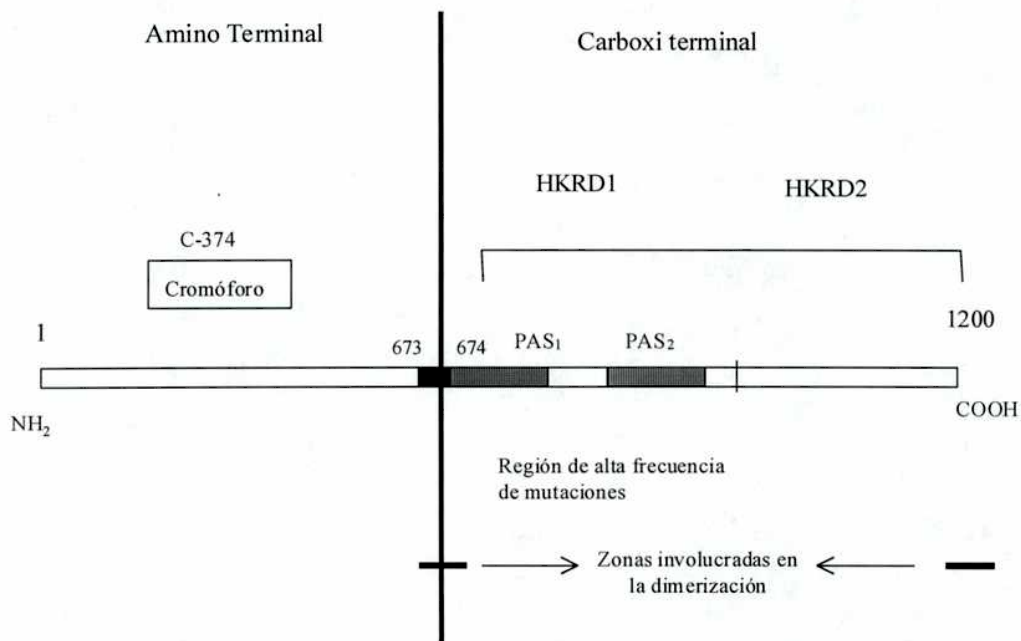


Figura 3. Estructura del fitocromo. En el dominio amino-terminal se encuentra la especificidad fotosensorial con el sitio de unión al cromóforo, mientras que el dominio carboxi-terminal se encuentran elementos utilizados en la actividad regulatoria. La región negra representa 'el puente' entre ambos dominios. En el extremo carboxi-terminal se encuentran los dominios con homología a histidinas kinasas (HKRD) y los dominios PAS.

1.2.3 1 Los fitocromos son una familia de fotorreceptores

Los fitocromos son una familia de fotorreceptores codificados por genes divergentes (Clack *et al.*, 1994). En *Arabidopsis* hay cinco fitocromos (phyA a phyE), siendo los más abundantes el phyA y el phyB. El análisis filogenético de las secuencias de los genes de los fitocromos en las plantas superiores sugieren que se habrían originado por eventos de duplicación. El primer evento duplicativo habría ocurrido durante el origen de las plantas con semillas dando origen *PHYA/C* por un lado y *PHYB/D/E* por otro. Eventos más tardíos de duplicación durante el origen de las plantas con flores separa el *PHYA* del *PHYC* y *PHYB/D* de *PHYE*. Más recientemente divergieron el *PHYB* y *PHYD*. El proceso evolutivo dio origen a una familia de proteínas que percibe señales del ambiente lumínico y en respuesta a esas señales cumplen diferentes funciones a lo largo del ciclo de vida de la planta (Smith, 2000).

También se encontraron genes de *PHY* en hongos (Hanelt *et al.*, 1992) musgos (Thummler *et al.*, 1992) algas (Lagarias, *et al.*, 1995) e incluso en bacterias (Davis *et al.*, 1999, Yeh *et al.*, 1997).

El phyA y 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 de phyA y phyB han permitido que sean los primeros fitocromos en ser clonados y secuenciados en *Arabidopsis*.

Propiedades fotobiológicas de los fitocromos

La función fotosensorial de los fitocromos está basada en su capacidad de interconversión reversible entre dos formas: el Pr, que tiene un máximo de absorción alrededor de los 660nm, luz roja (R) y es convertido por la luz roja lejana (RL) en Pfr, que tiene un máximo de absorción alrededor de los 730 nm, el Pfr es considerada la forma fotobiológicamente activa (Fig. 4).

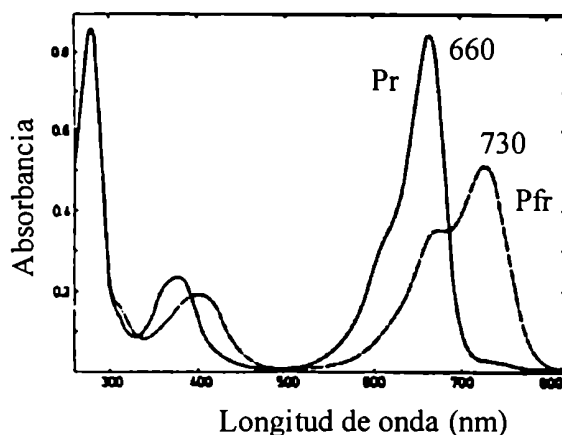


Figura 4: Espectro de absorción del fitocromo. La forma Pr tiene su pico de absorción en 660 nm y la forma Pfr tiene su pico de absorción en 730 nm.

Los fitocromos son sintetizados como Pr en una reacción autocatalítica que se produce al asociarse en el citoplasma la apoproteína con el cromóforo (Lagarias y Lagarias, 1989, Terry, 1997). En su forma Pr el fitocromo se localiza en el citoplasma, pero se gatilla la translocación al núcleo cuando se fotoconvierte a su forma Pfr (Nagy, 2001) y de esta manera se inician tres vías de señalización: activación directa de factores de transcripción, inactivación de represores nucleares y procesos citoplasmáticos (Casal, 2002a).

En las plántulas etioladas el 100% del fitocromo se encuentra en forma Pr. Al exponer plántulas etioladas a la luz, el Pr se fotoconvierte en Pfr. La fototransformación involucra la isomerización *cis-trans* de uno de los dobles enlaces del cromóforo. Esta isomerización provoca a su vez múltiples rearrreglos conformacionales de la proteína que conducen, luego de pasar por varios estados intermedios, a la formación del Pfr (Furuya y Song, 1994) (Fig. 5).

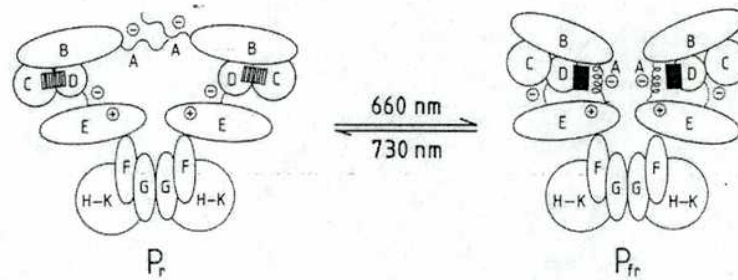


Figura 5: La conversión de Pr a Pfr produce cambios estructurales en el cromóforo que son traducidos en cambios conformacionales en la proteína. Adaptado de (Salisbury y Ross, 1994).

La fotoconversión es fotorreversible y por lo tanto, al absorber luz Pfr se convierte nuevamente en Pr (Fig. 6).

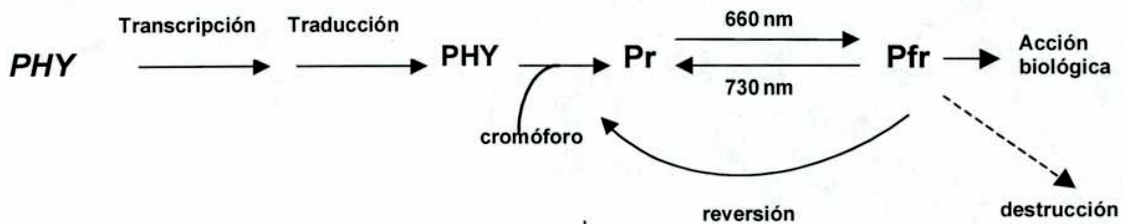


Figura 6: Diagrama de la fototransformación reversible del fitocromo. La expresión del gen *PHY* da lugar a la apoproteína PHY que al acoplarse autocatalíticamente con el cromóforo origina el Pr. La luz fotoconvierte el Pr a Pfr y viceversa. El Pfr también puede destruirse o convertirse en Pr mediante una reacción independiente de la luz (reversión).

Dado que los espectros de absorción de las dos formas están parcialmente solapados al irradiar una planta se establece un fotoequilibrio dinámico entre el Pr y el Pfr (Fig. 4). La proporción de Pfr respecto al fitocromo total (Pfr/P) establecida por cada tratamiento lumínico dependerá de la composición espectral del mismo (Mancinelli, 1994). Luz monocromática de 660 nm R convierte un 87% del fitocromo a la forma Pfr, mientras que luz monocromática de 730 nm RL establece un 3% de Pfr/P. Cuando se exponen las plántulas a radiación policromática, el Pfr/P estará determinado principalmente por la proporción de R y RL de la luz incidente (Mancinelli, 1994). Cuanto mayor sea la relación R/RL de luz incidente, mayor será el Pfr/P.

Los niveles de Pfr también son afectados por dos reacciones que no dependen de la luz: la destrucción y la reversión a Pr. La destrucción del Pfr ocurriría a través de la vía proteolítica mediada por ubiquitinas (Clough y Vierstra, 1997). Esta reacción no afecta en forma homogénea a todas las moléculas de fitocromo, siendo muy importante para la mayor parte del fitocromo predominante en plántulas etioladas. Por último, la reversión del Pfr a Pr es una reacción más rápida que la destrucción pero muy lenta comparada con la fotoconversión Pr a Pfr y por lo tanto, es cuantitativamente importante sólo en tratamiento que incluyen períodos de incubación en oscuridad o exposición a luz continua de muy bajos flujos (Vierstra, 1994).

Los fitocromos son estables en su forma fisiológicamente inactiva Pr, con una vida media de una semana, la estabilidad del Pfr varía para los distintos fitocromos. El phyA es inestable en la forma Pfr y su vida media es de 1 a 2 horas, de tal modo que la acción biológica compite con el proceso de destrucción. En ambientes ricos en RL, la destrucción del phyA no es tan marcada ya que la proporción que se encuentra como Pfr es baja. El proceso de destrucción implica la unión covalente de moléculas de ubiquitinas a las del fitocromo. Este conjugado de proteína y ubiquitina sirve como intermediario en la rotura de la proteína que se produce en un complejo proteolítico formado por múltiples subunidades. Los restantes fitocromos son significativamente más estables, porque la destrucción del Pfr es más lenta. Los fitocromos pueden mostrar reversión de Pfr a Pr mediante un proceso que no requiere luz (reversión en oscuridad). La reversión en oscuridad para el phyA ha sido observada *in vivo* aunque

no en *Arabidopsis* e *in vitro* para el phyA y el phyB. Es importante señalar que a diferencia de la destrucción que implica desaparición del fitocromo, la reversión en oscuridad no causa cambios en la cantidad total de fitocromo (Pr más Pfr) y, por lo tanto, no puede ser detectada cuantificando los fitocromos por métodos inmunológicos. Una tercera vía de control de los niveles de Pfr está regulada por la tasa de síntesis de Pr. Para el caso del phyA, la síntesis es inhibida (en grado variable) por Pfr. Este retrocontrol no es tan manifiesto para los otros fitocromos. Cuando una plántula se cultiva en oscuridad, el phyA es el más abundante (entre 10 y 100 veces más abundante que el resto). Cuando la plántula se expone a la luz, los niveles de phyA caen debido a su destrucción y a la inhibición de su síntesis. A pesar de esto, las plantas cultivadas bajo radiación natural poseen phyA en cantidades biológicamente activas (Casal, 2000a).

El fitocromo A

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 plantas etioladas, pero sus niveles disminuyen drásticamente luego de la exposición a la luz debido a su degradación proteolítica. Además la expresión de *PHYA* es negativamente regulado por la luz (Somers y Quail, 1995) y esto ocurre a nivel transcripcional (Lissemore y Quail, 1998).

Experimentos realizados con plantas mutantes que carecen de un fotorreceptor específico o plantas transgénicas con niveles reducidos o incrementados ha permitido asignar funciones específicas a los fotorreceptores. El mutante de *phyA* fue seleccionado por la falla en la inhibición del crecimiento del hipocotilo y apertura de los cotiledones en luz RL continua. El mutante de *phyA* en *Arabidopsis* (Dehesh *et al.*, 1993, Nagatani *et al.*, 1993b, 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 el RL y la oscuridad pero responden normalmente a la luz blanca (Parks y Quail, 1993, Whitelam, *et al.*, 1993). En condiciones de radiación natural bajo canopeos densos, ricos en RL, el phyA es crucial

para producir la des-etiolación y los 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* (Casal, 1996, Yanovsky, *et al.*, 1995). El *phyA* participa en la sincronización del reloj endógeno (Yanovsky *et al.*, 2000a). Además, el *phyA* promueve la iniciación floral, ya que el mutante de *phyA* florece más tarde que el genotipo WT en respuesta a extensiones del fotoperíodo (Johnson *et al.*, 1994).

La sobreexpresión de *PHYA* causa hipersensibilidad tanto en tratamientos con RL continuo como con luz blanca (Boylan y Quail, 1991, Cherry *et al.*, 1991, Nagatani *et al.*, 1993a). Se considera que el *phyA* no participa de la percepción del R continuo ya que los niveles de *phyA* en plantas des-etioladas están fuertemente reducidos. Sin embargo, aún los bajos niveles de *phyA* presentes en plantas 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 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.

En cuanto a la señalización del *phyA* este fotorreceptor participa en dos tipos de respuestas diferentes. Por un lado actúa en el VLFR (del inglés *Very Low Fluence Response*) que se activa a muy bajos flujos de luz y se satura con niveles muy bajos de Pfr. Exposiciones a pulsos de RL o incluso a luz verde son suficientes para saturar este tipo de respuestas (Botto, *et al.*, 1996, Casal *et al.*, 1994, Shinomura *et al.*, 1996b). 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 RL comparativamente altas y por un tiempo prolongado y en las que no se cumple la ley de reciprocidad cuando la luz continua se compara con pulsos horarios de RL. Esta ley 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 de tipo HIR, la exposición al RL continuo es más eficiente que los pulso horarios de RL en la que se mantiene el flujo total. En otras palabras, en las respuestas HIR el grado de respuesta no depende sólo de la cantidad de fotones recibidos sino también de la forma en que los fotones son distribuidos en el tiempo. La evidencia contundente que el phyA media tanto las respuestas de tipo VLFR como HIR se sustenta en el hecho que mutantes de *phyA* fallan en ambos tipos de respuestas (Botto, et al., 1996, Casal, et al., 1994, Nagatani, et al., 1993a, Shinomura *et al.*, 1996a). Existen evidencias genéticas (Yanovsky *et al.*, 1997, Yanovsky *et al.*, 2000b) y moleculares (Cerdán *et al.*, 2000) que muestran que el VLFR y el HIR serían parte de dos vías de señalización diferentes del phyA. Existen dominios específicos en la molécula de phyA que afectan selectivamente el VLFR y el HIR. Por ejemplo, el mutante *phyA302-1* y el *phyA302-2* germinan bajo RL continuo pero muestran des-etiolación incompleta bajo las mismas condiciones lumínicas. Estos mutantes presentan una sustitución aminoacídica de una Glu por una Lys en la posición 777 del dominio PAS2 del extremo carboxi-terminal de la molécula del phyA. El mutante presenta una respuesta normal en la inhibición del crecimiento del hipocotilo y apertura de los cotiledones en la vía del VLFR pero falla en las respuestas vía HIR (Yanovsky *et al.*, 2002). De este modo el *phyA302* separa el VLFR y el HIR a nivel de la molécula del fotorreceptor. Las diferencias que involucran el VLFR y el HIR se extienden a la región del extremo amino-terminal del phyA. Plantas transgénicas que sobreexpresan phyA de avena en *Arabidopsis* muestran hiperactividad si la región rica en serinas entre las posiciones 6 y 12 está deletionada. La hiperactividad depende del contexto del desarrollo pero siempre está limitada al VLFR. Contrariamente, el HIR está regulado negativamente por la misma delección (Casal, 2002b).

El VLFR y el HIR no sólo pueden ser separados a nivel del receptor del phyA sino también en otros componentes de la cascada de señalización. El análisis de delecciones y sustituciones del promotor de un gen fotosintético *Lhcb1*2* fusionado a gen reportero permitió identificar regiones que se requieren para la señalización del phyA vía el HIR pero no para la vía del VLFR o para la señalización del phyB (Cerdán, et al., 2000).

Otras regiones del promotor son necesarias tanto para el VLFR, el HIR y para las respuestas mediadas por el phyB.

Consistentemente con su función, el transporte del phyA al núcleo se produce con pulsos horarios de RL (translocación mediada por el VLFR) o RL continuo (translocación mediada por el HIR) (Kim *et al.*, 2000).

El 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). Las diferencias más importantes entre el phyA y el phyB residen 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).

Los espectros de acción de ambos fitocromos son distintos, el phyB es el principal fotorreceptor involucrado en la percepción de R continuo. El mutante de *phyB* de *Arabidopsis* (Nagatani *et al.*, 1991, Reed *et al.*, 1993, Somers *et al.*, 1991) y de pepino (López Juez *et al.*, 1992) presenta un fenotipo caracterizado por hipocotilos alargado cuando crecen en R o luz blanca. Contrariamente, la sobreexpresión del phyB en *Arabidopsis* causa hipocotilos cortos (McCormac *et al.*, 1993, Wagner *et al.*, 1991).

El phyB funciona en la percepción de las típicas respuestas inducidas por R y reversibles por RL. Esta respuesta es llamada LFR (del inglés *Low Fluence Response*), ya que los niveles de Pfr/P que lo inducen se obtienen con pulsos de flujos moderados de R (Mancinelli, 1994). El grado de respuesta muestra una muy buena correlación con los niveles de Pfr/P establecidos por los tratamientos lumínicos. En la germinación de las 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 intermedios de Pfr, el porcentaje de germinación tiene una relación directa con el nivel de Pfr establecido. Otra característica es que las respuestas LFR cumplen la ley de

reciprocidad, es decir, se obtiene el mismo grado de respuesta con tratamientos de luz continua o pulsos horarios con igual cantidad de fotones. El mutante *phyB* presenta deficiencias en la germinación y la des-etiolación en respuestas al R en el rango del LFR pero responde normalmente al RL continuo (HIR) o pulsos horarios de RL (VLFR) (Botto *et al.*, 1995, Reed, et al., 1993, Shinomura *et al.*, 1994). 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 (Ballaré *et al.*, 1991, Robson *et al.*, 1993, Whitelam y Smith, 1991). El mutante *phyB* florece más tempranamente que el WT tanto en días cortos como en días largos, relevando un rol inhibitor del *phyB* sobre la iniciación floral (Goto *et al.*, 1991, Reed, et al., 1993).

Consistentemente con su función, el *phyB* migra al núcleo luego de ser expuesto a R y esta migración puede ser inhibida por RL (translocación mediada por la respuesta del tipo LFR) (Kircher, 1999). El dominio amino-terminal aislado de *phyB* cuando se dimeriza se localiza en el núcleo y gatilla una respuesta mayor que la molécula completa de *phyB*. Esto indica que el dominio carboxi-terminal del *phyB* no estaría involucrado directamente en la señalización y además sugiere que el carboxi-terminal atenúa la actividad del *phyB* (Tomato *et al.*, 2003).

Interacciones entre el phyA y el phyB

El *phyA* puede interactuar positivamente o negativamente con el *phyB* y esto depende de la vía de señalización en la que actúe el *phyA*. En plántulas etioladas, cuando el *phyA* es activado con RL continuo, es decir vía el HIR, produce la amplificación de la respuesta a un pulso mediado por el Pfr del *phyB* (Casal, 1995, Casal y Boccalandro, 1995). Es decir que el HIR del *phyA* y el LFR del *phyB* interactúan sinérgicamente.

El *phyA* tiene un efecto dual bajo R continuo: por un lado inhibe el crecimiento del hipocotilo vía el VLFR y por otro lado reduce la respuesta del LFR mediada por el *phyB*. Este efecto negativo del *phyA* sobre el LFR del *phyB* fue observado tanto en R continuo como en pulsos horarios de R (Mazzella *et al.*, 1997). Esta interacción es

interpretada como una conexión entre el VLFR del phyA y el LFR del phyB. El efecto antagónico entre el phyA y el phyB ha sido descrito para la regulación de la expresión del gen *Lhcb1*2* (Cerdán, et al., 2000).

Los fitocromos C/D/E

Experimentos realizados con mutantes de *phyD* y *phyE* y *phyC* muestran que estos fotorreceptores tienen funciones sensoriales parecidas al phyB (Aukerman *et al.*, 1997, Devlin *et al.*, 1998, Devlin *et al.*, 1999, Monte *et al.*, 2003). 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 de estos fotorreceptores. La creación de triples y cuádruples mutantes deficientes en múltiples fotorreceptores ha puesto en evidencia la función redundante entre el phyB/D y E en el control de múltiples respuestas fisiológicas en *Arabidopsis*, como en el control de la floración, desarrollo de las hojas y en las respuestas a la relación R/RL mientras que el phyA/B/C/D y E actúan redundantemente en la modulación del desarrollo de los cotiledones y en R continuo (Franklin *et al.*, 2003). Estudios recientes con dobles mutantes entre *phyB phyC* muestran que las plántulas no presentan una disminución en la sensibilidad en la desetiación en las respuestas en R continuo comparando con el mutante simple de *phyB*. El phyC participa en la percepción de la duración del día, dado que el mutante de *phyC* florece temprano en fotoperíodos de día corto. En fotoperíodos de día largo el doble mutante *phyA phyC* las plantas florecen más tardíamente que el mutante simple de *phyA*, sugiriendo que el phyC promueve la floración en ausencia del phyA. Estos resultados sugieren que el phyC estaría involucrado en la fotomorfogénesis a lo largo del ciclo de vida de la planta, con una función fotosensorial similar al phyB/D y E pero con un patrón de señalización con respuestas cruzadas entre el phyA y phyB en el proceso de la fotorregulación de los múltiples procesos del desarrollo (Monte, et al., 2003).

1.3. CAMINOS DE SEÑALIZACIÓN Y COMPONENTES DE LA CADENA DE TRANSDUCCIÓN DE LOS FITOCROMOS

La posibilidad que los fitocromos fueran enzimas cuya actividad estuviera regulada por la luz fue planteada hace casi 40 años (Butler *et al.*, 1959). Durante los años 80 los datos bioquímicos han sugerido que el fitocromo de avena podría ser una proteína kinasa regulada por la luz. Dos líneas de investigación tuvieron un rol importante para descubrir la actividad kinasa de los fitocromos: por un lado la producción de fitocromo recombinante purificado biológicamente activo y por otro lado el descubrimiento de fitocromos en bacterias. El hecho de que los procariontes tengan fitocromo tuvo dos consecuencias muy importantes. Por un lado sugiere un proceso histórico evolutivo ya que sólo se pensaba que las plantas poseían fitocromos. Por otro lado potencian la hipótesis concerniente a la actividad kinasa potencial asociada a los fitocromos en las plantas. La fosforilación podría ser el primer mecanismo bioquímico por el cual la información proveniente de la luz comienza la vía de la transducción de las señales lumínicas pero esto aún no se ha demostrado (Fankhauser, 2000).

En 1992, Schneider-Poetsch reconocieron que el extremo carboxi-terminal del fitocromo de las plantas mostraba una similitud modesta pero significativa con la histidina kinasa bacteriana, sin embargo residuos críticos necesarios para la actividad kinasa de las bacterias no se conservan en los fitocromos de las plantas (Schneider-Poetsch, 1992). Los fitocromos de las plantas catalizan reacciones de fosforilación a través de los dominios carboxi-terminales. La estructura de este dominio evolucionó como resultado de un evento duplicativo 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. Se ha demostrado que el phyA de avena tiene actividad de kinasa de serinas y treoninas (Yeh y Lagarias, 1998). El phyA de avena es capaz de autofosforilarse y de fosforilar otras proteínas, siendo esta fosforilación dependiente de la luz. Sin embargo aún no hay evidencias de que la actividad kinasa esté vinculada a la actividad biológica de este fotorreceptor.

Mutaciones en los residuos de actividad histidina kinasa no afectaban la actividad de fitocromos mutantes de bacterias cuando eran expresados en plantas.

Ensayos sobre la actividad kinasa *in vitro* han identificado otros sustratos además del fitocromo, siendo de particular interés el cry1 y cry2, los cuales interactúan con el phyA *in vitro* y serían sustratos para la actividad de proteína kinasa del phyA. La fosforilación del cry1 es estimulada por luz R *in vivo* (Ahmad *et al.*, 1998b). Estos resultados sugieren además interacciones entre el fitocromo y los receptores de luz azul (Casal, 2000b, Mohr, 1986). La proteína PKS1 (del inglés *phytocrome kinase substrate* 1), como los criptocromos interactúan con el carboxi-terminal del fitocromo (Fankhauser *et al.*, 1999). La fosforilación del PKS1, al igual que la autofosforilación del phyA es regulada por la luz *in vitro*. Sin embargo, la fosforilación del PKS1 *in vivo* es estimulada por la luz R, lo que sugiere la participación del fitocromo como proteína kinasa (Fankhauser, *et al.*, 1999). El PKS1, se ha encontrado únicamente en el citoplasma e interactúa con el extremo carboxi-terminal del phyA y phyB. PKS1 y su homólogo más próximo el PKS2 actuarían como reguladores positivos de las funciones del phyA en la vía del VLFR (Lariguet *et al.*, 2003). Otra proteína fosforilada por el fitocromo es la NDPK2 (del inglés, *nucleoside diphosphate kinase* 2), que se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo e interactúa con el extremo carboxi-terminal del phyA (Choi, 1999). La luz R estimula la fosforilación de la NDPK2 *in vivo* cuando interactúa con el Pfr del phyA, sugiriendo que esta proteína sería también sustrato de fosforilación de la actividad kinasa del fitocromo. Los mutantes *ndpk2* fallan en el R y RL sugiriendo tanto la interacción del phyA como del phyB. Los sustratos de la actividad kinasa de fosforilación del fitocromo como el cry1, cry2 y PKS1 y NDPK2 han sido encontrados a través de la utilización del sistema del doble híbrido. Además de estas proteínas que interactúan con el fitocromo, utilizando la misma aproximación del sistema del doble híbrido, se ha demostrado la asociación del phyB y el phyA con el factor de transcripción PIF3 (del inglés, *phytocrome interactive factor* 3) (Ni *et al.*, 1999, Ni, 1998). La asociación del PIF3 al phyB se induce luego de exposiciones a luz R y este efecto puede revertirse con RL (Ni, *et al.*, 1999).

A través de las aproximaciones fisiológicas y farmacológicas se ha podido identificar la participación de la proteína G heterotrimérica, del cGMP y Calcio (Bowler *et al.*, 1994) como componentes tempranos de la señalización de los fitocromos. La proteína kinasa CK2 (Casein Kinase II) está involucrada en la expresión de genes regulados por la luz porque fosforila factores de transcripción que se unen a las regiones promotoras de esos genes. Plantas transformadas con el anti-sentido del gen de la subunidad alfa de CK2 poseen hojas pequeñas y aumentan la expresión del gen de la *CHS* (del inglés, chalcone synthase) en oscuridad y de *CAB* (del inglés, chlorophyll a/b binding protein) y *RBCS* (del inglés, small subunit of ribulose-1,5 bisphosphate protein) bajo tratamientos de luz roja. La CK2 actuaría entonces como un regulador negativo en la señalización del fitocromo (Lee *et al.*, 1999). Estudios recientes con el uso de simple y dobles mutantes nulos de genes de *GPA1* (del inglés, alpha subunit of heterotrimeric G protein) y *AGB1* (del inglés, a single beta subunit of heterotrimeric G protein) han permitido reevaluar el rol de esta proteína en la transducción de señales del fitocromo sin que se evidencien cambios en la sensibilidad al R y RL entre mutantes y plantas normales (Jones *et al.*, 2003). Por lo tanto estos estudios contradicen la idea que esta proteína estaría involucrada en el control de la señalización de los fitocromos al menos no directamente (Bowler, et al., 1994, Neuhaus *et al.*, 1993)

Por otro lado, la aproximación genética consistente en la búsqueda de mutantes que presentan alteraciones en las respuestas a la luz, constituye otra vía para comprender los componentes de la transducción de las señales lumínicas. Se han caracterizado en *Arabidopsis* mutantes que tienen alteradas las respuestas a luz pero que no son mutantes alélicos de los fotorreceptores y que pueden dividirse en tres categorías. La primera categoría comprende aquellos mutantes que tienen respuestas fotomorfogénicas constitutivas como *cop / det / fus* que crecen en oscuridad como si estuvieran estimuladas por luz (Chory, et al., 1989, McNellis y Deng, 1995, Wei y Deng, 1992). El fenotipo de estos mutantes indica que las proteínas normales COP / DET / FUS actúan como reguladores negativos de las señales de transcripción. El segundo grupo tiene reducida la sensibilidad a la luz y el último grupo presenta respuestas exageradas a la luz (Quail, 1998). De los mutantes con sensibilidad reducida a la luz algunos como el *hy5* afecta simultáneamente las respuestas a varias longitudes de onda (Koornneef *et al.*, 1980)

pef1 tiene reducidas las respuestas tanto al R como al RL indicando que algunos de los componentes de las vías de transducción de señales del phyA y del phyB son comunes y otros específicos (Ahmad y Cashmere, 1996). Otros mutantes, sin embargo, sólo afectan las respuestas a longitudes de onda específicas. Por ejemplo, los mutantes *red1*, *pef2* y *pef3* presentan disminuidas las respuestas al R en el rango del LFR, pero no las respuestas al RL (Quail, 1998). Los mutantes *fhy1* y *fhy3* afectan las respuestas mediadas por el phyA al RL continuo (Whitelam, et al., 1993), *far1* (Hudson et al., 1999) *pat1* (Bolle et al., 2000), *laf1* (Ballesteros et al., 2001), *laf6* (Møller et al., 2001), *hfr1* (Fairchild, 2000) (Soh, 2000), *fin219* (Hsieh et al., 2000). Las proteínas normales de estos genes actúan como reguladores positivos en las respuestas bajo RL continuo. Los mutantes *spa1* (Hoecker et al., 1998) y *eid1* (Dieterle et al.; 2001) afectan también las respuestas en RL continuo, pero a diferencia de los otros mutantes mencionados, el *SPA1* y *EID1* son reguladores negativos de las respuestas HIR.

1.3.1 Regulación de la sensibilidad a la luz

Las señales lumínicas percibidas por los fitocromos afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas durante todo el ciclo de vida. Una de las características distintivas de las respuestas a la luz está dada por los cambios en la sensibilidad a la luz que se producen en distintos contextos del desarrollo. Por ejemplo cuando un suelo agrícola es arado, muchas de las semillas enterradas son expuestas brevemente a la luz. Esta exposición puede durar fracciones de segundos hasta que la semilla es nuevamente enterrada pero es suficiente para que en muchas semillas se induzca la germinación (Scopel, et al., 1991). En nuestro laboratorio se ha demostrado que estas respuestas están mediadas por el phyA en la vía VLFR (Botto, et al., 1996). A medida que las plantas crecen dentro de un cultivo, comienzan a percibir señales que indican la presencia de plantas vecinas (Ballaré et al., 1987). La proporción de RL aumenta debido a que la luz es reflejada selectivamente por las hojas verdes y la relación R/RL cae. Como consecuencia, el alargamiento de los tallos es promovido, la producción de ramificaciones es reducida (Casal et al., 1986.) y las plantas aumentan la capacidad de competir por la luz. Si las plantas retuvieran la altísima sensibilidad a la luz que muestran las semillas no serían capaces de percibir la diferencia en la relación R/RL

causada por plantas vecinas, pues la señalización estaría saturada. Sin embargo, gracias a una serie de mecanismos las respuestas de tipo VLFR no se mantienen altas y esto permite que las plantas perciban a las vecinas (Casal *et al.*, 1997).

La versatilidad en las respuestas mediadas por el phyA pone de manifiesto la existencia de mecanismos finos de regulación que les permiten a las plantas responder en forma precisa a las señales del ambiente lumínico y en virtud de esa información ajustar el crecimiento y desarrollo ignorando cambios del ambiente lumínico que no constituyen verdaderas señales. Se han identificado varios puntos de regulación en la señalización del phyA (Casal, 2002b, Cerdán, et al., 2000, Yanovsky, et al., 1997, Yanovsky, et al., 2000b, Yanovsky, et al., 2002). Estos componentes permiten un ajuste fino de las respuestas a la luz.

1.4 Estrategia Experimental

El objetivo de esta tesis es identificar y caracterizar mutantes que afecten diferencialmente las respuestas mediadas por el phyA. Los experimentos se realizaron en *Arabidopsis thaliana*, perteneciente a la familia de las crucíferas, que es utilizada como sistema de referencia dadas las características propias de esta planta (pequeño tamaño, tiempo de generación rápido, disponibilidad de amplias colecciones de mutantes y herramientas genéticas, genoma completamente secuenciado, fácilmente transformable, etc.) (Meinke *et al.*, 1998).

La mayor parte de los mutantes selectivamente involucrados en la señalización del phyA han sido identificados bajo búsquedas con RL continuo donde el phyA actúa vía el HIR. Dicho procedimiento puede estar excluyendo la identificación de loci específicamente involucrados en la vía del VLFR. Por esta razón se llevaron a cabo búsquedas bajo pulsos horarios de RL, una condición donde phyA puede señalar vía el camino de las respuestas VLFR pero no en las respuestas de HIR.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Fuentes de luz

Como se mencionara en la introducción la función fotosensorial del fitocromo está basada en su capacidad de interconversión reversible entre dos formas Pr y Pfr. Dado que los espectros de absorción de las mismas están parcialmente solapadas la irradiación establece un fotoequilibrio dinámico entre el Pr y el Pfr de modo tal que la proporción Pfr/P de la forma activa de fitocromo (Pfr) respecto al fitocromo total (P) dependerá de la composición espectral que se establece en cada tratamiento (Mancinelli, 1994)). Para estudiar el comportamiento de cada mutante se utilizaron las siguientes fuentes de luz.

- Pfr/P = 87 %: provista por tubos fluorescentes rojos de 40 W (Philips 40/15).
- Pfr/P = 3% : provista por una lámpara incandescente de 250 W (Osram Siccatherm, Argentina) en combinación con un filtro RG9 (Schott, Mainz, W. Germany).
- Pfr/P= 10 y 20% : provista por una lámpara incandescente de 150 W (Philips R95) en combinación con dos filtros de acetato rojo y seis (10 %) o dos (20 %) filtros de acrílico azul (Paolini 2031, La Casa del Acetato, Buenos Aires, Argentina).
- Pfr/P= 33 y 61 % se establecieron con una lámpara incandescente de 150 W (Philips R95) en combinación con dos filtros de acetato rojo y uno verde (33 %) y con dos acetatos rojos (61 %).

Los espectros de estos campos de luz fueron publicados por (Casal *et al.*, 1991). La fuente que establece un Pfr/P= 87% es referida en los capítulos siguientes como R. Para irradiancias con RL se utilizó la fuente de Pfr/P= 10%, salvo en los experimentos de bloque de síntesis de clorofila descritos más abajo, que requieren RL puro y fueron realizados con la fuente de Pfr/P= 3 %

2.2 Material Vegetal

Se utilizaron semillas del genotipo salvaje (WT) de *Araridopsis thaliana* (L) Heynh. ecotipos: Landsberg *erecta*, Columbia y RLD, dependiendo del ecotipo del mutante analizado. Se incluyeron los mutantes nulos *phyA-201*, (Nagatani *et al.*, 1993) o *phyA-211* (Reed *et al.*, 1994) en fondo genético Landsberg *erecta* y Colombia respectivamente, *phyB-5*, (Reed, *et al.*, 1994) en fondo genético Landsberg *erecta* para la generación de dobles mutantes entre los fotorreceptores y los mutantes de cadena de transducción. Las semillas del mutante *spa1-3* (supresor of *phyA-105* en el ecotipo RLD fueron proporcionadas por la Dra. Ute Hoecker y el Dr. Peter Quail (Departament of Plant and Microbial Biology, Universidad de California, Berkeley). Las semillas de los mutantes *compacta 3* (*cp3*) y los distintos alelos del mutante *gigantea* (*gi*) se obtuvieron del Centro de Recursos Biológicos de Arabidopsis (ABRC) Universidad de Ohio. Las semillas de las plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *GI* bajo el control del promotor constitutivo 35S en el fondo genético del mutante *gi-11* fueron provistas por la Dra. Jo Putterill, School of Biological Sciences, University of Auckland, New Zealand.

2.3 Caracterización fisiológica de los mutantes

2.3.1 Experimentos para estudiar el fotocontrol del crecimiento del hipocotilo y apertura de los cotiledones

Las semillas se esterilizaron en una solución de HCL y lavandina comercial al 1% durante 2 horas y media. Luego se secaron sobre papel de filtro. En algunos casos para favorecer la germinación, las semillas se escarificaron con papel de lija N° 600 durante 30 segundos. Se sembraron aproximadamente 20 semillas en cajas de plástico transparente (40 X 33 mm² x 15mm de altura) conteniendo 0.8% agar agua. Las cajas con las semillas se incubaron en oscuridad a 4°C durante 4 días (envueltas en plásticos negros), se expusieron a un pulso de R de 30 minutos para inducir la germinación y luego se incubaron en oscuridad por 24 horas a 25 °C. Durante 3 días seguidos las plántulas se expusieron a pulsos horarios de R, pulsos de RL o mezclas de R y RL (3 minutos, 15-40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, estos flujos saturan la respuesta a los pulsos) que proveen una serie de valores de Pfr/P

calculados, RL continuo (Pfr/P= 10%, valores de flujo entre 0.1 y 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Las plántulas control permanecieron en oscuridad. En algunos experimentos de pulsos de RL y de RL continuo fueron comparados a igual valor de flujo total (36 $\text{mmol m}^{-2} \text{h}^{-1}$).

El largo del hipocotilo de las 10 plántulas más altas de cada caja (siendo cada caja una repetición) se midió con regla de precisión de 0.5 mm y los valores de cada caja fueron promediados, las plántulas restantes no fueron incluidas para reducir el error debido a semillas que germinan tarde (Casal *et al.*, 1995). El ángulo entre los cotiledones se midió con transportador y los 10 datos obtenidos fueron promediados (constituyendo una repetición) previamente a realizar el análisis estadístico.

2.3.2 Selección de nuevos mutantes

Se realizó una búsqueda de mutantes que afecten diferencialmente las vías de señalización del phyA (VLFR y HIR). La búsqueda de mutantes se llevó a cabo en *Arabidopsis thaliana*, bajo pulsos horarios RL, una condición donde phyA media las respuestas VLFR pero no bajo el camino de las respuestas HIR.

En la selección de nuevos mutantes se utilizó semilla mutagenizada del ecotipo Columbia provista por Lehle Seeds (Round Rock, TX, Estados Unidos). Las semillas fueron incubadas en cajas (22,5 x 29 cm^2) conteniendo 0.8 % de agar agua. Las mismas fueron envueltas en plásticos negros para evitar que penetre la luz, e incubadas a 4°C durante 7 días para reducir la dormición. Luego del período a baja temperatura las semillas fueron expuestas a un pulso de R durante 30 minutos a 25 °C, para inducir la germinación, seguido de 24 horas de oscuridad a la misma temperatura, antes de transferir las plántulas derivadas de esas siembras al tratamiento lumínico. Para la selección de los mutantes se utilizaron pulsos de RL de 3 minutos durante 3 días. Se seleccionaron las plántulas que mostraran una respuesta exagerada en la inhibición del crecimiento del hipocotilo y en la apertura de los cotiledones. Las plántulas seleccionadas fueron identificadas con marcas en la caja utilizadas para selección donde permanecieron durante otros 3 días bajo luz blanca para permitir su desarrollo antes de ser transplantadas a tierra en macetas.

2.3.3 Experimentos para estudiar el fotocontrol de la germinación

Para los experimentos de germinación se utilizaron semillas provenientes de plantas cultivadas bajo tubos fluorescentes ($100 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a 25°C y mantenidas en oscuridad a 4°C (al menos por un mes). Se sembraron 25 semillas en cajas de plástico transparente ($40 \times 33 \text{ mm}^2$) sobre 0.8 % agar agua. Las semillas fueron incubadas a 4°C durante 5 días seguido de un pulso de 5 minutos de RL o R que establecía distintos niveles de Pfr/P y luego mantenidas en oscuridad por 3 días a 25°C , para finalmente contar el número de semillas germinadas (Botto *et al.* 1995; 1996).

2.3.4 Experimentos para estudiar el bloque de la síntesis de contenido de clorofila por RL

La característica distintiva de las respuestas de tipo HIR es que el efecto del RL continuo no puede ser reemplazado por pulsos horarios de RL, aún cuando ambos tratamientos provean igual cantidad total de fotones. Las plántulas WT de *Arabidopsis* se desetiolan cuando crecen bajo RL continuo, sin embargo en esas condiciones se bloquea la síntesis de clorofila aún cuando las plántulas luego sean transferidas a luz blanca continua debido a un desarrollo anormal de los plástidos producto del RL. El desarrollo normal del cloroplasto depende del phyA y de otras reacciones que requieren luz R que no están mediadas por el phyA. El RL desencadena la señalización del phyA pero falta la luz R para la síntesis de clorofila (Barnes *et al.*, 1996).

Se utilizaron aproximadamente 20 semillas de cada genotipo sembradas sobre 0.8 % agar agua. Luego de 24 horas de recibir el pulso de R para inducir la germinación las cajas con las semillas se transfirieron a pulsos de RL de 3 minutos por hora (Pfr/P= 3 % $40 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.) o RL continuo (Pfr/P= 3 % $2 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) o fueron mantenidas en oscuridad. Tres días después de recibir los tratamientos las plántulas se transfirieron a luz blanca continua ($100 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) durante dos días. La clorofila se determinó luego de la extracción de la misma con N N' dimetilformamida. Se midió la absorbancia a 647 y 664 nm (Moran, 1982).

2.3.5 Experimentos para estudiar los efectos sobre el contenido de antocianinas

Para investigar los niveles de antocianinas. Se prepararon cajas con 200 semillas sobre 0.8% de agar agua. Las plántulas se expusieron a pulsos de 3 minutos por hora de RL ($Pfr/P= 10 \% 36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o RL continuo ($Rfr/P= 10\% 1,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o se mantuvieron en oscuridad. Las antocianinas se extrajeron en 1 ml al 1% (m/v) de metanol HCL. Se midió la absorbancia a 530nm y se corrigió la absorción de la clorofila en (657 nm) según (Mancinelli *et al.*, 1991).

2.3.6 Análisis del ritmo de sensibilidad a la luz

El reloj circadiano en *Arabidopsis* es sincronizado no sólo por las transiciones luz/oscuridad sino también por la imbibición de las semillas (Zhong *et al.*, 1998).

Para estudiar el ritmo de sensibilidad a la luz se embebieron las semillas del mutante *gi-5* y el WT a las 19:00 de modo que la imbibición coincida con el atardecer (Zhong, et al., 1998). Las semillas se transfirieron a 4 °C durante 4 días y se expusieron a a R desde las 8:00 hasta las 19:00 para que las señales lumínicas que sincronizan el reloj circadiano coincidan con las de la imbibición. Luego se transfirieron a oscuridad durante 24 horas para permitir la germinación. Las plántulas etioladas fueron expuestas a un solo ciclo de 5 pulsos de RL provistos uno por hora sin solución de continuidad. Se midió la distancia entre los cotiledones a las 48 horas de haber recibido el tratamiento lumínico. La elección de este tiempo de medición se basó en experimentos preliminares de cinética detallada. La respuesta a los pulsos de RL aumentaba linealmente hasta que alcanzó el máximo a las 48 horas después de haber recibido el tratamiento lumínico. La medición se realizó bajo lupa y con regla milimetrada (a 400X 1mm contiene 40 divisiones).

2.4 Análisis estadístico

Se promediaron los valores obtenidos para cada caja (una réplica). Salvo en algunas excepciones específicamente indicadas en las figuras, en cada experimento se utilizaron entre 3 y 4 réplicas por tratamiento y dado que a su vez cada experimento fue repetido al menos en tres ocasiones los datos son promedio de al menos 9 réplicas (90 plántulas en el caso de los hipocotilos y ángulo entre los cotiledones) Las comparaciones entre los distintos tratamientos fueron realizadas por medio de la técnica ANVA, utilizando el programa GRAPHPAD/PRISM.

2.5 Caracterización genética y molecular de los mutantes

2.5.1 Obtención de dobles mutantes.

Los dobles mutantes *phy-201 cp3*, y *phyA-211 eve2* fueron obtenidos a partir de cruzas entre los mutantes nulos de *phyA* y los mutantes simples de *cp3*, y *eve2* y posterior selección de las plántulas en la generación F₂ que mostraron hipocotilos largos y cotiledones cerrados en RL continuo (mutante de *phyA*). Las plántulas con ese fenotipo fueron transplantadas a tierra y cultivadas bajo luz blanca. Los dobles mutantes *phyA cp3* y *phyA eve2* se seleccionaron por las características de las plantas adultas que presentaban el fenotipo *cp3* o *eve2*

Para la obtención de los dobles mutantes *phyB cp3* se cruzaron los mutantes simples y se seleccionaron las plántulas de la F₂ que presentaban hipocotilos alargados y cotiledones semi abiertos en R continuo (mutante de *phyB*), el doble mutante *phyB cp3* se seleccionó por las características morfológicas que presentaba el doble mutante en el estado adulto.

2.5.2 Mapeo

Para realizar el mapeo de la mutacion *eve2* se utilizó la técnica de mapeo por marcadores moleculares SSLP (del inglés, Stands for Simple Sequence Length Polymorphisms) y CAPs (del inglés, Co-dominant Cleaves Amplified Polymorphism

Sequence). Esta técnica permite identificar genes en función del fenotipo del mutante que estén físicamente ligados en una región conocida del genoma. Como primer paso debe generarse una población de mapeo F₂ descendiente entre el cruzamiento con un parental en fondo genético diferente del que se encuentre la mutación. Para generar la población de mapeo se utilizó el ecotipo Landsberg *erecta* y se lo cruzó con el mutante *eve2* en fondo genético del ecotipo Columbia. Luego se debe encontrar un evento de recombinación que permita identificar en que cromosoma se localiza la mutación. Para el mapeo de la mutación se utilizaron 800 plantas provenientes de la F₂ que tuvieran el fenotipo del mutante *eve2* (plántulas con hipocotilos cortos y cotiledones muy abiertos en pulsos horarios de RL y plantas adultas de baja estatura).

2.5.3 Extracción de proteínas e Inmunoblotting

Se prepararon los extractos proteicos según los procedimientos seguidos por Somers y col. (Somers *et al.*, 1991). Los extractos proteicos fueron corridos en un gel SDS-PAGE (de 1.5 –mm- de espesor, 7.5%) (Mini Protean II, Bio-Rad, Richmond, CA.). Las proteínas fueron transferidas por electroblotting desde el gel hacia los filtros de nitrocelulosa (con tamaño de poro de 0.45 µm, Sigma, ST Louis, Mo.) por medio del sistema Millipore, Bedford, Mass.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El filtro fue bloqueado con leche descremada Molico (1%), 50 mM Tris-Cl, 200 nM NaCl, pH 7.4 por 30 minutos a 37 °C. El filtro fue luego incubado a 7 °C con 40 ml del anticuerpo primario anti-phyA a una dilución de 1:1000. El anticuerpo monoclonal 073D realizado en ratón, contra phyA de *Arabidopsis* fue proporcionado por el Dr. Peter Quail (University of Berkeley, USA). Luego de lavada, la membrana se incubó con una dilución 1: 500 de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma). Las bandas fueron visualizadas incubando las membranas en 0.1 M Tris (pH 9.5), 100mM NaCl, 5 mM MgCl₂ conteniendo 0.165 mg/ml de BCIP (5-bromo-4chloro-3indoyl phosphate, *p*-toluidine salt) y 0.33 mg/ml de NBT (nitro blue tetrazolium), ambos productos de Sigma.

OBJETIVO DE LA TESIS

El objetivo de esta tesis es identificar mecanismos implicados en la regulación de la sensibilidad a la luz que se producen en distintos contextos del desarrollo en las plantas. Se identificarán y caracterizarán nuevos mutantes de *Arabidopsis thaliana* y completar su caracterización fisiológica y genética de los mutantes para comprender las implicancias de las alteraciones en su capacidad de respuesta a la luz.

También se utilizarán mutantes ya existentes que presentan morfología alterada en la planta adulta o en la regulación del momento floración, pero para los cuales no se ha establecido su influencia sobre las respuestas a la luz. Esta aproximación experimental esta basada en que varios mutantes identificados por presentar alteraciones en las respuestas fotomorfogénicas presentan morfología altera o problemas en la floración.

Utilizando esta aproximación podré identificar componentes de la regulación de las respuestas a la luz por medio de los cuales las plantas ajustan el crecimiento y desarrollo en virtud de la información recibida del ambiente lumínico.

RESULTADOS

3.1 CP3 está involucrado en la regulación negativa de la señalización del fitocromo A en *Arabidopsis*.

Debido a que muchos mutantes aislados y caracterizados por presentar respuestas fotomorfogénicas alteradas muestran además morfología alterada al estado adulto (por ej. enanismo), se analizaron las respuestas fotomorfogénicas en mutantes enanas y semi-enanas provenientes de la colección del *Arabidopsis* Biological Resource Centre (ABRC) (Casal, datos no publicados). Como resultado de experimentos preliminares se observó que el mutante semi-enano *cp3* (*compacta 3*) presentaba alteraciones en las respuestas morfológicas a pulsos horarios de RL. Este capítulo describe en forma detallada la fisiología del mutante *cp3*.

Incremento en la expansión de los cotiledones e inhibición del crecimiento del hipocotilo en la mutante *cp3-1* bajo pulsos de RL.

El mutante *cp3* no presentó un fenotipo obvio cuando las plántulas fueron cultivadas en oscuridad. Dado que la longitud de los hipocotilos de las plántulas *cp3* (9.2 ± 0.1) fue similar a la de las plántulas WT genotipo Lansberg *erecta* (9.6 ± 0.3 mm) y los cotiledones permanecieron cerrados. No se observaron diferencias cuando las plántulas fueron expuestas a RL continuo. Sin embargo, bajo pulsos de RL, las plántulas mutantes aumentaron la apertura entre los cotiledones y la inhibición del crecimiento del hipocotilo comparadas con el WT (Fig. 3.1.1).

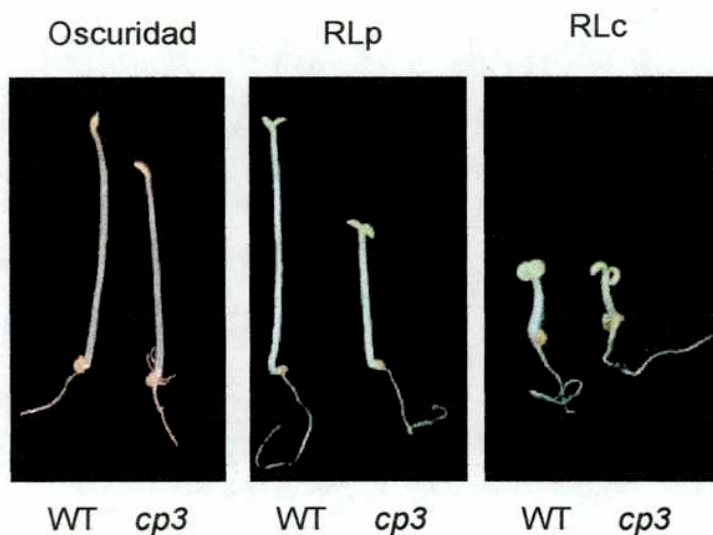


Figura 3.1.1:
Fenotipo del mutante *cp3* y de las plántulas WT de *Arabidopsis thaliana* crecidas en oscuridad, pulsos horarios de RL o RL continuo.

La mutación afecta diferencialmente el VLFR y LFR

Para investigar las respuestas bajo pulsos horarios de RL (VLFR) y las respuestas a bajos flujos de R (LFR) en más detalle, se expusieron las plántulas a pulsos horarios de R/RL ajustados para establecer una serie de proporciones calculadas de fitocromo en la forma activa, (Pfr/P). La inhibición del crecimiento del hipocotilo y la apertura de los cotiledones fue mayor para los mutantes *cp3* bajo pulsos de luz horarios que proveían una relación calculada de Pfr/P= 3% ($P < 0.001$; Fig. 3.1.2a, b). Las diferencias entre el WT y *cp3* permanecieron estables a relaciones altas de Pfr/P. Esto indica que la mutación *cp3* aumenta sólo la primera fase de la respuesta al Pfr/P, esto es el VLFR mediado por el phyA (Yanovsky et al. 1997), pero no tiene efectos sobre la segunda fase, el LFR mediado por el phyB (notar las líneas paralelas).

El HIR no está afectado en *cp3*

El RL continuo activa tanto las vías de VLFR como las del HIR pero el componente de HIR requiere tasas de flujo mayores y RL continuo (o pulsos de RL muy frecuentes ya que no opera con pulsos horarios de RL). Para investigar el HIR, se expusieron las plántulas a una serie de flujos de RL continuo y a pulsos horarios de RL. El mutante *cp3* mostró un aumento en la inhibición del crecimiento del hipocotilo y en la apertura de cotiledones para los flujos menores de RL continuo utilizados en este tratamiento ($P < 0.005$) y estas diferencias no aumentaron al incrementarse los flujos (notar las líneas paralelas, Fig. 3.1.2c, d). Esto indicaría que la mutación *cp3* aumenta el VLFR pero no el HIR. Para poner a prueba esta idea, las plantas fueron comparadas a igual flujo total de RL puestos en forma continua o como pulsos horarios. El fenotipo *cp3* se observó sólo bajo pulsos de RL (Fig. 3.1.2e, f).

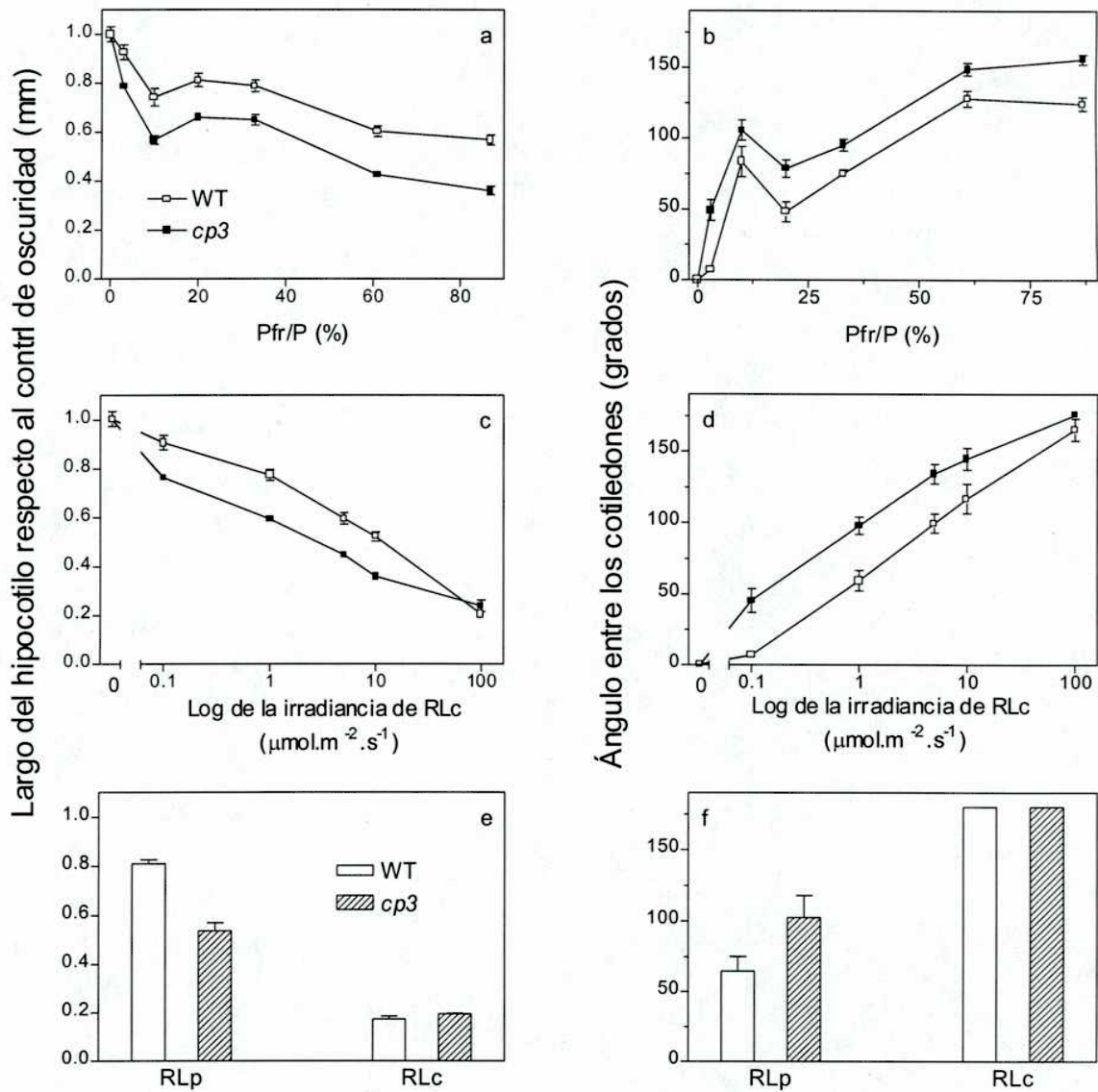


Figura 3.1.2: La mutación *cp3* aumenta el VLFR sin afectar el LFR y el HIR del crecimiento del hipocotilo y apertura de los cotiledones. Crecimiento del hipocotilo relativo al control de oscuridad (a, c, e) y ángulo entre los cotiledones (b, d, f) en plántulas expuestas a pulsos horarios de R/RL que establecen una serie de Pfr/P (a, b), diferentes flujo de RL continuo (c, d), o de RL continuo *versus* pulsos horarios de RL a igual flujo total (e, f). Los datos son el promedio y e.e. de al menos 12 (a, d) o 9 (e, f) réplicas.

La germinación de las semillas de *cp3* es hipersensible a un pulso de FR

Se sabe que el *phyA* media el VLFR de la germinación de las semillas (Botto *et al.*, 1996, Shinomura *et al.*, 1996). Se demostró en algunas especies que el HIR inhibe la germinación pero en *Arabidopsis* no es evidente una inhibición de la germinación por el HIR (Casal y Sánchez, 1998). La germinación de las semillas del mutante *cp3* y del genotipo WT incubadas por 3 días a 4° C seguido por 3 horas a 37° C resultó baja cuando las semillas fueron transferidas a 25° C sin un pulso de luz (controles de oscuridad, Fig.3.1.3). Un pulso de R promovió la germinación completa en ambos genotipos. Sin embargo, un pulso de RL fue significativamente más efectivo en *cp3* que en las WT ($p < 0.0001$; Fig. 3.1.3). Estos resultados sugieren que las respuestas VLFR aumentadas en el mutante *cp3* no estuvieron restringidas a la elongación de los hipocotilos y a la apertura de los cotiledones, sino que incluyeron también a la germinación de las semillas.

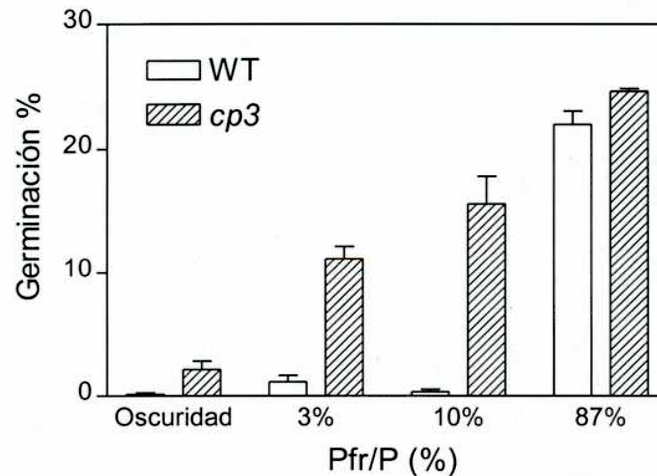


Figura 3.1.3: La mutación *cp3* aumenta el VLFR de la germinación de semillas de *Arabidopsis*. Las semillas se incubaron 3 días a 4° C seguido por 3 h a 37° C y posteriormente fueron expuestas a un pulso de R o RL o permanecieron como control en oscuridad, en todos los casos a 25° C durante 4 días para contar luego el número de semillas germinadas. Los datos son promedios y e.e. de 9 réplicas.

Contenido de clorofila bajo Rojo Lejano

El crecimiento del hipocotilo, la germinación de las semillas (crecimiento del embrión) y probablemente la apertura de los cotiledones son todos procesos que involucran la expansión celular. Para investigar el VLFR y el HIR en un proceso que no esté directamente relacionado con la expansión celular, se estudió la disminución de la síntesis de clorofila por el RL (Barnes *et al.*, 1996) y la síntesis de antocianas bajo RL en plántulas WT y *cp3*. Se hicieron crecer plántulas de *Arabidopsis* en oscuridad, con pulsos horarios de RL o bajo RL continuo y luego fueron transferidas a luz blanca continua durante dos días. Se midieron los niveles de clorofila y se observó que fueron reducidos por los pulsos de RL y este efecto (VLFR) resultó más notorio en la mutante *cp3* que en el WT (Fig. 3.1.4; $P < 0.05$). En RL continuo mostró niveles menores de clorofila que los pulsos horarios provistos a un flujo total igual, pero el efecto adicional HIR es decir la diferencia entre RL dado como pulso o en forma continua fue mayor en *cp3*.

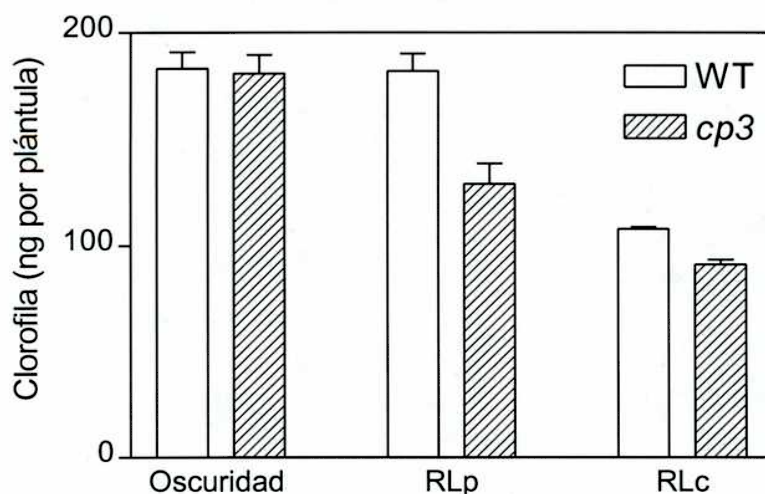


Figura 3.1.4: La mutación *cp3* intensifica el VLFR del bloqueo de la síntesis de clorofila en luz blanca. Niveles de clorofila en plántulas WT y el mutante *cp3* crecidas en oscuridad o en pulsos de RL o RL continuo y transferidas a luz blanca. Los datos son el promedio y e.e. de 9 réplicas.

Síntesis de antocianas bajo RL

Se midieron los niveles de antocianas en plántulas que crecieron bajo pulsos horarios de RL o bajo RL continuo. El VLFR de la síntesis de antocianas es muy débil en *Arabidopsis*. El efecto del RL continuo es un HIR (Yanovsky *et al.*, 2000). Ni el VLFR ni el HIR se vieron aumentados en el mutante *cp3* (Fig. 3.1.5.)

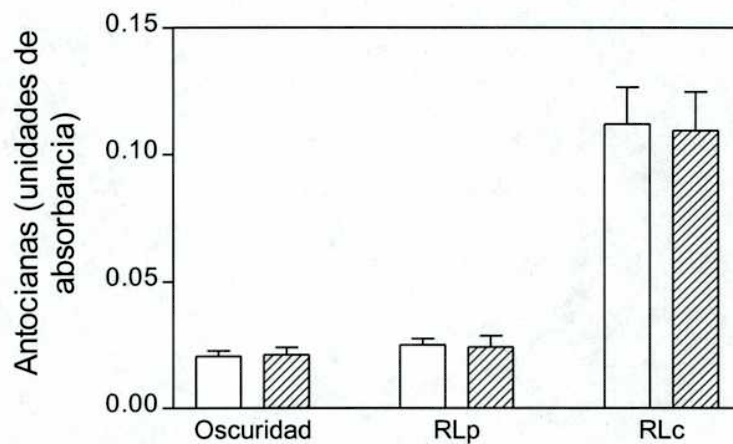


Figura 3.1.5: La síntesis de antocianas no es afectada por la mutación *cp3*. Niveles de antocianas en plántulas crecidas en oscuridad, pulsos horarios de RL o RL continuo. Los datos son el promedio y e.e. de 9 réplicas.

El enanismo y los VLFRs aumentados en *cp3* están genéticamente ligados

EL mutante *cp3* fue aislada por Koorneef en 1983 como una planta semi-enana en el estadio adulto (Koorneef, 1983) (Fig. 8). El VLFR incrementado puede resultar de la mutación *cp3* en sí misma o de una segunda mutación desconocida que se pone de manifiesto bajo pulsos de RL. Para investigar este punto, se cruzó la mutante *cp3* con el WT de Landsberg *erecta* y se analizó la generación F₂ tanto para el VLFR como para el fenotipo adulto (Fig. 3.1.8). El fenotipo de las plántulas F₁ que crecieron bajo pulsos de RL resultó intermedio entre las plántulas de WT y *cp3* (longitud de los hipocotilos respecto de los controles de oscuridad, Pfr/P=3%, $CP3CP3 = 0.98 \pm 0.02$; $CP3cp3 = 0.87 \pm 0.04$; $cp3cp3 = 0.74 \pm 0.02$; Pfr/P = 10%, $CP3CP3 = 0.90 \pm 0.02$; $CP3cp3 = 0.68 \pm 0.03$; $cp3cp3 = 0.52 \pm 0.04$). En el estadio adulto las plantas heterocigotas tuvieron un fenotipo WT. Las plántulas de la generación F₂ fueron cultivadas bajo pulsos horarios de RL y se midió la longitud del hipocotilo y el ángulo entre los cotiledones. Estas plántulas fueron transplantadas a macetas y cultivadas bajo luz blanca continua. Las plantas adultas se clasificaron de acuerdo a su fenotipo *cp3*. Si el fenotipo adulto y el fenotipo de la plántula no estuviesen genéticamente relacionados, el crecimiento del hipocotilo y la apertura de los cotiledones bajo pulsos de RL debería ser similar para las plantas con fenotipo WT o *cp3* debido a la segregación independiente de las características. Sin embargo, comparando las plantas fenotípicamente normales, con aquella que poseían un fenotipo *cp3* adulto mostraron tener hipocotilos significativamente más cortos y cotiledones más abiertos bajo pulsos de RL (Tabla 3.1.1). Así los VLFRs aumentados son debidos al locus *cp3* o a un locus fuertemente ligado.

Fenotipo adulto	largo del hipocotilo(mm)	Angulo entre los cotiledones (ángulo)
WT	7.7 ±0.4	19 ±5
<i>cp3</i>	5.9 ±0.5	68 ±12

Tabla 3.1.1: El fenotipo adulto del mutante *cp3* (poca altura, hojas redondeadas) correlaciona con la reducción del largo del hipocotilo y el aumento de la apertura entre los cotiledones en RLp en plántulas de la F₂ provenientes del cruzamiento en plantas WT y el mutante *cp3*. Los datos son el promedio y e.e. de 17-18 plántulas. Las diferencias entre el WT y el mutante *cp3* son significativas para P<0.01.

Dependencia del fenotipo de la mutante *cp3* del *phyA*

Para investigar si el fenotipo de la mutante *cp3* depende del *phyA*, se cruzó este mutante con el mutante nulo *phyA-201*. Se observó que bajo luz RL sólo el doble mutante *phyA* homocigota perdió completamente la inhibición del crecimiento del hipocotilo y la apertura de los cotiledones (es decir que las plántulas parecían crecidas en oscuridad). Si bien el heterocigota (*PHYA phyA*) mostraba diferencias cuantitativas con respecto al WT (Whitelam *et al.*, 1993), estas diferencias fueron minimizadas al trabajar con flujos altos de RL. Si el fenotipo *cp3* bajo RL fuese dependiente del *phyA*, la proporción de plántulas que mostraría cotiledones completamente cerrados debería permanecer inalterada por el fondo genético *CP3* o *cp3*. Si la mutación *cp3* tuviese efectos independientes del *phyA* los cotiledones de algunas de las plántulas de *phyA phyA* deberían abrirse (al menos parcialmente). El número de plántulas con los cotiledones completamente cerrados y con hipocotilos largos fue de 42 de 161 (26%), es decir que no fue significativamente diferente de la relación de 1/4 observada en la F₂ de los cruzamientos entre la WT y *phyA*. Por lo tanto, se observa que el VLFR aumentado en el mutante *cp3* depende del *phyA*. El doble mutante homocigota *phyA cp3* se identificó como plántulas que no respondían al RL

(hipocotilos largos, cotiledones cerrados) que produjeron plantas adultas con un fenotipo *cp3*. Se expusieron el doble mutante, los mutantes simples y el WT a pulsos de RL. La mutación *phyA* resultó epistático a *cp3*, confirmando que los VLFRs aumentados en *cp3* dependían del *phyA* (Fig. 3.1.6).

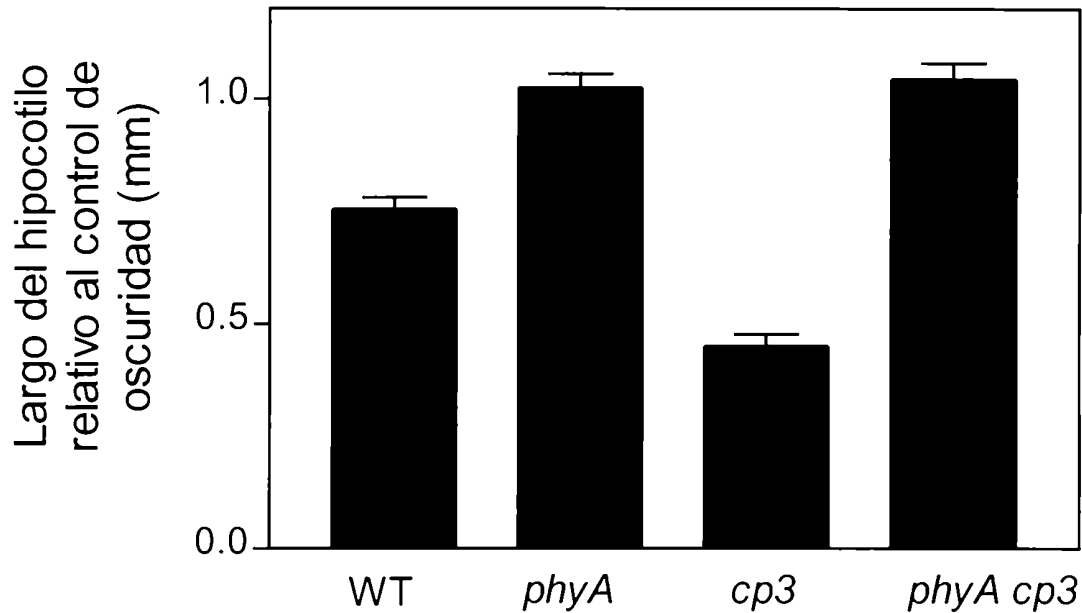


Figura 3.1.6: El aumento en el VLFR del mutante *cp3* requiere del *phyA*. Las plántulas del WT del mutante simple *phyA* y *cp3* y del doble mutante *phyA cp3* se expusieron a pulsos horarios de RL. Los datos son el promedio y c.e. de 7-11 réplicas.

Niveles normales de phyA en *cp3*

Se ha demostrado que la sobreexpresión del phyA aumenta los VLFRs (Casal *et al.*, 1994; Clough *et al.*, 1995). Para investigar si el incremento de los VLFRs era debido a altos niveles de phyA. Se midieron dichos niveles inmunológicamente. No se observaron diferencias entre el WT y la *cp3* (Fig. 3.1.7).

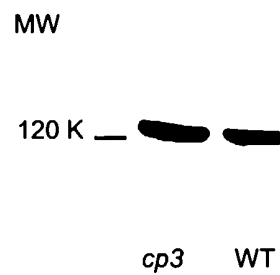


Figura 3.1.7. Análisis de los niveles de phyA mediante un anticuerpo monoclonal en el mutante de *cp3*. Las proteínas fueron extraídas de plántulas incubadas en oscuridad durante 4 días luego de un pulso de R para inducir la germinación. Se utilizó anticuerpo monoclonal 073D

Efectos aditivos del *cp3* y el *phyA* o *phyB* en el fenotipo de la roseta

Comparado con el WT, la mutante *cp3* mostró una estatura reducida y hojas redondeadas con los pecíolos más cortos (Fig. 3.1.8).

a



b



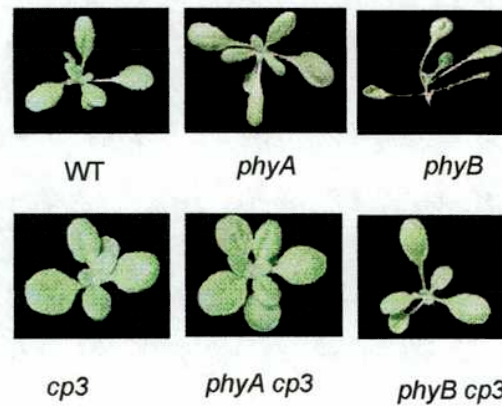
WT

cp3

Figura 3.1.8: Fenotipo adulto del mutante *cp3*. Plantas WT y del mutante *cp3* crecieron en fotoperíodo de 12 horas de luz blanca. (a) Hojas. (b) Roseta.

La mutación *phyA* aumentó ligeramente la longitud del peciolo tanto en el fondo genético *CP3* como en el *cp3* (Fig. 3.1.9a). La mutación *phyB* causó un fenotipo (peciolos largos) más obvio que en *phyA* tanto en el fondo genético *CP3* como en *cp3* (Fig. 3.1.9b). De estos resultados se deduce que el fenotipo del *cp3* depende del *phyA* pero el fenotipo de la roseta de *cp3* no requiere ni *phyA* ni *phyB*.

a



b

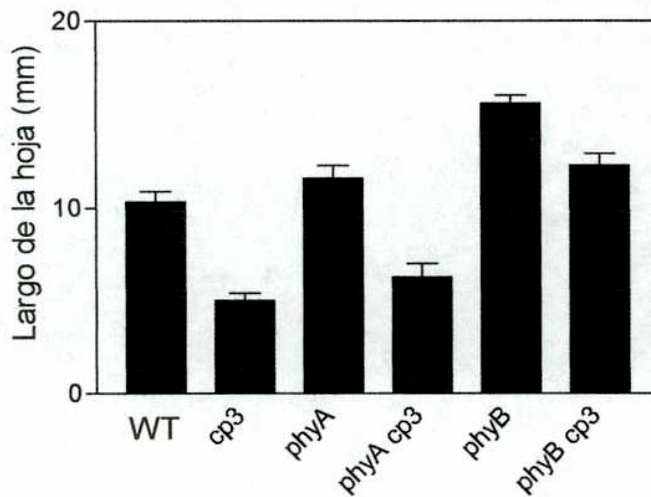


Figura 3.1.9: El fenotipo de la roseta del mutante *cp3* no requiere de *phyA* ni *phyB*. Plantas WT, mutantes simples *cp3*, *phyA*, *phyB* y los dobles mutantes de *phyA cp3*, y *phyB cp3* crecidas en fotoperíodo de 12 h de luz blanca. (a) Rosetas. (b) Largo del primer par de hojas. En b, los datos son el promedio y e.e. de 6-29 réplicas.

3.2 SPA1, regula negativamente las respuestas en la vía de señalización del fitocromo A.

La mutación *spa1* incrementa las respuestas en RL continuo (Hoecker *et al.* 1998; Hoecker y Quail 2001). Dado que el RL activa a las VLFR y HIR de phyA, este fenotipo podría ser el resultado de un aumento en la sensibilidad en el VLFR o un aumento en el HIR (que requiere irradiancia continua con RL) o un aumento en ambos modos de acción. En este capítulo se investigarán las respuestas fotomorfogénicas del mutante *spa1*, el análisis fisiológico del mutante permitirá determinar el rol que cumple el SPA1 en la señalización en respuesta a la luz mediadas por el phyA.

Efectos de *spa1* en la desetiología con pulsos de RL separados por intervalos de oscuridad de distinta duración.

El VLFR y el HIR pueden ser fotobiológicamente separados en dos fases discretas en respuesta a la inducción del phyA con pulsos de RL separados por intervalos de oscuridad de distinta duración. Cuando las plántulas son expuestas a distintos intervalos de oscuridad separados por pulsos de RL (3 min.) desde luz continua (donde el intervalo de oscuridad es nulo) a 4 h 57 min. de oscuridad entre pulsos sucesivos de RL; se observó que a medida que aumenta el intervalo de oscuridad disminuye la inhibición del crecimiento del hipocotilo y el ángulo entre los cotiledones. La curva que se obtiene muestra dos fases, una que requiere pulsos muy frecuentes de RL (HIR) y otra que se satura a una baja frecuencia de pulsos de RL (VLFR) (Casal. *et al.* 2000) (Fig. 3.2.1).

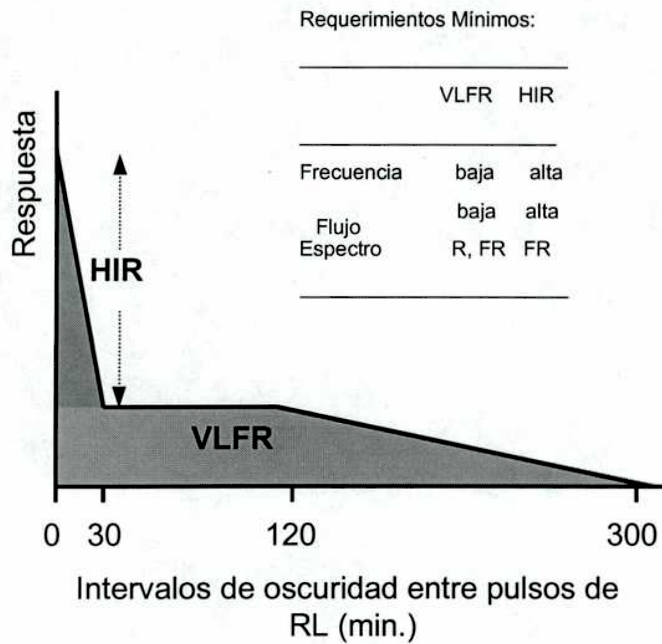


Figura 3.2.1: VLFR y HIR del *phyA* en respuesta a RLp separados por intervalos de oscuridad de distinta duración (Casal *et al.*, 2003).

Las plántulas fueron expuestas durante 3 días a pulsos de RL de 3 minutos de duración a igual flujo total separados por intervalos de oscuridad de distinta duración. Las plantas WT del ecotipo RLD mostraron un incremento significativo en el porcentaje de inhibición del crecimiento del hipocotilo y el ángulo de apertura entre los cotiledones en la fase de la respuesta que corresponde al VLFR, pulsos de RL de 3 minutos cada 6 horas son lo suficientemente efectivos para inducir este tipo de respuestas. A medida que el intervalo de oscuridad se reduce de 5 horas 57 minutos se produce un incremento gradual de este efecto (Fig. 3.2.2a, b). Sin embargo la reducción del intervalo de oscuridad de 57 minutos a 27 minutos no produjo un efecto adicional, esto indicaría que a estas frecuencias el VLFR se encuentra saturado. Un incremento pronunciado en la respuesta tanto para el porcentaje de inhibición del crecimiento del hipocotilo como en la apertura de los cotiledones se observó cuando el intervalo de oscuridad se redujo de 27 a 3 minutos u oscuridad total (0 minutos), indicando una abrupta transición al HIR (Fig. 3.2.2a, b). En el mutante *spa1* la fase que corresponde a la zona del VLFR está por encima y alcanza un valor de saturación más alto

que la respuesta que produce el WT, mientras que el HIR no aumenta, las curvas son paralelas.

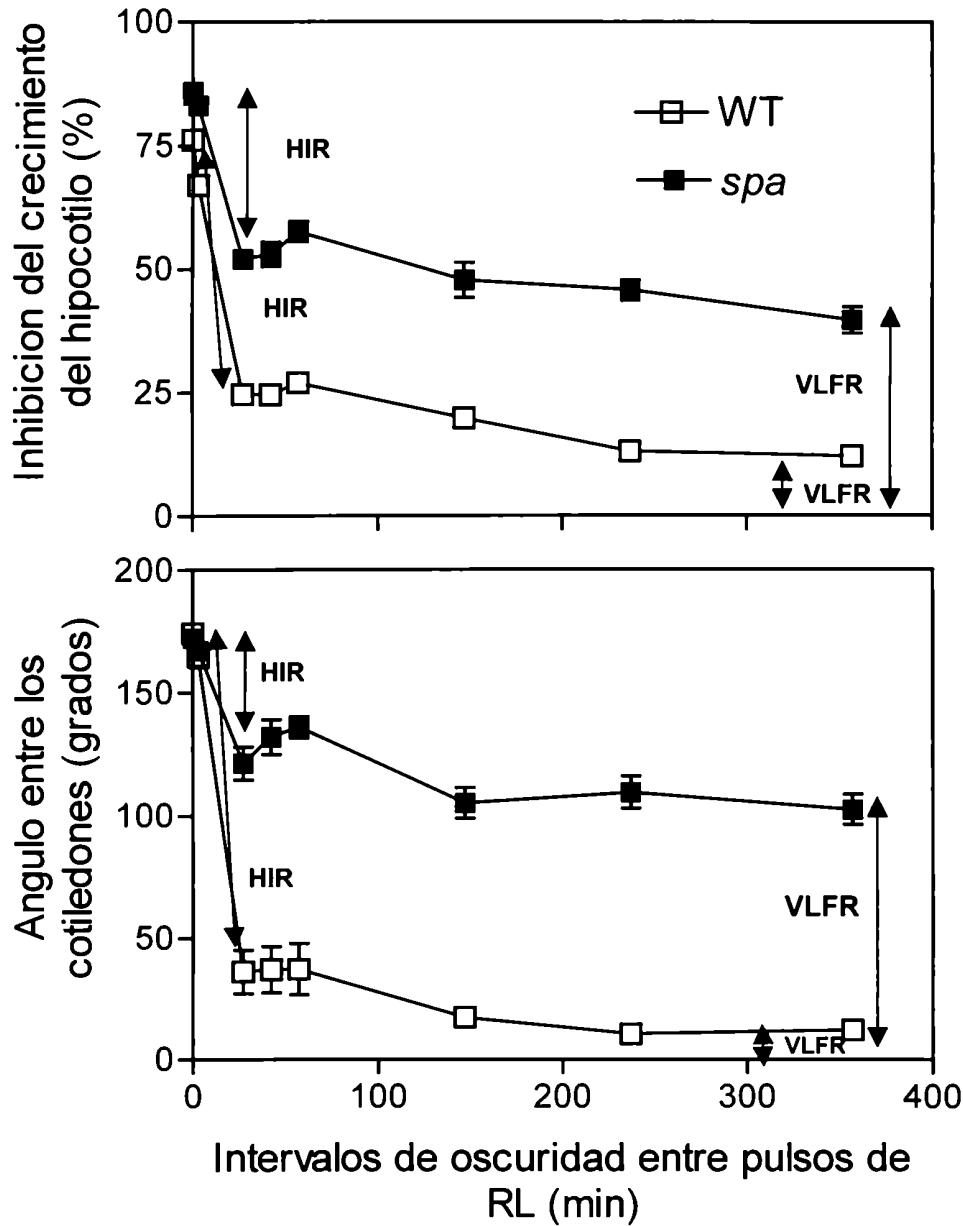


Figura 3.2.2: Inhibición del crecimiento del hipocotilo y ángulo entre los cotiledones (comparando con el control en oscuridad) en función de la duración de los intervalos de oscuridad entre pulsos sucesivos de RL ($3 \text{ min. } 20 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Efectos del *spa1* sobre el VLFR y LFR

Para investigar el efecto de la mutación *spa1* sobre el VLFR y LFR se analizó la inhibición del alargamiento del hipocotilo y la apertura de los cotiledones en plántulas etioladas expuestas por tres días a pulsos horarios de luz que establecían niveles crecientes de Pfr/P (Fig. 3.2.3a, b). En concordancia con la información preexistente, las plántulas WT mostraron una respuesta bifásica, la primera fase corresponde al VLFR mediada por el *phyA* y la segunda fase al LFR mediada por el *phyB* (Yanovsky *et al.*, 1997). La zona del VLFR fue más pronunciada en el mutante *spa1* comparada con el WT, mientras que en la zona del LFR se observa una disminución en la respuesta del mutante *spa1*, menor pendiente.

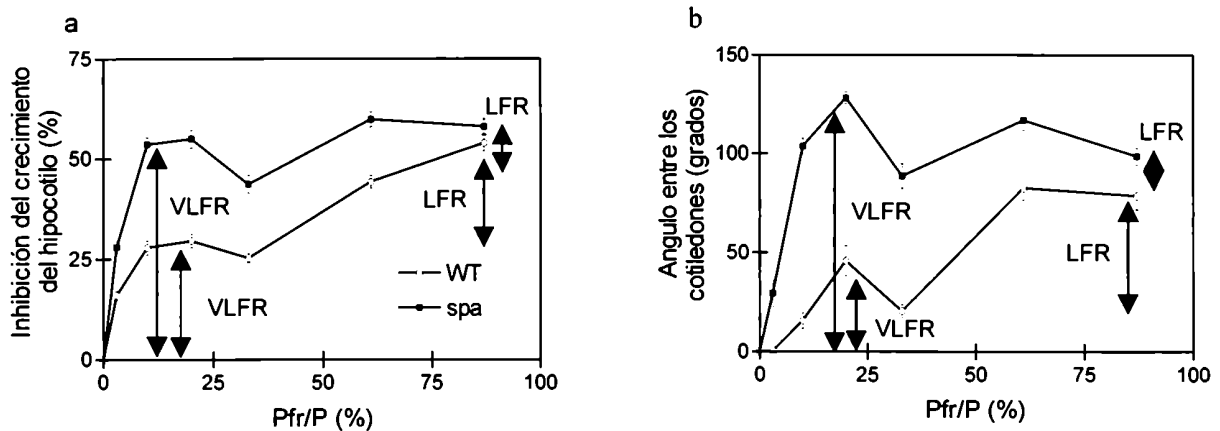


Figura 3.2.3. VLFR y LFR en el mutante *spa1*. Inhibición del crecimiento del hipocotilo (a) y ángulo entre los cotiledones (b) comparando con el control de oscuridad en función de la proporción de fitocromo en la forma activa (Pfr) obtenida con pulsos horarios.

Interacciones entre el phyA y phyB

En numerosas circunstancias es posible observar interacciones entre el phyA y phyB. El signo positivo o negativo de esta interacción depende del modo de acción a través del cual actúa el phyA. El phyA actuando a través de HIR aumenta la efectividad del Pfr del phyB (acción sinérgica del phyA sobre el phyB). Cuando el phyA actúa a través del VLFR reduce la acción del Pfr del phyB (acción antagónica del phyA sobre el phyB).

Para investigar la interacción sinérgica entre el phyA y el phyB se comparan las respuestas a un pulso diario de 5 minutos de R (activa al phyB) o RL (inhibe la acción del phyB), precedido o no por un pretratamiento de 3 horas de RL continuo (activa el HIR del phyA). Comparando con los controles de oscuridad, tanto la activación del phyB por un pulso de R o la activación del phyA vía HIR por 3 horas de RL tuvieron efectos pequeños en la apertura de los cotiledones. Se obtuvo una amplificación de la respuesta al phyB, mediada por phyA cuando se expusieron las plántulas a un pretratamiento de 3 horas de RL seguida de un pulso de 5 minutos R, siendo este efecto significativamente ($P < 0.05$) mayor para el mutante *spa1* (Fig. 3.2.4). Esto estaría indicando que el HIR en el mutante *spa1*, también estaría aumentado aunque no en forma tan dramática como para el caso del VLFR.

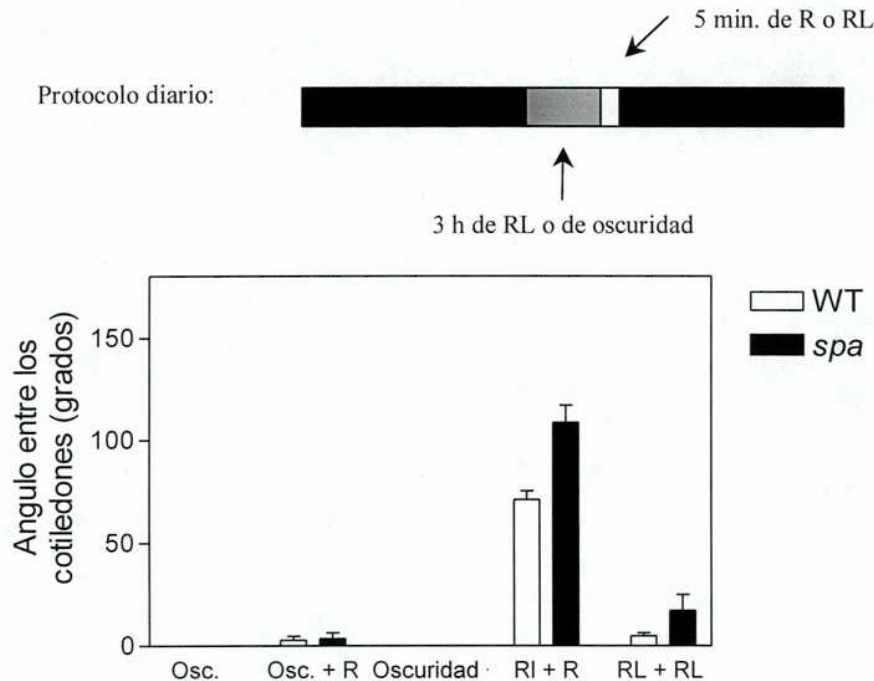


Figura 3.2.4: Amplificación de la respuesta al Pfr del phyB mediada por el phyA. Las plántulas de *Arabidopsis* fueron expuestas a un pulso diario de R o RL (5 min.) en combinación factorial con o sin pretratamiento de 3 h de RL continuo. Los datos son el promedio y e.e. de 9 réplicas.

Efectos del *spa* en las respuestas HIR

Síntesis de antocianinas

La síntesis de antocianinas en RL continuo es controlada por *phyA*, resultados anteriores demostraron que la síntesis de antocianinas es elevada en el mutante *spa1* (Hoecker *et al.*, 1998) y en relación a esta observación los niveles de mRNA de la enzima chalcona sintetasa que participa en la biosíntesis de las antocianinas fueron elevados en el mutante comparado con el WT cuando las plántulas fueron irradiadas con flujos altos de RL continuo (Hoecker y Quail, 2001).

Se analizó el efecto del *spa1* en la síntesis de antocianinas comparando las respuestas de plántulas expuestas a pulsos de R y RL continuo a igual flujo total. El efecto del RL continuo fue significativamente mayor que el de los pulsos horarios de RL que proveían igual flujo total tanto para las plantas mutantes como en el WT indicando que la acumulación de antocianinas en RL es una respuesta de tipo HIR. En las plantas crecidas en agar-agua ni el WT ni el mutante *spa1* presentaron diferencias en los niveles de antocianinas bajo pulsos de RL. Se observan pequeñas diferencias en RL continuo para el mutante *spa1* (Fig.3.2.5a).

La sacarosa potencia algunas respuestas de las plantas a la luz, entonces para poder discriminar las diferencias observadas en el RL continuo se suplementó el agar con un 2 % de sacarosa. El mutante *spa1* mostró un mayor contenido de antocianinas que el WT en pulsos horarios de RL pero no en oscuridad (Fig. 5 b) indicando que el VLFR de la síntesis de antocianinas es aumentado por la mutación. Las diferencias entre el WT y *spa1* fueron aún algo mayores en RL continuo que en pulsos de RL (Fig. 3.2.5 b) indicando que la mutación *spa1* aumentaría en cierto grado a las HIR.

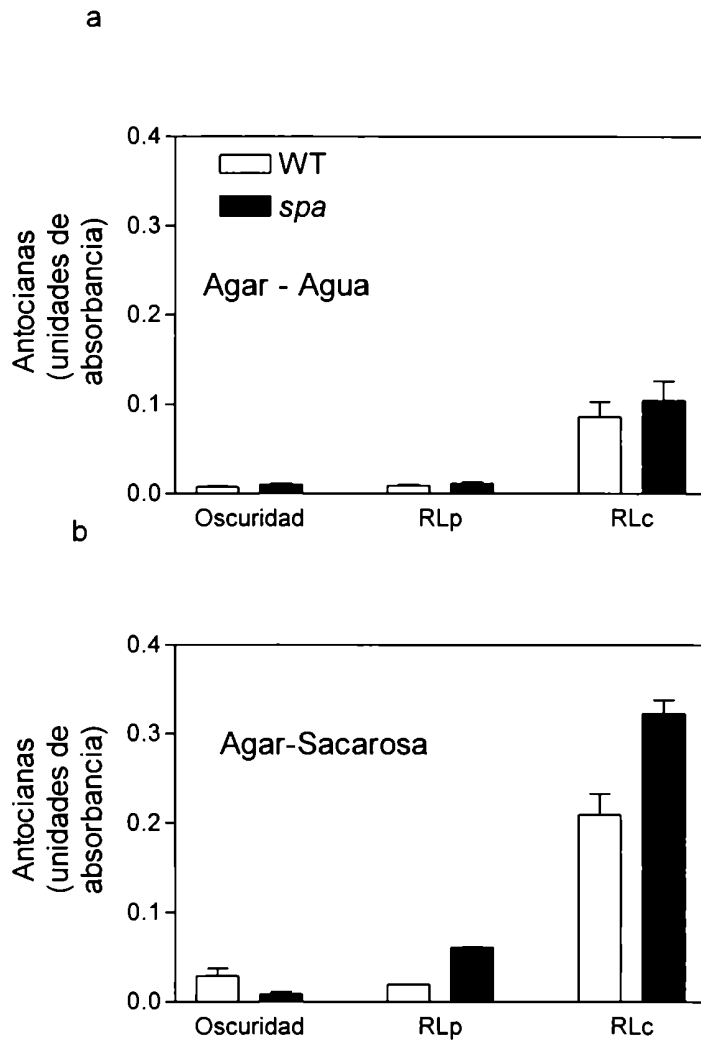


Figura 3.2.5. Nivel de antocianinas en plántulas de *Arabidopsis* irradiadas con pulsos de RL o RL continuo a igual flujo total durante 3 días. Los datos son promedio de 9 réplicas. a) Plántulas crecidas en agar sin suplementar. b) plántulas en agar suplementado con 2 % de sacarosa.

Contenido de clorofila

Cuando las plántulas de *Arabidopsis* son expuestas a tratamientos con RL continuo y luego se transfieren a luz blanca se observa una disminución en la síntesis de clorofila (Barnes *et al.*, 1996). Se expusieron plantas WT y del mutante *spa1* a pulsos horarios de RL y a RL continuo a igual flujo total durante 3 días y luego las plántulas se transfirieron a luz blanca durante dos días (Fig. 3.2.6). La mutación *spa1* no produce un efecto significativo en las plantas que permanecieron en oscuridad y luego se transfieren a luz blanca. Comparando con este control de oscuridad, la mutación *spa1* produjo un aumento en la respuesta en la zona del VLFR. Si bien el RL continuo produce una disminución en el nivel de clorofila, esta caída no fue mayor en el mutante *spa1*.

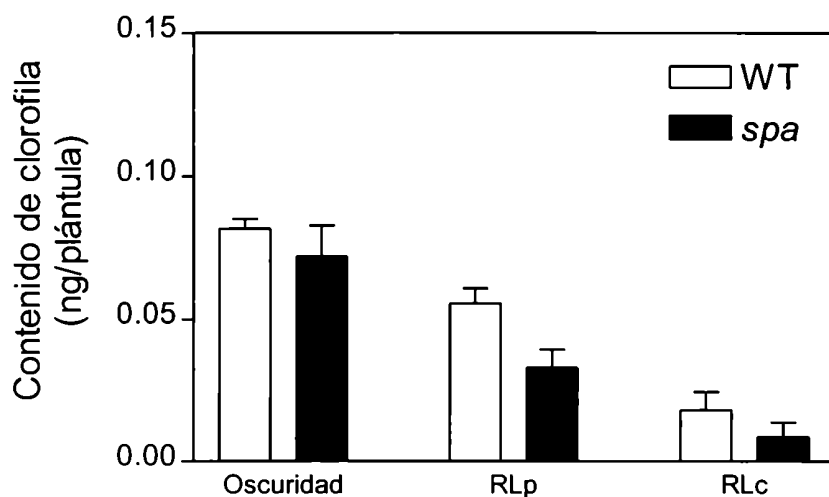


Figura 3.2.6: Contenido de clorofila en plántulas de *Arabidopsis*. Plántulas expuestas a pulsos de RL o RL continuo durante 3 días y luego transferidas a luz blanca. Los datos son el promedio y e.e. de 9 réplicas.

3.3 GIGANTEA regula las respuestas mediadas por el phyA en la desetiología de *Arabidopsis thaliana*, independientemente de su rol en el reloj circadiano.

Dado que muchos mutantes fotomorfológicos muestran defectos en el tiempo a floración. Se analizaron mutantes de floración tardía y temprana del banco de semillas del Centro de Recursos Biológicos de *Arabidopsis*. (ABRC). Para ver si alguno de ellos tenían defectos fotomorfológicos (Casal datos no publicados). Como resultado de experimentos preliminares se observaron respuestas deficientes a los pulsos de RL en el mutante de floración tardía *gi* (*gigantea*), que en este capítulo es analizado en detalle.

Efectos de la mutación *gi* en pulsos de RL y RL continuo

El mutante *gi* presentó un fenotipo normal en oscuridad comparado con las plántulas WT pero produjo una reducción tanto en el porcentaje de inhibición del crecimiento del hipocotilo y en la apertura de los cotiledones cuando las plántulas fueron expuestas a pulsos de RL y a pulso de R (Fig. 3.3.1a, b). La disminución en la respuesta en los pulsos de RL estaría indicando que el VLFR es deficiente en el mutante *gi*. Se observó una disminución en la respuesta del mutante *gi* en los pulsos R, consistente con datos publicados durante el desarrollo de nuestros experimentos (Huq *et al.*, 2000). Huq *et al.* (2000) le confirieron un rol a *gi* en la señalización del phyB por el fenotipo que presenta el mutante en R continuo, hipocotilo alargado y cotiledones semiabiertos y no identificaron ningún fenotipo en respuestas mediadas por el phyA (no usaron pulsos de RL). Sin embargo, las diferencias observadas entre pulsos de R y pulsos de RL no aumentaron, en otras palabras estas diferencias estarían indicado que si bien el *gi* responde menos a los pulsos de R el mutante no afecta el LFR donde participa el phyB. En RL continuo la respuesta del *gi* también se ve afectada y es menor que en el WT pero estas diferencias ya estaban presentes a bajos flujos y no aumentaron con flujos mayores de RL continuo (Fig. 3.3.1c, d). Estos resultados son consistentes con una diferencia en el VLFR y una respuesta normal en el HIR.

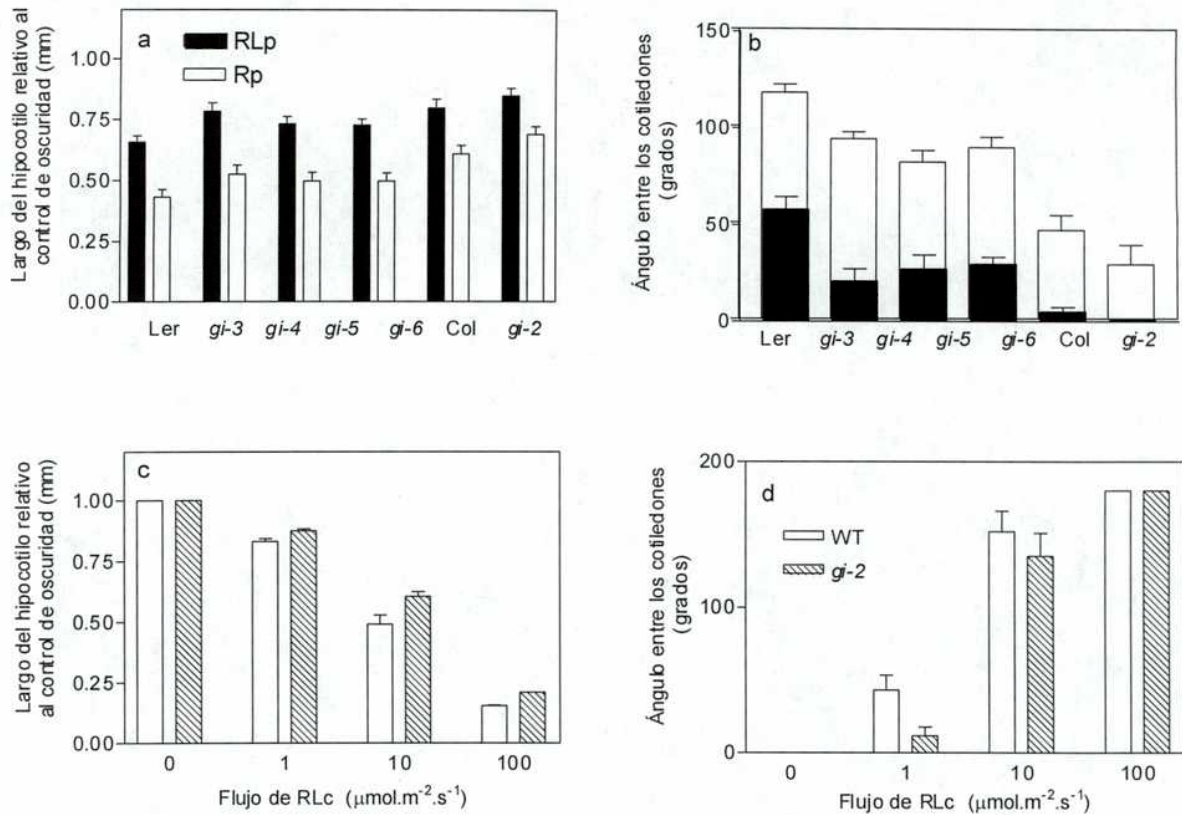


Figura 3.3.1: VLFR es deficiente en *gi*. a) Largo relativo del hipocotilo relativo a los controles de oscuridad b) Ángulo entre los cotiledones, en plántulas expuestas a pulsos horarios de 3 min. de RL y R. Flujos de RLc (c, d). Los datos son el promedio y e.e de al menos. de 9 réplicas.

Respuesta del mutante *gi* a distintos pulsos de luz RL

Para investigar con mayor detalle el VLFR y el LFR las plántulas fueron expuestas a pulsos horarios de R/RL que establecen diferentes proporciones de Pfr/P. Las plántulas WT del ecotipo Landsberg *erecta* mostraron una curva bifásica donde la primera fase corresponde al VLFR (0-10%) y la segunda fase al LFR (30-87%). Para realizar este experimento se utilizó el alelo *gi-4*. El mutante mostró una disminución en la respuesta en la zona del VLFR. Mientras que para el LFR la forma de la curva es similar (notar líneas paralelas) entre el WT y el mutante *gi* (Fig. 3.3.2a,b). Estos resultados indicarían que el mutante tiene defectos en la zona del VLFR mediada por el phyA y no la zona del LFR mediada por el phyB.

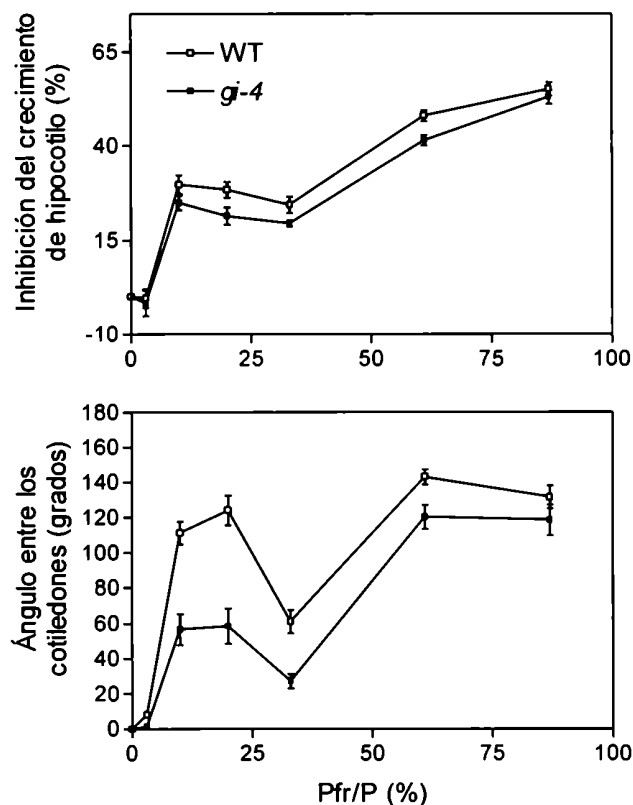


Figura 3.3.2: VLFR y LFR en el mutante *gi* a) Inhibición del crecimiento del hipocotilo. b) Ángulo entre los cotiledones. Las plantas fueron expuestas a pulsos horarios de R/RL que establecían distintos valores de Pfr/P. Los datos son el promedio y e.e. de 12 réplicas.

La germinación del mutante *gi* es deficiente en pulsos horarios de RL

Los resultados obtenidos hasta el momento le confieren al mutante *gi* un rol en la vía de señalización del *phyA*, por lo tanto se analizaron otras respuestas donde participa el *phyA*. Se sabe que el *phyA* media el VLFR en la germinación de las semillas (Botto *et al.* 1996; Shinomura *et al.* 1996). Se analizó entonces la germinación en distintos alelos del mutante *gi* obtenidos en fondos genéticos diferentes (en los ecotipos Landsberg *erecta* y el ecotipo Columbia). La germinación de las semillas del mutante *gi* expuestas a pulso de RL que establecían $Pfr/P = 3$ o 10% fue menor que en el WT. Un pulso de R promovió la germinación en ambos genotipos. Pero un pulso de RL fue menos efectivo para los distintos alelos del mutante *gi*. Estos resultados estarían indicando que las deficiencias observadas en el VLFR no son exclusivas para el crecimiento del hipocotilo y la apertura de los cotiledones e incluyen la germinación. (Fig. 3.3.3).

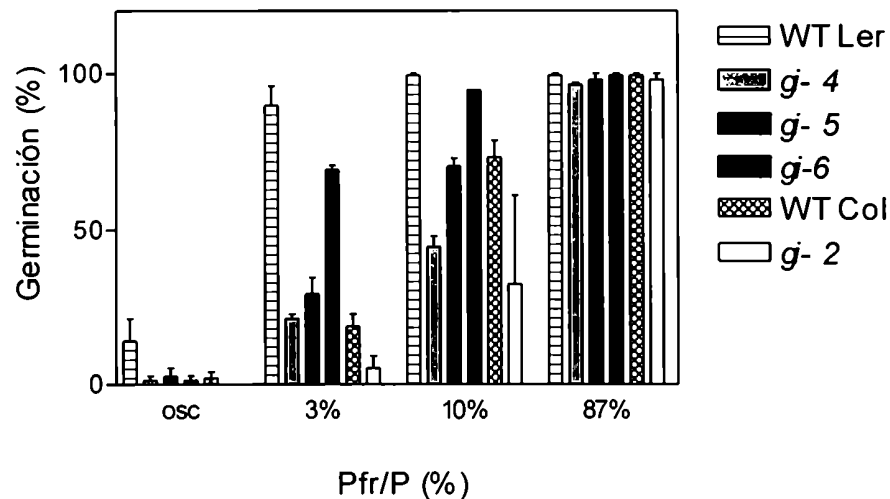


Figura 3.3.3: Porcentaje de germinación en semillas WT y en distintos alelos del mutante *gi*. Los datos son el promedio de y e.e. 9 réplicas

Efectos comparativos de RLc versus RLp en el contenido de clorofila del mutante *gi*

Las plántulas estuvieron cultivadas en oscuridad, pulsos de RL o en RL continuo (a igual flujo total) durante tres días y luego fueron transferidas a luz blanca para medir el efecto de la mutación *gi* en el bloqueo de la síntesis de clorofila (Barnaes *et al.* 1996). No se observaron diferencias significativas entre el mutante *gi* el WT Landsberg *erecta* (Fig. 3.3.4).

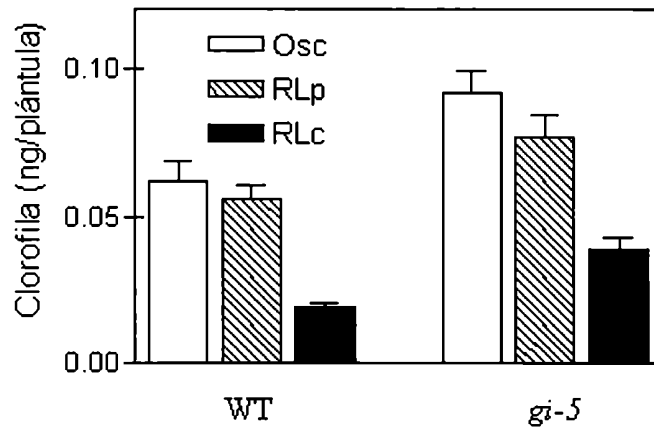


Figura 3.3.4: Contenido de clorofila en plántulas de Arabidopsis. Las plántulas fueron expuestas a RLp y RLc durante 3 días y luego transferidas a luz blanca. Los datos son el promedio y e.e. de 9 réplicas.

Efectos del fotoperíodo en crecimiento del hipocotilo en mutantes que afectan los ritmos circadianos

El crecimiento del hipocotilo está regulado por múltiples señales ambientales y endógenas, entre las que se incluyen la luz y los ritmos circadianos. Los ritmos circadianos en el crecimiento del hipocotilo de *Arabidopsis* pueden detectarse claramente en las plántulas que crecen bajo ciclos de luz/oscuridad y luego son transferidas a condiciones de luz continua y temperatura constante. Los ritmos son el resultado de la regulación de las vías de señalización de la luz, como la luz normalmente inhibe el crecimiento del hipocotilo los ritmos circadianos aseguran que el efecto de la luz tenga lugar en un momento particular del día.

Las plántulas WT de *Arabidopsis* crecidas bajo fotoperíodos cortos (DC) muestran hipocotilos más largo que aquellas que crecen en fotoperíodos largos (DL). Este fenotipo sigue observándose aún cuando la intensidad de la luz en fotoperíodos cortos sea el doble que en fotoperíodos largos. No obstante, la longitud del hipocotilo de las plantas crecidas en días cortos no es el resultado de una reducción de la cantidad diaria de luz percibida por la planta, sino del momento particular del día durante el cual está presente la luz. Esto se debería a la superposición de la luz en una parte del día con la fase del ritmo circadiano que permite tener una mayor sensibilidad a la luz en días cortos que en días largos (Yanovsky datos no publicados).

Como el mutante *gi* participa en las señales de los ritmos circadianos, para evaluar el efecto del fotoperíodo en el crecimiento del hipocotilo, se expusieron plántulas del mutante *gi* en dos fondos genéticos distintos (*gi-5* en fondo genético Lansberg *erecta* y *gi-100* en Columbia) con sus respectivos WT en fotoperíodos corto y largos. Se observó que los mutantes presentan una mayor longitud del hipocotilo comparado con las plantas WT cuando crecieron en fotoperíodos cortos que bajo fotoperíodo largos (Fig. 3.3.5).

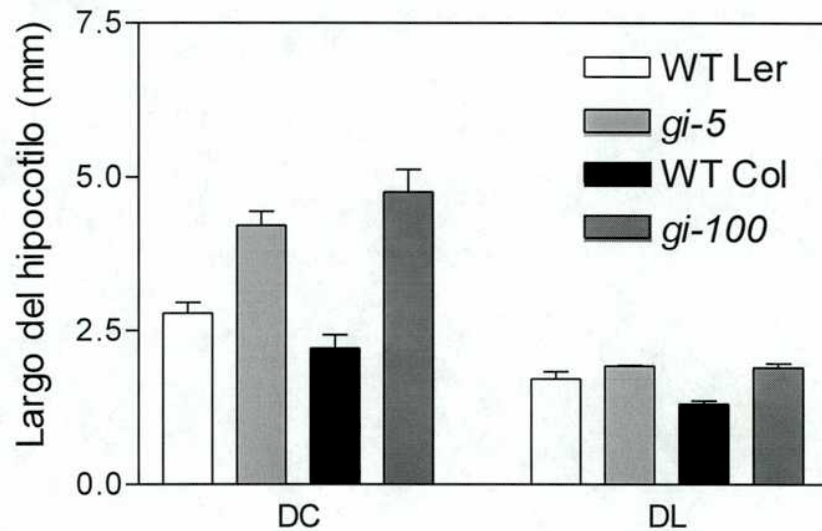


Figura 3.3.5: Efecto del fotoperíodo sobre el crecimiento del hipocotilo en distintos alelos del mutante *gi* y en plántulas WT. Los datos son el promedio y e.e. de 9 réplicas. Efecto de la mutación *gi* en el ritmo de sensibilidad a la luz

Efecto de la mutación *gi* en el ritmo de sensibilidad a la luz

El gen *GI* está involucrado en los ritmos circadianos y en la inducción de la floración por la vía fotoperiódica (Park *et al.*, 1999). Los defectos que confiere la mutación *gi* en los ritmos circadianos lo definen como un componente en las señales de entrada de los ritmos circadianos entre los que se encuentra también la luz.

Para investigar si los efectos de la mutación en la apertura de los cotiledones está mediada por alteraciones en la regulación del ritmo de sensibilidad a la luz, se expusieron plántulas etioladas de *gi-5* y WT a pulsos de RL dados en diferentes momentos del día. El tiempo 0 en la (Fig. 3.3.6) corresponde las 24:00 del día en que las semillas germinan 40 horas después de haber sido transferidas de 4 °C a 22 °C. Las plántulas permanecieron en oscuridad durante un período variable, fueron expuestas a cinco pulsos de RL (uno cada hora en forma continuada) y volvieron a oscuridad por 48 horas para medir la distancia entre los cotiledones utilizando una lupa y regla milimetrada. Los tiempos en la figura 3.3.6 corresponden al centro del período de 5 horas en que las plántulas recibieron los pulsos

horarios. Si bien las plántulas estaban en oscuridad salvo por los pulsos de RL, las semillas fueron expuestas a 11 horas de luz R que sincronizarían los ritmos, de modo que al período de 11 horas equivalente al horario de irradiación de las semillas se lo denomina “día subjetivo” en los períodos sucesivos. Excepto para las plántulas muy jóvenes, en que los pulsos parecen tener poco efecto, el efecto de los pulsos de RL mostró una oscilación rítmica con picos máximos en el momento correspondiente al atardecer subjetivo(18 h, 42 h) y antes del comienzo del día subjetivo (26 h, 50 h), mientras que los mínimos ocurrieron comenzada la noche subjetiva (22 h, 46 h). El *gi-5* mostró menor respuesta que el WT en términos de apertura de los cotiledones pero las oscilaciones siguieron exactamente el mismo patrón que el WT. Estos resultados indican que GI tendría un efecto general en la señalización del phyA independiente de su efecto en el reloj circadiano (Fig. 3.3.6).

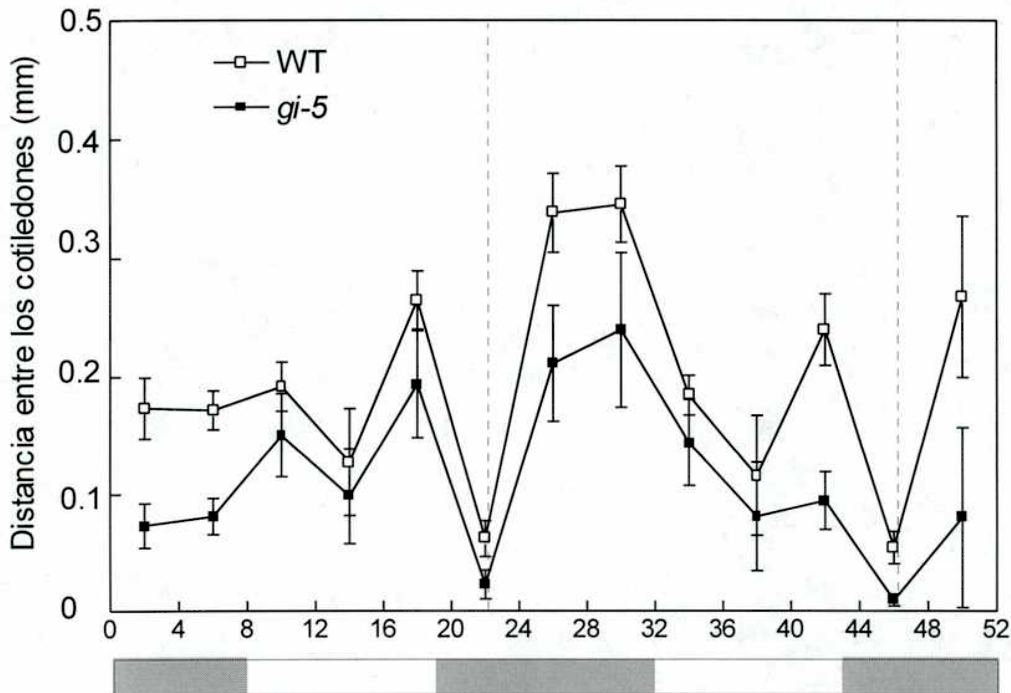


Figura 3.3.6: Ritmo de sensibilidad a la luz. Las barras grises representa la noche subjetiva (el pulso de luz llega durante la fase típica de noche en el ambiente natural) y la barra blanca al día subjetivo (el pulso de luz llega durante la fase típica del día en el ambiente natural). El mutante *gi* tiene menor respuesta que el WT pero presenta el mismo patrón de variación de sensibilidad a la luz. Los datos son el promedio y e.e. 9 réplicas.

Efectos de la sobreexpresión del gen *GIGANTEA* en la des-etiolación

La sobreexpresión de *GI* en el mutante nulo *gi-11* (que carece de la proteína endógena), restablece la floración de manera similar al WT en días largos (Fowler *et al.*, 1999). Con el propósito de investigar si las plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *GI* fusionado a un promotor viral fuerte (35S: *GI*) restablecen el fenotipo WT en la des-etiolación, se expusieron plántulas del mutante *gi-11*, las sobreexpresantes y el WT a pulsos de RL, RL continuo y pulsos R. Se observó que la línea transgénica utilizada recupera la función del gen normal en las respuestas donde el mutante *gi* responde deficientemente es decir en pulsos de RL y pulsos de R. (Fig. 3.3.7).

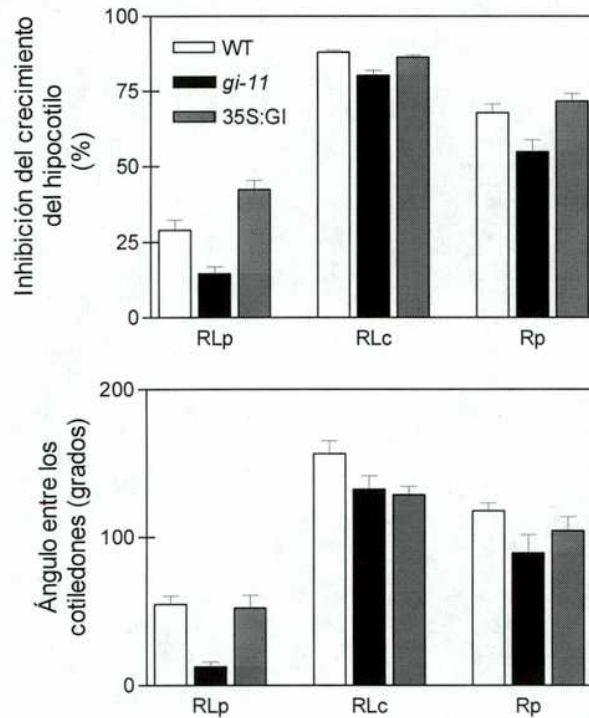


Figura 3.3.7: Efectos de la sobreexpresión de *GI* en la des-etilación en respuesta a pulsos de RL, RL continuo y pulsos de R. Los datos son el promedio y e.e. de 9 réplicas.

¿*Gigantea* es un componente específico en la vía de señalización del *phyA*?

Los datos fisiológicos obtenidos en esta parte de la tesis le confieren a *GI* un rol dentro de la vía de señalización del *phyA*. No obstante para responder esta pregunta se necesita obtener el doble mutante *gi-5 phyA* para poder testear la dependencia del fenotipo del mutante *gi* con la presencia de un *phyA* funcional. Para la obtención del doble mutante se cruzaron plantas del mutante *gi-5* con plantas del mutante de *phyA*. Se analizó la segregación de la F² en RL continuo condición que permite seleccionar los homocigotas para la mutación *phyA* por ser plántulas que presentan hipocotilos altos y cotiledones cerrados bajo ese tratamiento lumínico. Todas las plántulas seleccionadas se transplantaron a macetas con tierra y se las hicieron crecer en cámara de cultivo con fotoperíodos largos. Para poder evaluar la homocigocidad *gi-5* las plantas de la F² deben chequearse por PCR debido a la falta de segregación que se observa en las plantas adultas de la F² para la mutación *gi-5 gi-5*. En la actualidad se están haciendo las extracciones de ADN de las plantas F² a fin de seleccionar el doble homocigota mutante *gi-5 phyA*. Una vez seleccionado el doble mutante se secuenciará el producto de PCR a fin de corroborar que contenga la secuencia del alelo *gi-5*.

3.4 Aislamiento y caracterización de nuevos mutantes que afecten las respuestas VLRF.

En forma adicional a la caracterización de los modos de acción del phyA en mutantes de transducción de señales previamente identificados, en este capítulo de la tesis se buscó caracterizar nuevos mutantes de *Arabidopsis thaliana* que afecten las VLFR y HIR. La estrategia para obtener dichos mutantes consistió en cultivar plantas mutagenizadas de *Arabidopsis thaliana* bajo pulsos horarios de RL. Esta estrategia permite inducir el VLFR del phyA.

Aislamiento del mutante *eve2*

Siguiendo el protocolo descrito se identificó a partir de una población de semilla mutagenizada (M2) con EMS (LEHLE SEES) de *Arabidopsis thaliana* perteneciente al ecotipo Columbia, mutantes que presentaran hipocotilo corto y cotiledones muy abiertos en pulsos de RL. Se eligió el ecotipo Columbia porque en este fondo genético las respuestas VLFR son reducidas (Yanovsky *et al.*, 1997). En un primer paso se seleccionaron aproximadamente 50 candidatos. Sin embargo un análisis posterior reveló que sólo uno de ellos presentaba hipocotilo corto y cotiledones muy abiertos en pulsos de RL: el mutante *eve2* (del inglés *enhanced very-low-fluence responses 2*), que en una primera aproximación tendría las respuestas VLFR mayores que el WT y aparentemente respuestas normales en el HIR (Fig. 3.4.1).

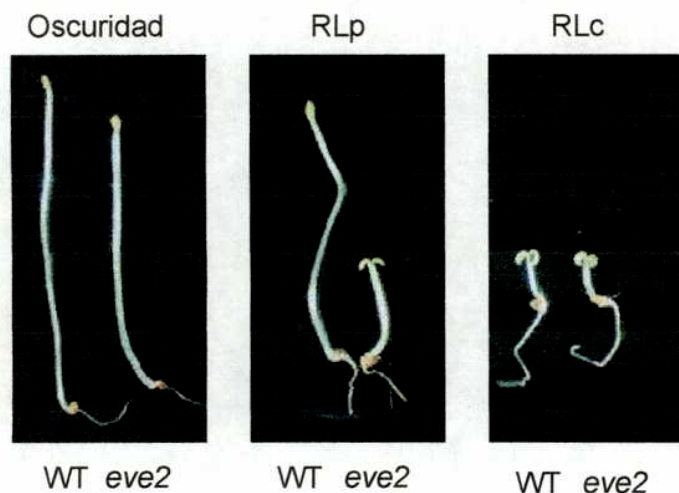


Figura 3.4.1: Fenotipo del mutante *eve2* y de plántulas WT de *Arabidopsis thaliana* crecidas en oscuridad, RLp y RL continuo.

CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DEL MUTANTE *eve2*

En *eve2* el VLFR esta aumentado pero las respuestas a bajo flujos, LFR no están afectadas

Las respuestas VLFR y LFR están relacionadas con la proporción de Pfr respecto al fitocromo total, es decir al Pfr/P, establecidos por el tratamiento lumínico (Casal *et al.*, 1998). Cuando las plantas son expuestas a niveles crecientes de Pfr/P se observa una curva bifásica. La primera fase corresponde al VLFR (0-10% Pfr/p) y la segunda fase al LFR (30-87% Pfr/P). El hipocotilo del mutante *eve2* es pues un poco más corto en oscuridad comparado con el WT pero la primera parte de la curva (VLFR) fue significativamente más pronunciada en el *eve-2* que en el WT (Fig. 3.4.2a). Este aumento en el VLFR de la longitud del hipocotilo también fue obvio cuando la longitud fue expresada en términos absolutos (reducción causada por el RLp que provee una proporción de Pfr/P = 10% comparado con la oscuridad: WT = 3.6 mm \pm 0.26, *eve2* = 5.42 mm \pm 0.34). El VLFR de la apertura de los cotiledones también fue exagerado en el mutante comparado con el WT (Fig. 3.4.2 b). La zona correspondiente al plateau (Pfr/P entre el 10 % y el 33 %) determinado por el VLFR está aumentada en el *eve2*. No se observaron diferencias en la zona del LFR dado que las pendientes son similares (Fig.2 a, b).

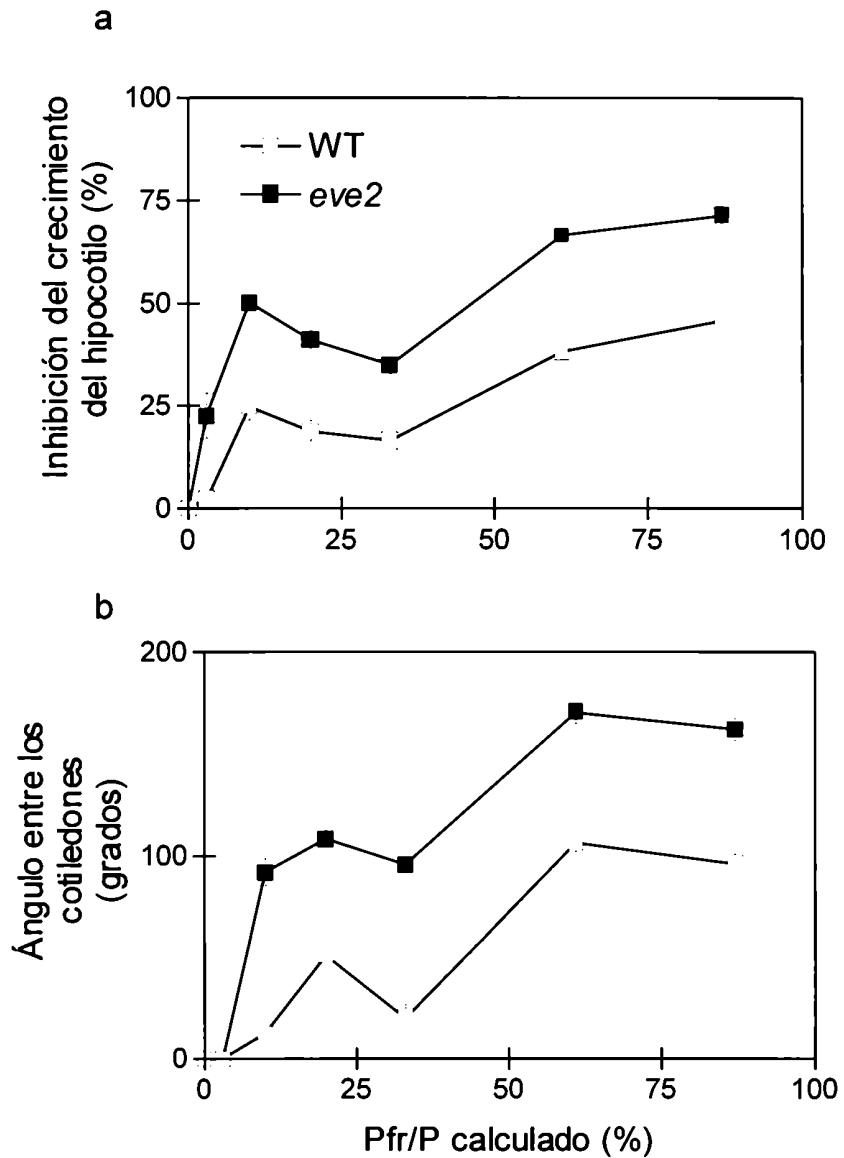


Figura 3.4.2: El VLFR está aumentado en el mutante *eve2*, sin afectar el LFR. a) Inhibición del crecimiento del hipocotilo comparado con los controles de oscuridad. b) Ángulo entre los cotiledones, en función de la proporción de fitocromo en la forma activa (Pfr) obtenida con pulsos horarios de R/RL.

Efectos de la mutación *eve2* sobre la respuesta a pulsos de RL separados por intervalos de oscuridad de distinta duración.

Como se explicara en el capítulo 3.2, el VLFR y el HIR pueden ser fotobiológicamente separados en dos fases discretas en respuesta a la inducción del *phyA* con pulsos de RL separados por intervalos de oscuridad de distinta duración (Casal, 2000). Las plantas fueron expuestas a pulsos de RL (3 min.) por intervalos de oscuridad de distinta duración desde luz continua (donde el intervalo de oscuridad es nulo) a 4 h 57 min. de oscuridad entre pulsos. Se observó que a medida que aumenta el intervalo de oscuridad disminuye la inhibición en el crecimiento del hipocotilo y el ángulo entre los cotiledones. La curva que se obtiene tiene dos fases, una que requiere pulsos muy frecuentes de RL (HIR) y otra que se satura a una baja frecuencia de pulsos de RL (VLFR) (Casal, 2000). La respuesta del mutante fue mayor en el VLFR (45-360 min.) mientras que las diferencias no aumentaron con el HIR (0-27 min.) (Fig. 3.4.3).

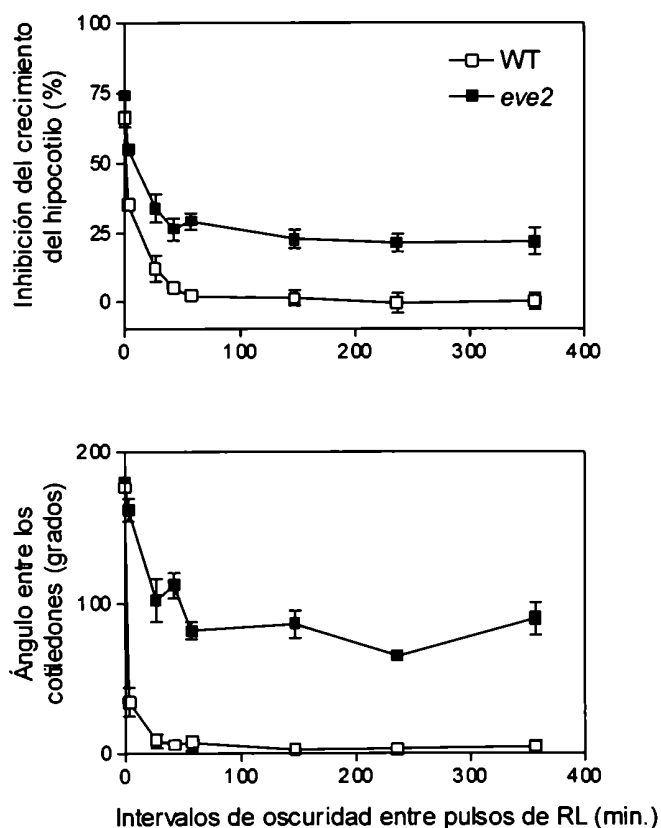


Figura 3.4.3: La mutación *eve2* aumenta el VLFR pero no el HIR: Inhibición del crecimiento del hipocotilo y ángulo entre los cotiledones (comparando con el control en oscuridad) en función de la duración de los intervalos de oscuridad entre pulsos sucesivos de RL (3 min. $20\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

Efectos comparativos de pulsos de RL *versus* RL continuo

La luz RL continua 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 reciprocidad cuando se compara con pulsos horarios que proveen la misma cantidad total de fotones (Casal, et al., 1998). Para analizar esta respuesta los distintos genotipos fueron expuestos a pulsos de RL de 3 min. por hora o RL continuo durante 3 días, de manera tal que la cantidad de fotones recibidos por hora por las plántulas fuera el mismo. Tanto para las plántulas WT como el mutante *eve2* el RL continuo fue más eficiente en la inhibición del crecimiento del hipocotilo y en la apertura de los cotiledones y no se observaron diferencias entre los genotipos. (Fig. 3.4.4). El mutante *eve2* mostró una mayor respuesta a los pulsos de RL que WT tanto para la inhibición del crecimiento del hipocotilo como en la apertura de los cotiledones. En otras palabras el mutante *eve2* exagera las respuestas a los pulsos de RL (VLFR) pero no las diferencias entre RL continuo y los pulsos de RL (HIR).

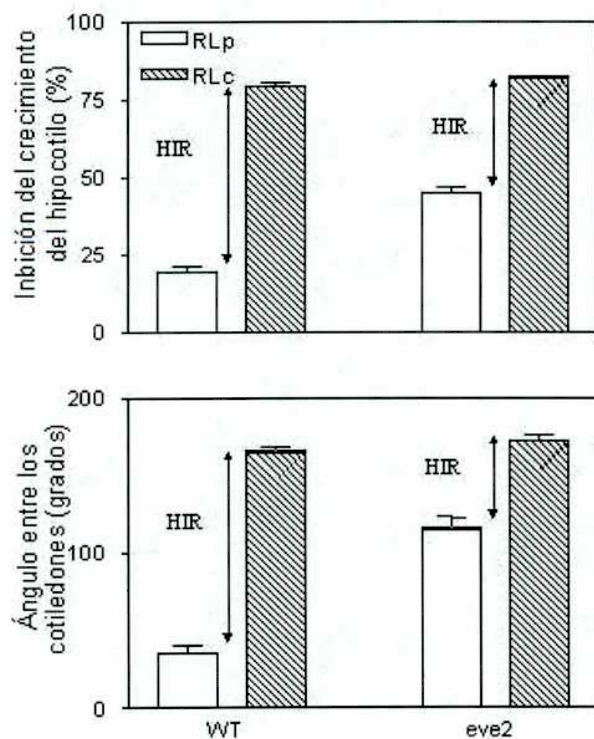


Figura 3.4.4: Efectos de RLp (3min. por hora: $16,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) comparados con RLc ($0,825 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con el mismo flujo total. a) Inhibición del crecimiento del hipocotilo comparado con el control de oscuridad. b) Ángulo entre los cotiledones. Los datos son el promedio y e.e. de 9 réplicas.

Respuesta de *eve2* a distintos flujos de RLc

Para investigar en mayor detalle el HIR cuya característica distintiva es la fuerte dependencia a los altos flujos de RL, se analizaron las respuestas a irradiancias crecientes de RL continuo. Se observaron diferencias entre el mutante *eve2* y el WT tanto en la inhibición del crecimiento del hipocotilo como en la apertura de los cotiledones a bajos flujos de RL continuo. A altos flujos de RL continuo no se observan diferencias. Esto estaría indicando que la mutación *eve2* aumenta las respuestas del VLFR sin alterar las HIR. Como se observó en el experimento con pulsos de RL separados por intervalos de oscuridad de distinta duración el mutante *eve2* no afecta el HIR pero las respuestas del mutante *eve2* con distintos flujos de RL continuo pareciera que el efecto positivo de la mutación se extiende a flujos de $1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y a este flujo el WT muestra una respuesta de tipo HIR, pareciera como que la mutación *eve2* estaría afectando la transición del VLFR al HIR (Fig. 5 a, b). A primera vista, los resultados parecen consistentes con los experimentos en que VLFR y HIR se separaban sobre la base de la frecuencia de los pulsos (Fig. 3.4.3 y 3.4.4), es decir el VLFR es aumentado y en la zona del HIR las diferencias en lugar de incrementarse caen (Fig. 3.4.5). Sin embargo, la observación más detallada de la curva de respuesta de la inhibición del hipocotilo a los flujos revelan un efecto sobre la fase inicial del HIR que no era obvio en los experimentos anteriores (Fig. 3.4.5a).

En efecto, la diferencia entre el WT y *eve2* en términos de inhibición del hipocotilo estaría establecida para $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y no en $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ indicando que en esta zona ya se está en el máximo del VLFR. Sin embargo, la diferencia se encuentra entre 0.1 y $1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, que dado que el VLFR ya estaba aparentemente saturado, correspondería al HIR. Dado lo curioso de esta observación, el experimento fue repetido en varias ocasiones con resultados consistentes y la precisión de los datos justifica la elucubración. No es posible un análisis similar para el ángulo entre los cotiledones dado que por la forma de la curva no es posible discernir cuando se trata de VLFR y cuando de HIR entre 0.1 y $1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. La conclusión de estos experimentos es que el efecto del *eve2* tan específico para las VLFR del *phyA*, idea que se enfatiza con los resultados presentados más adelante.

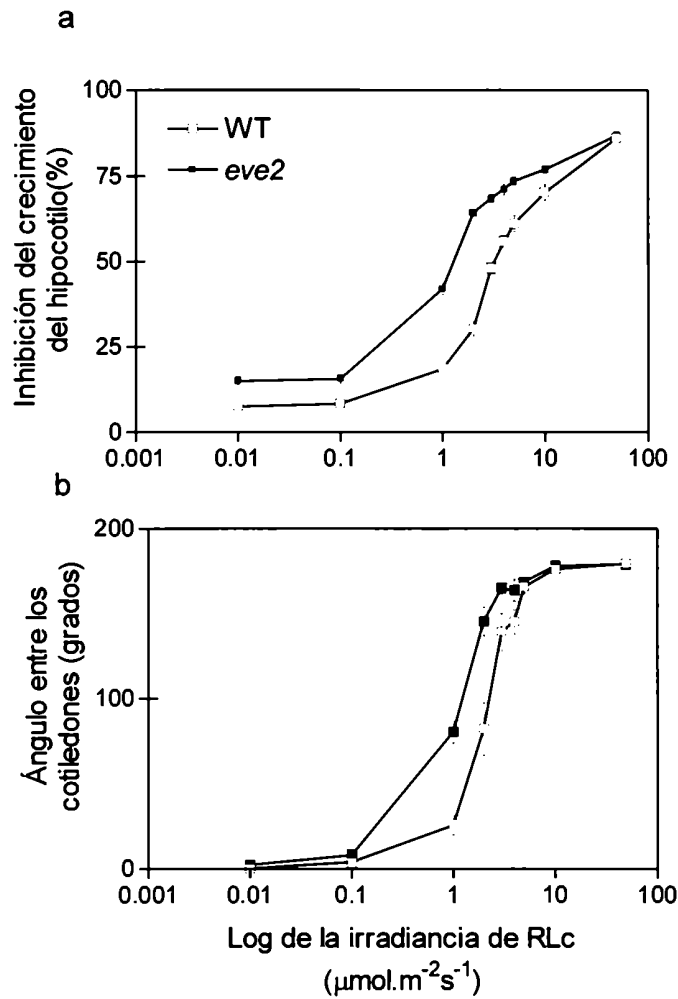


Figura 3.4. 5: El mutante *eve2* afecta la transición del VLFR al HIR. Respuesta a diferentes flujos de irradiancia de RLC. a) Inhibición del crecimiento del hipocotilo. b) Apertura entre los cotiledones. Los datos son el promedio y e.e de al menos 16 réplicas.

Contenido de clorofila y síntesis de antocianas bajo RL

Se midieron los niveles de clorofila y antocianas en plántulas que crecieron bajo pulsos de RL o bajo RL continuo, respuestas donde participa el *phyA*. El mutante *eve2* no presenta diferencias con el WT tanto para el bloqueo de la síntesis de clorofila como en la síntesis de antocianas. (Fig. 3.4.6 a, b).

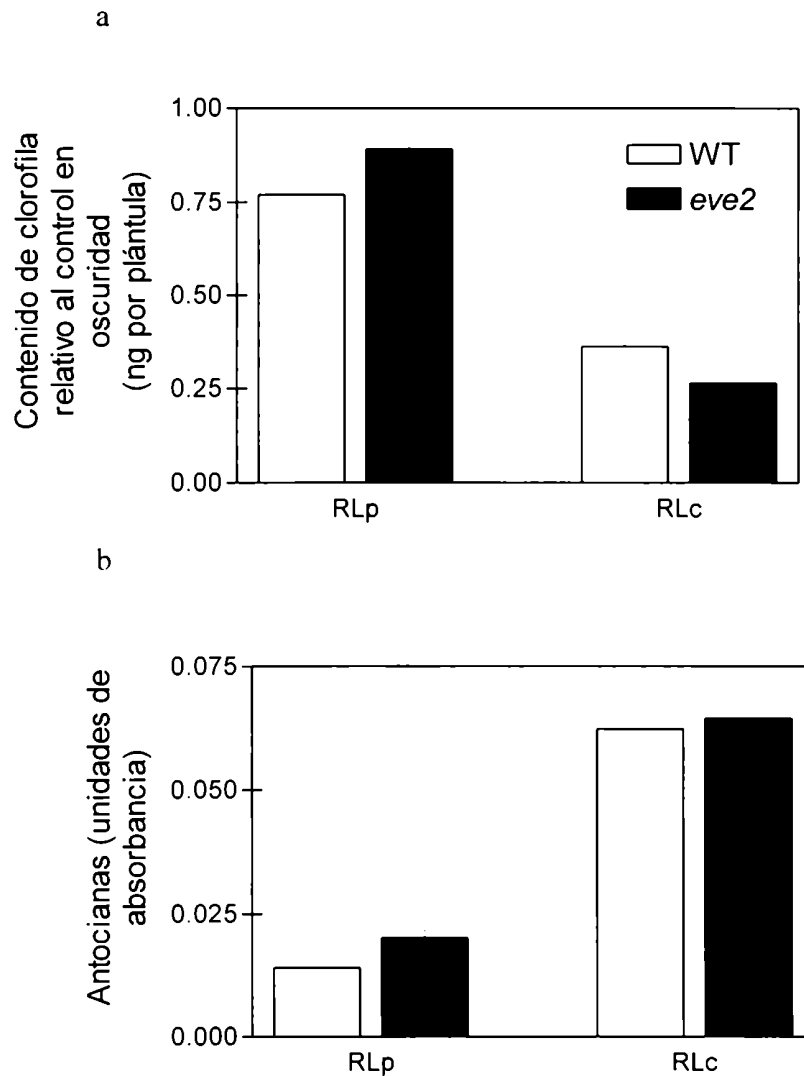


Figura 3.4.6: La mutación *eve2* no afecta el bloqueo en la síntesis de clorofila ni el contenido de antociana. a) Contenido de clorofila. b) Síntesis de antocianas.

Fenotipo de la planta adulta del mutante *eve2*

Comparando con el WT, el mutante *eve2* mostró estatura reducida tanto para las plantas que crecieron en invernáculo con fotoperíodo natural, como cuando crecieron en luz blanca continua en las cámaras de cultivo. (Fig. 3.4.7a, b).

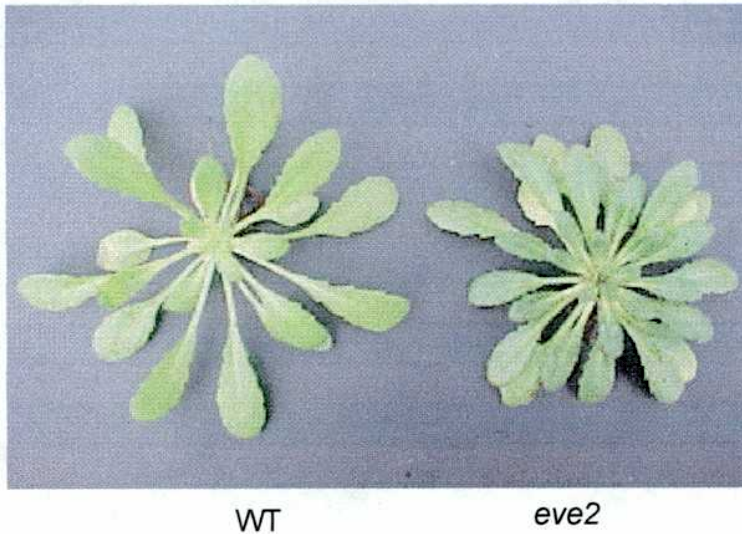


Figura 3.4.7a: Fenotipo de la roseta del mutante *eve2* y de la planta WT. Las plantas crecieron con fotoperíodo natural en invernáculo.

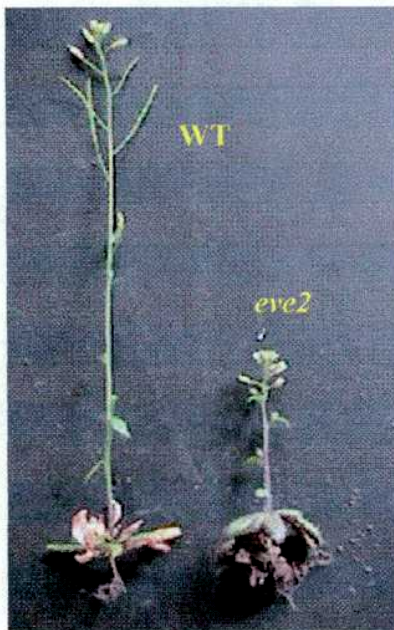


Figura 3.4.7b: Fenotipo de la planta adulta del mutante *eve2* y la planta WT. Las plantas crecieron en cámara de cultivo bajo luz blanca continua.

El enanismo y los VLFRs aumentados en *eve2* están genéticamente ligados

El enanismo de la planta adulta del mutante *eve2* puede ser el resultado de la misma mutación que causa el fenotipo en pulsos de RL o puede resultar de una segunda mutación. Para testear esta hipótesis, se cruzó la mutante *eve2* (fondo genético Columbia) con el WT Columbia y se analizó la generación F₂ tanto para el fenotipo en pulsos de RL durante la des-etiolación como el fenotipo de la planta adulta. El fenotipo de las plántulas F₁ que crecieron bajo pulso de RL resultó ser igual a de las plántulas con respecto a la longitud de los hipocotilos y apertura de los cotiledones WT ($EVE2\ EVE2 = 10.5\text{ mm} \pm 0.4$; $EVE2\ EVE2 = 0^\circ$; $EVE2\ eve2 = 11.5\text{ mm} \pm 0.4$; $EVE2\ eve2 = 12.31^\circ \pm 4.7$ y $eve2\ eve2 = 3.6\text{ mm} \pm 0.2$; $eve2\ eve2 = 110^\circ \pm 7.45$). En el estado adulto las plantas de la F₁ mostraron el mismo fenotipo que las plantas WT. Por lo tanto la mutación *eve2* es recesiva. Las plántulas de la generación F₂ fueron expuestas a pulsos de RL y se les midió la longitud del hipocotilo y el ángulo entre los cotiledones. Luego se transfirieron las plántulas a macetas y se las expuso a luz blanca continua. Las plantas adultas se clasificaron de acuerdo al fenotipo *eve2* o WT. Si la planta adulta y el fenotipo de la plántula no estuviesen genéticamente ligados, el crecimiento del hipocotilo y la apertura de los cotiledones bajo RLp debería ser similar para las plantas con fenotipo WT o *eve2* debido a la segregación independiente de las características. Sin embargo, comparando las plantas fenotípicamente normales con aquellas que poseían un fenotipo *eve2* adulto, estas últimas mostraron tener hipocotilos significativamente más cortos y cotiledones más abiertos bajo pulso de RL (Tabla 3.4.1).

Fenotipo adulto	largo del hipocotilo(mm)	Ángulo entre los cotiledones (grados)
WT	13.5 ± 0.79	58.6 ± 17.2
<i>eve2</i>	5.35 ± 0.48	104.6 ± 7.89

Tabla 1: Fenotipo adulto del mutante *eve2* (poca altura), correlaciona con el fenotipo de las plántulas en RLp (hipocotilo corto y mayor ángulo entre los cotiledones) en plántulas de la F₂ provenientes del cruzamiento entre plantas WT y el mutante *eve2*. Los datos son el promedio y e.e de 27 plántulas. Las diferencias entre el WT y el mutante *eve2* son significativas con un P<0.05.

Dependencia del fenotipo del mutante *eve2* del *phyA*

Para investigar si el fenotipo del mutante *eve2* depende del *phyA* funcional, se cruzó el *eve2* con el mutante nulo de *phyA-201*. Las semillas de la F₂ se expusieron a RL continuo de manera de seleccionar los mutantes homocigotas para *phyA* que presentan hipocotilo largo y cotiledones cerrados en esas condiciones lumínicas, luego todos los individuos seleccionados fueron transplantados a macetas y se cultivaron bajo luz blanca continua. El doble mutante homocigota para *eve2 phyA* se identificó por el fenotipo de la planta adulta que mostraba el fenotipo del mutante *eve2*. Se expusieron el doble mutante, los mutantes simples y el WT a pulsos de RL, pulsos de R y RL continuo, se midió el crecimiento del hipocotilo y el ángulo entre los cotiledones. La mutación *phyA* resultó epistática a *eve2*, en pulsos de RL, confirmando que los VLFRs aumentados de *eve2* dependían del *phyA* y en RL continuo. En R la mutación *eve2* fue efectiva aún en la ausencia de *phyA* comparando *phyA* y *phyA eve2*, es decir que en R *eve2* afecta la acción de otros fotorreceptores (posiblemente *phyB*) además de *phyA* (Fig. 3.4.8).

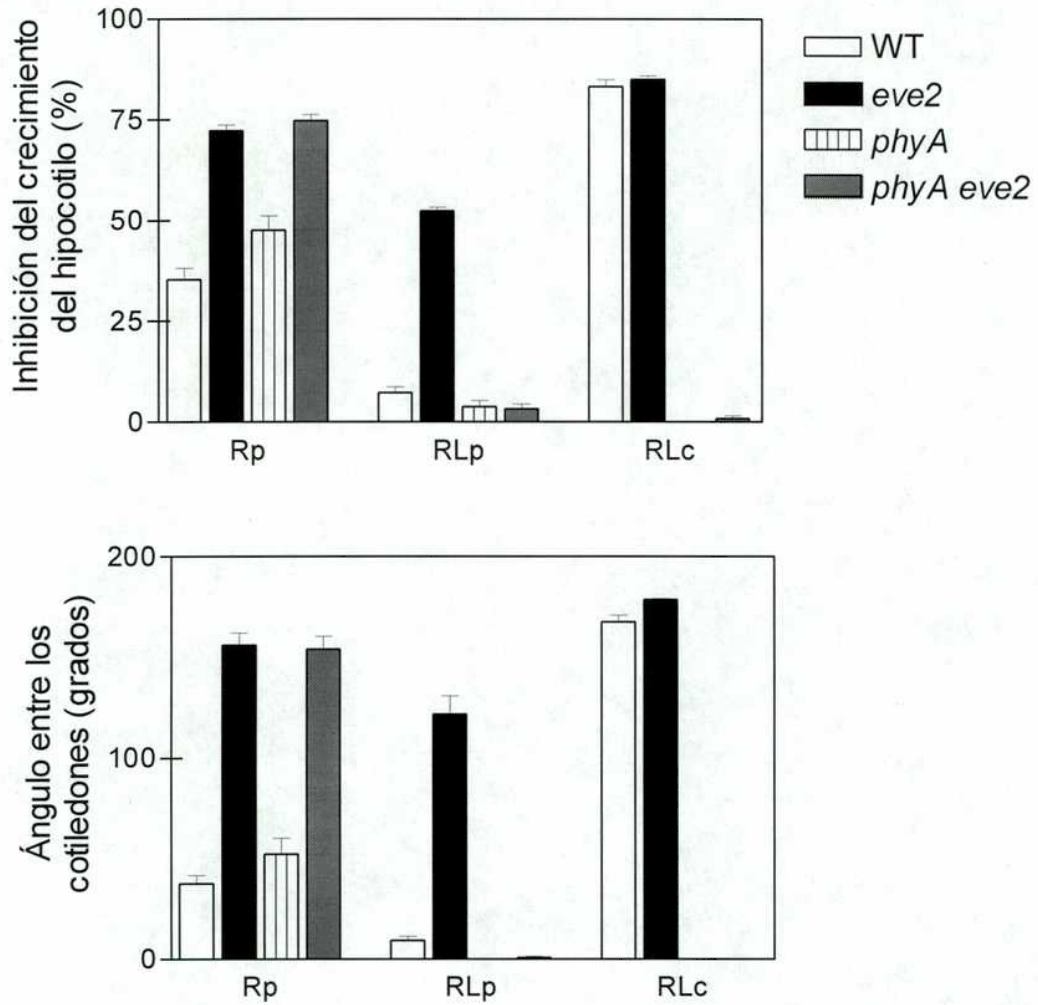


Figura 3.4.8: El aumento en el VLFR del mutante *eve2* requiere del *phyA*. Las plántulas de los distintos genotipos se expusieron a Rp, RLp y RLc. a) Inhibición del crecimiento del hipocotilo. b) Ángulo entre los cotiledones. Los datos son el promedio y el e.e. de 9 réplicas.

Niveles normales de phyA en *eve2*

Se ha demostrado que la sobreexpresión del phyA aumenta las respuestas al VLFR (Casal *et al.*, 1994, Clough *et al.*, 1995). Los niveles inmunológicos de phyA se midieron utilizando western blot. Utilizando anticuerpo monoclonal específico para phyA se puede detectar una banda similar a la esperada para el phyA (120 Kda) tanto en el mutante *eve2* como en el WT (Fig. 3.4.9).



Figura 3.4.9: Niveles normales de phyA en *eve2* comparado con el WT.

Respuesta del mutante *eve2* a distintas longitudes de onda en la des-etiolación

La luz blanca así como la radiación solar activan simultáneamente todos los fotorreceptores. Si bien los fotorreceptores operan independientemente sus vía de transducción interactúan entre sí (Casal y Mazzella, 1998, Neff y Chory, 1998). Se investigó por lo tanto el efecto de la mutación *eve2* en respuesta a diferentes longitudes de onda exponiendo las plantas a flujos altos ($30 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) o bajos ($0.01 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) de luz blanca continua (B), luz azul continua (A), RL continuo y R continuo. Se midió la longitud del hipocotilo y el ángulo entre los cotiledones. Se observó que el mutante *eve2* amplifica las respuestas a bajos flujos no sólo en RL sino también en luz A, R y B cuando se lo compara con las plántulas WT, tanto para el crecimiento del hipocotilo como en la apertura de los cotiledones (Fig. 3.4.10a, c). Sin embargo este efecto no se observa a flujos

altos donde el mutante *eve2* y el WT responden de manera similar para las distintas longitudes de onda tanto para el crecimiento del hipocotilo como en la apertura de los cotiledones, aunque el mutante *eve2* muestra una mayor respuesta a la luz R para la apertura de los cotiledones comparado con el WT (Fig. 3.4.10b, d).

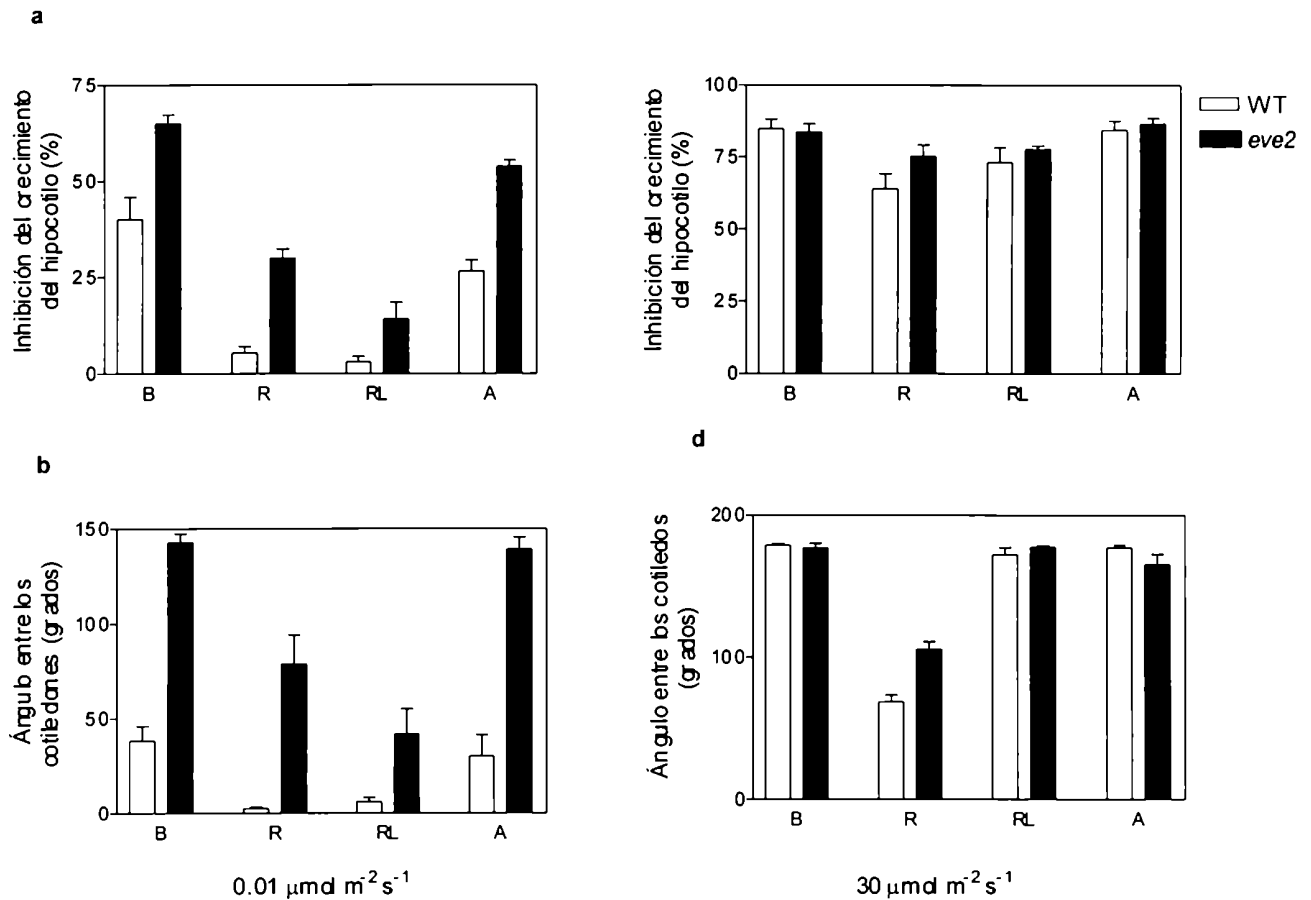


Figura 3.4.10: A bajos flujos de luz continua el mutante *eve2* amplifica las respuestas en las diferentes longitudes de onda, RL, R, B y A. a) Inhibición del crecimiento del hipocotilo a 0.01 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$. b) Inhibición del crecimiento del hipocotilo a 30 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$. c) ángulo entre los cotiledones a 0.01 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$. d) ángulo entre los cotiledones a 30 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los datos son el promedio y e.c de 12 réplicas.

Efectos de la mutación *eve2* en respuesta a distintos flujos de luz azul

El *phyA* y *cry1* son los principales fotorreceptores involucrados en la des-etiolación en respuesta a la luz azul (Whitelam *et al.*, 1993). Para analizar este efecto y dado que el mutante *eve2* muestra una respuesta exagerada en luz azul, se investigó con mayor detalle el efecto observado por la mutación exponiendo el mutante *eve2*, el mutante simple de *phyA*, el doble mutante *phyA eve2* y plántulas WT a distintos flujos de luz azul. Se midió el crecimiento del hipocotilo y el ángulo entre los cotiledones. A bajos flujos de luz azul (entre 0.04 y 0.2 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$) la mutación *phyA* es epistática a *eve2*, es decir que el efecto de la mutación *eve2* se pierde en el doble mutante *phyA eve2*. No obstante, a flujos intermedios *eve2* tiene efectos aún en ausencia de *phyA* (*phyA versus phyA eve2*), lo que indica que a estos flujos *eve2* afecta las señales mediadas por otros fotorreceptores del azul (Fig. 3.4.11a, b).

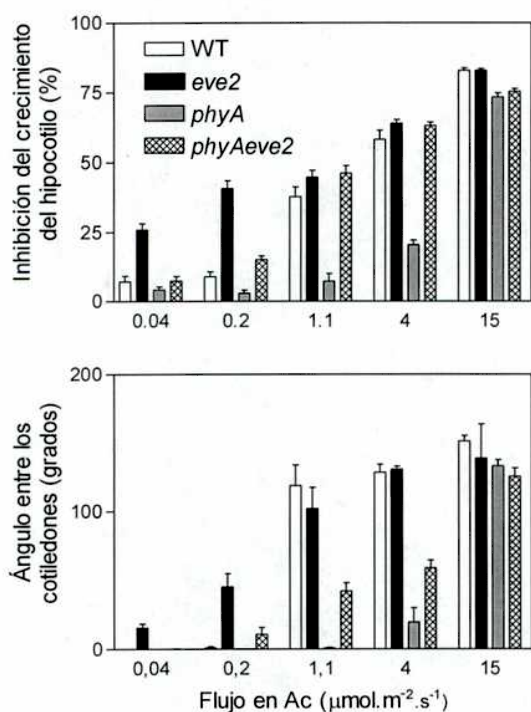


Figura 3.4.11: Las respuestas del mutante *eve2* a bajos flujos de luz azul están mediadas por el *phyA*. a) Inhibición del crecimiento del hipocotilo. b) Ángulo entre los cotiledones. Los datos son el promedio y e.e. de 9 réplicas.

Mapeo del *eve2*

Como el mutante *eve2* posee fondo genético Columbia, el primer paso para poder mapear la mutación consistió en generar una población (F₂) descendiente del cruzamiento del ecotipo Landsberg *erecta* con el mutante *eve2*. Una vez generada la población de mapeo se debió encontrar un evento de recombinación mediante la utilización de marcadores moleculares que permita identificar en qué cromosoma se localiza la mutación. De esta manera el locus *EVE2* se localizó en el brazo superior del cromosoma 5 con un 10.6% de recombinación con el marcador molecular *nga225*.

En el cromosoma 5 se localiza el mutante *shl5* ligado al marcador *nga 225* con un porcentaje de recombinación de $\pm 1,3$ (Pepper *et al.*, 2001) este mutante es recesivo e hipersensible a bajos flujos de luz. El análisis de complementación permitió verificar que el mutante *eve2* no es alélico al *shl5*. Tampoco es alélico con otros mutantes de la cadena de transducción del *phyA* que exageran las respuestas en RL como *spal* que mapea en el cromosoma 2 y *eid1* en el cromosoma 4. Como el mutante *shl5* es hipersensible a bajos flujos de RL, se expusieron las plántulas de los dos mutantes en pulsos de RL y se observó que el fenotipo del mutante *shl5* comparado con el mutante *eve2* no exagera las respuestas en pulsos de RL, en otras palabras el mutante no presenta VLFR aumentado (Fig. 3.4.12).



shl5 *eve2*

Figura 3.4.12: El mutante *shl5* no tiene el VLFR aumentado. Fenotipo del mutante *shl5* y del *eve2* en RLp

DISCUSIÓN

El crecimiento y desarrollo de las plantas está controlado por señales provistas por el ambiente luminoso circundante. Este control está mediado por un sofisticado sistema de fotorreceptores dentro de los cuales la familia de los fitocromos cumple un rol particular. En esta tesis se describen nuevos componentes genéticos de la regulación de la sensibilidad de las respuestas a la luz mediadas por el phyA, a partir de la caracterización fisiológica y genética de mutantes. Algunos de los mutantes estudiados eran encontrados por su efecto sobre la acción del phyA, pero no se sabía si afectaban el VLFR y/o HIR como el mutante *spa1*, otros eran conocidos pero no habían sido vinculados al phyA como los mutantes *cp3* y *gi*. Finalmente el *eve2* es un nuevo locus identificado en esta tesis. La tabla 1 muestra en forma resumida los procesos en los cuales están involucrados los mutantes caracterizados en esta tesis.

El mutante *cp3* aumenta el VLFR

El mutante *cp3* presenta un VLFR aumentado. Este fenotipo requiere de phyA y no resulta de niveles mayores al normal de la proteína PHYA (Fig.3.1.7) o de la reversión de phyA en oscuridad (ya que el WT Landsberg erecta no muestra reversión en oscuridad de Pr a Pfr detectable, Hennig et al, 1999). De esta manera, *cp3* estaría afectado en el camino de señalización de phyA. Ya han sido descritos mutantes con respuestas aumentadas mediadas por phyA (*spa1*, *eid1* y *rep1*) (Hoecker et al., 1999; Buche et al., 2000; Soh et al., 2000). Estos mutantes, sin embargo, afectan el HIR de phy A mientras que *cp3* es, hasta el momento, el único mutante disponible que aumenta el VLFR de phyA sin afectar el HIR de phyA o las respuestas mediadas por phyB. Este mutante no afecta algunas respuestas donde participa el phyA, como la síntesis de antocianinas (Fig. 3.1.5) Trabajos previos han mostrado que el VLFR puede ser genéticamente (Yanovsky et al., 1997; 2000) y molecularmente (Cerdán et al., 2000) diferenciados del HIR. El VLFR aumentado observado en *cp3* indica que la cascada de señalización iniciada bajo la excitación transiente de phyA puede ser regulada de forma independiente del camino de señalización que específicamente requiere la activación sostenida de phyA. CP3 podría ser un regulador negativo del camino de señalización de phyA vía el VLFR (directa o indirectamente, por

medio de la producción de un regulador negativo) o una molécula señalizadora intrínseca que no tenga el/los domino/s necesarios para su acción de regulación negativa. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que CP3 sea un intermediario que presente una mutación en su sitio catalítico que le confiere mayor actividad. El fenotipo intermedio de las plántulas CP3 cp3 bajo pulsos de RL sugiere que la abundancia de CP3 podría ser importante para ajustar finamente las respuestas del VLFR.

El mutante *spa1* aumenta las respuestas VLFR y HIR

Estudios genéticos previos en *Arabidopsis thaliana* demostraron que el locus SPA1 codifica un regulador negativo en la vía de señalización del phyA, cuya mutación (*spa1*) provoca un aumento en la sensibilidad de las plántulas en RL continuo y R continuo (Hoecker et al. 1998; Hoecker y Quail 2001). El mutante *spa1* afecta las respuestas del VLFR y HIR, pero el efecto de la mutación es mucho más pronunciada en el VLFR (Fig. 3.2.2a, b). Este aumento en el HIR es consistente con el aumento observado en la amplificación de la respuesta del phyB mediada por el phyA (Fig. 3.2.4). Los resultados sugieren que la mutación *spa1* aumenta tanto las respuesta de HIR como las VLFR. De esta manera, desde el punto de vista de las ramas de señalización afectadas SPA1 la contraparte de otro componente de la señalización del phyA, FHY1, un regulador positivo que participa tanto VLFR como en el HIR (Yanovsky et al. 2000). Sucede lo contrario con FHY3 que sólo afecta las respuestas HIR (Yanovsky et al. 2000). La mutación *spa1* produce una disminución en la pendiente de la curva de respuesta a la cantidad de Pfr/P en la zona del LFR tanto para la inhibición del crecimiento del hipocotilo como para la apertura de los cotiledones (Fig. 3.2.3a, b), la reducción que se observa en la respuesta podría ser una consecuencia del aumento que produce la mutación *spa1* en el VLFR (Mazzella et al., 1997; Cérdan et al., 1999). Este efecto también se observa en el mutante *eve1* (Luccioni et al.; 2002). Los datos con el doble mutante *spa1 phyA*, indican que los efectos del SPA1 sobre las respuestas mediadas por el phyB dependen exclusivamente del phyA (Hoecker et al. 1998). Cuando el phyA actúa vía VLFR regula negativamente la vía de señalización del phyB (Mazzella et al. 1997). Comparando con los loci VLF1 y VLF2 que muestran un aumento en la respuesta para el VLFR sin alterar el LFR (Yanovsky et al., 1997), esto

sugiere que el VLF1 y el VLF2 operan río abajo del EVE1 y el SPA1 o en vías diferentes de señalización. Mientras que el mutante *eve1* aumenta las respuestas del VLFR y disminuye las HIR (Luccioni et al., 2002) el mutante *spa1* aumenta tanto el VLFR como el HIR. En base a los resultados obtenidos se puede especular la función del SPA1 en la señalización de la luz. Dos tipos de evidencias sugieren que una mutación en el gen SPA1 puede aumentar la permanencia del phyA en la señalización. En primer lugar un pulso infrecuente de RL (cada 6 horas) es suficiente como para inducir un aumento en el VLFR en el mutante *spa1* (Fig. 3.2.2a, b). En segundo lugar el estudio de la cinética de la tasa de crecimiento del hipocotilo mostró que el mutante *spa1* reduce la tasa de crecimiento con altos flujos R continuo más allá del período de tiempo en que el phyA está presente en niveles normales (Parks et al. 2001). Esto es consistente con la observación que las plántulas retienen el fenotipo de la mutación *spa1* con altos flujos de R continuo (Hoecker et al. 1998). Pueden al menos plantearse las siguientes hipótesis tres modos no mutuamente excluyentes para la función del SPA1 con respecto a la disminución del phyA en la señalización de la luz (Fig. 1) (Baumgardt et al., 2002). Una posibilidad atractiva sería que SPA1 aumentara la inactivación del Pfr del phyA por reversión en oscuridad o por degradación. Sin embargo, no se observan diferencias en los niveles del phyA o en la cinética de degradación entre el mutante *spa1* y el WT (Hoecker et al. 1998), como argumento en contra de este modelo. No obstante, si sólo un subconjunto del total de phyA estuviera activo en la señalización (por ej. en la localización nuclear del phyA, (Kircher et al., 1999) el SPA1 mediaría las diferencias en los niveles de esa porción de phyA que probablemente no se detecta cuando se analiza el contenido total de phyA. Análisis posteriores permitirán descartar completamente este modelo. Un modelo alternativo (modelo A), donde la presencia transiente del phyA puede inducir una mayor persistencia en la señalización que es inhibida por SPA1. La persistencia del phyA en la señalización ocurriría si el phyA activara proteínas que presenten mayor vida media y con más actividad que el phyA. SPA1 podría reprimir la persistencia de esta actividad en la señalización por degradación o inactividad de intermediarios de la señalización del phyA. Entonces la ausencia de inhibición en el mutante *spa1* causaría una mayor persistencia del phyA en la señalización. El estudio de la interacción entre el mutante *spa1* con otros componentes de la señalización del phyA podrán dar lugar a este modelo. Una tercera posibilidad sería que SPA1 requiera

la activación de la luz por parte del phyA para inhibir la cascada de señalización (modelo B). En este escenario, la actividad transciente del phyA puede causar la activación persistente del SPA1 y así inhibir en forma persistente la vía de señalización de la luz. Entonces el phyA específicamente activa a SPA1 en los niveles de transcripción no se correlaciona con la evidencia previa en relación a la abundancia del transcripto de SPA1 en R continuo que no es específica del phyA sino que también participan los otros fitocromos. (Hoecker et al. 1999). En el modelo B se favorece la idea que el phyA específicamente es necesario para la función represora del SPA1 y que por modificaciones post-transcripcionales activaran la proteína SPA1. Esta hipótesis es particularmente atractiva considerando la evidencia que SPA1 interactúa con COP1, un represor constitutivo de la señalización de la luz (Hoecker y Quail 2001). El phyA activaría al SPA que funcionaría como un inhibidor persistente en la señalización de la luz junto con COP1. Las plantas mutantes en *spa1* perderían la represión persistente y esta sería la causa del fenotipo exagerado que presentan en respuesta a la luz.

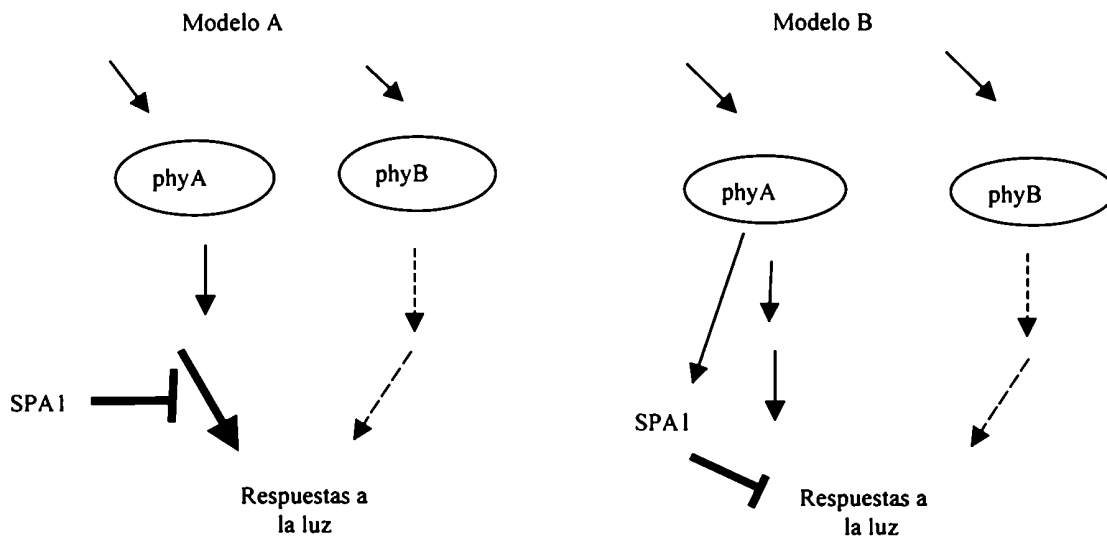


Figura 1: El esquema superior representa el modelo molecular no excluyente para explicar la función del SPA1 en la inhibición de la señalización del phyA. Las flechas y las líneas gruesas indican la función persistente del phyA en la señalización. Las flechas y líneas delgadas describen la función transciente del phyA.

El mutante *gi* sería un nuevo componente en la señalización del phyA

El polipéptido GI no tiene similitud con ninguna proteína conocida (Fowler et al., 1999; Park et al., 1999). Se localiza constitutivamente en el núcleo (Huq et al., 2000). El mutante *gi* fue originalmente aislado como un mutante de floración (Koorneef et al., 1991). Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que el mutante *gi*, presenta respuestas atenuadas en el VLFR. Si bien se observa una disminución en la des-etiolación en pulsos de R, las diferencias entre los pulsos de R y los pulsos de RL no aumentan. En otras palabras, la mutación *gi* no tiene efectos obvios sobre la señalización del phyB contrariamente a lo que proponían Huq et. al., (2000). Estos resultados sugieren que *gi* actuaría como un regulador positivo en la señalización del phyA sin afectar otras respuestas donde participa el phyA (ver tabla).

El gen *GI* está involucrado en los ritmos circadianos y en la inducción de la floración por la vía fotoperiódica (Park *et al.*, 1999). Entonces se estudiaron si los efectos de la mutación en la apertura de los cotiledones estaba mediada por alteraciones en la regulación del ritmo de sensibilidad a la luz por phyA. El reloj circadiano se basa en un sistema de retroalimentación negativa en el cual ciertos genes regulan negativamente su propia expresión lo que conduce a un sistema oscilatorio (Dunlap, 1999). La capacidad de un pulso de luz de generar una respuesta, por ejemplo la expresión de un gen, no es igual en cualquier momento del día (Yanovsky y Kay 2001). Esto indica que el reloj controla de alguna manera la capacidad en las plantas de responder a la luz y en consecuencia se establece un ritmo circadiano de sensibilidad a la luz, este fenómeno se conoce como “gating”. La expresión de algunos fotorreceptores y componentes de la cadena de transducción lumínica está regulada por el reloj. GIGANTEA es uno de estos casos, por eso nos preguntamos si el GI participaba en el “gating” del reloj por parte del phyA. Si bien la respuesta del mutante *gi* fue menor que en el WT a pulsos de RL dados en diferentes momentos del día ambos genotipos presentaron el mismo patrón de variación diaria de sensibilidad a la luz. Estos resultados sugieren que el efecto del GI en la señalización del phyA sería independiente de su rol en el reloj.

Como el *GI* participa en el control de las respuestas fotoperiódicas (Fowler *et al.*, 1999), se estudió el efecto de fotoperíodos cortos y largos sobre la longitud del crecimiento

del hipocotilo. Los distintos alelos del mutante *gi* presentan mayor longitud del hipocotilo que el WT en condiciones de fotoperíodos cortos que en fotoperíodos largos. Si bien los mutantes que afectan el reloj circadiano en fotoperíodos cortos responden más en el crecimiento del hipocotilo que en fotoperíodos largos, presumiblemente porque el momento de máxima sensibilidad a la luz esté desplazada hacia la etapa oscura del día (Yanovsky, datos no publicados). Los experimentos realizados con *gi-5* para medir el ritmo de sensibilidad a la luz sugieren que este no sería el motivo por el cual las plantas responden menos a fotoperíodos cortos.

***eve2*, un regulador negativo del VLFR en la vía de señalización del phyA**

El *eve2*, descubierto en este trabajo afecta las respuestas fotomorfológicas de un modo no descripto aún para ningún otro mutante. Dicho mutante fue encontrado siguiendo un protocolo de selección desarrollado en nuestro laboratorio, consistente en la búsqueda de plantas con evidencias morfológicas de des-etiolación mayor a la normal al ser expuestas a pulsos de RL. De acuerdo al protocolo que le dio origen, *eve2* muestra un VLFR mayor al normal observado en la línea isogénica WT (Columbia). En este aspecto se parece a las mutantes *cp3* y *spa1* descritos en esta tesis, aunque el grupo de procesos fisiológicos no es exactamente el mismo. Es interesante notar que el WT Columbia había sido caracterizado por poseer VLFR muy pobres comparado con la línea Landsberg erecta (Yanovsky et. al., 1997). Esta diferencia entre líneas o ecotipos es debida principalmente a dos loci polimórficos, VLF1 y VLF2 que se encuentran en los cromosomas II y V, respectivamente (Yanovsky et. al., 1997). Dado que *eve2* mapea en el cromosoma V, se pensó que *eve2* y VLF2 podrían ser el mismo locus. Sin embargo, esta idea fue descartada por dos motivos. El primero es que *eve2* y VLF2 en lugares cercanos pero no en el mismo lugar. El segundo motivo es que la cruce entre *eve2* y una línea de Columbia en que introgresé el locus VLF2 de Landsberg erecta mostró complementación (los padres abren los cotiledones bajo pulsos de RL, la F₁ no, datos no mostrados). Esto permite concluir que la debilidad de los VLFR en Columbia puede ser resultado por una mutación en el locus descripto.

Volviendo a la discusión sobre la fisiología de *eve2*, las características que lo distinguen es que el mutante exagera no sólo VLFR, sino también HIR y LFR y las respuestas mediadas por algunos fotorreceptores de luz azul.

El efecto sobre el HIR no resulta evidente cuando se analizan los efectos de la frecuencia a pulsos de RL (Fig. 3.4.3). Sin embargo, al estudiar la respuesta a distintos flujos de RL, resulta evidente (dada la precisión y repetitividad de los datos) que *eve2* también afecta positivamente la fase inicial de HIR. En efecto, luego del plateau del VLFR el *eve2* muestra mayor pendiente de respuesta entre 0.1 y 1 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 3.4.5), ya dentro del HIR. El mutante *eve2* provee una herramienta para estudiar en el futuro la transición entre el VLFR y HIR.

El efecto sobre el LFR tampoco resultó obvio en una primera observación, pues al comparar la pendiente del VLFR en el WT y el mutante *eve2* los valores son muy similares (Fig. 3.4.2). Sin embargo, al comparar en luz R el *phyA* con el doble mutante *phyA eve2* resulta evidente que este último responde mejor que *phyA* (Fig. 3.4.10). Nuestra interpretación de estas observaciones aparentemente contradictorias es la siguiente (Fig. 2) En las plantas WT, EVE2 inhibiría el VLFR de *phyA* y el LFR de *phyB*.

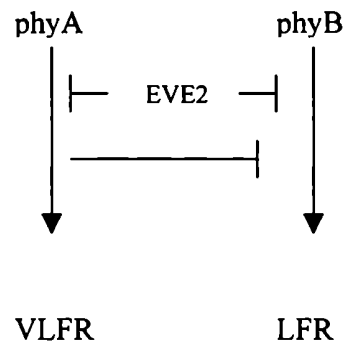


Figura 2: El esquema representa el modelo molecular para explicar la acción del EVE2 bajo pulso de R.

En pulsos de R ambas vías son activas y la señalización de *phyB* sería afectada en dos sentidos opuestos: uno directo negativo y otro positivo al regular negativamente al VLFR que en algún punto regula negativamente al LFR (Mazzella *et. al.*, 1997, Cerdán *et. al.*, 1999). El mutante *eve2* perdería estas dos vías de acción sobre el LFR sin que se haga evidente su efecto, probablemente porque ambas vías se contrabalancean (Fig. 2). En ausencia del *phyA*, el efecto negativo de la vía VLFR sobre la LFR tampoco está presente y al agregar la mutación *eve2* el único cambio sería la amplificación de la vía LFR. A primera

vista puede parecer fútil la existencia de estos mecanismos de regulación positiva y negativa contrabalanceadas. Sin embargo, algo similar ha sido observado para el circuito regulatorio formado por PKS1 y PKS2 (Lariguet *et. al.*; 2003). Estos circuitos proverían homeostasis al sistema (Lariguet *et. al.*; 2003).

Finalmente, el mutante *eve2* exagera las respuestas a bajos flujos de luz azul (Fig. 3.4.10). Como se sabe que el *phyA* media respuestas a la luz azul, nuestra primera interpretación fue que este fenotipo era una manifestación más de la alta sensibilidad a *phyA*. Sin embargo, el doble mutante *phyA eve2* continúa mostrando una des-etiolación considerablemente mayor a la normal bajo ciertos flujos de luz azul (Fig. 3.4.11). La conclusión original cedió paso a la idea que EVE2 no sólo afecta las respuestas VLFR de *phyA*, sino también las HIR de *phyA*, las LFR de *phyB* y las respuestas mediadas probablemente por *cry1*. De este modo, el mutante *eve2* se constituye en una herramienta que permitirá descubrir secretos de la conectividad entre las distintas vías de transducción de señales generadas por la luz.

Los resultados de esta tesis permitieron encontrar nuevos componentes en la regulación de las señales lumínicas mediadas por los fitocromos. Hasta el momento no se ha encontrado ningún componente que afecte todas las respuestas de las vías de señalización donde participa el *phyA*. Parte de la heterogeneidad que se manifiesta en la vía de señalización mediadas por los fitocromos se debe a que el *phyA* participa en las respuestas VLFR y HIR mientras que el *phyB* en las LFR. Si bien el *phyA* y *phyB* convergen controlando procesos en común, no compartirían la misma vía de transducción de señales. Los múltiples puntos de regulación permiten la generación de un sistema más versátil, el cual es esencial para que las plantas perciban las diferentes señales lumínicas del entorno. La versatilidad en las respuestas mediadas por el *phyA* pone de manifiesto la existencia de finos mecanismos de regulación que les permiten a las plantas responder en forma precisa a las señales del ambiente lumínico y en virtud de esa información ajustar el crecimiento y desarrollo ignorando cambios del ambiente que no constituyan verdaderas señales. Esto pone de manifiesto una intrincada red de interacciones entre las distintas vías de señalización que permite integrar la información proporcionada por múltiples sistemas fotosensoriales y las respuestas fisiológicas obtenidas.

Los mutantes *cp3*, *spa1* y *eve2* presentan alta sensibilidad a la luz, la actividad de estos genes podría estar controlada por el medio ambiente lumínico y/o la etapa de desarrollo, ayudando a ajustar la sensibilidad de la planta a la luz de acuerdo a la percepción de las condiciones del medio ambiente, los procesos fisiológicos, órganos, etc. Si bien no existen evidencias experimentales para determinar si la activación por parte del phyA de dos vías de transducción de señales distintas representa alguna ventaja adaptativa para las plantas, es posible realizar algunas conjeturas al respecto. La posibilidad del phyA de desencadenar el VLFR y HIR a través de dos vías de señalización diferentes permitiría una regulación fina de cada vía de señalización por separado. La percepción diferencial de las situaciones ambientales asociadas a las señales lumínicas en el rango del VLFR y HIR es de gran importancia para la supervivencia y el desarrollo de la planta. Por ejemplo, el hecho de que la germinación de *Datura ferox* (Sánchez *et. al.*; 1989) sea promovida por pulsos breves de luz (VLFR) pero inhibida por la exposición prolongada a RL (HIR) constituye un mecanismo que le permite a las semillas distinguir entre un canopeo recién cultivado, donde toda la vegetación ha sido removida, y un canopeo muy denso. Si la sensibilidad a la luz se mantuviera alta durante todo el ciclo de vida las plantas sólo podrían diferenciar luz de oscuridad. No podrían por ejemplo percibir diferencias sutiles en la relación R/RL que se produce por la presencia de plantas vecinas. Por ejemplo la ausencia de regulación negativa en el mutante *eve1*, afectado en la síntesis de hormonas brasinosteroides impide las respuestas a las señales emitidas por la presencia de plantas vecinas, este resultado le confiere un nuevo rol a los brasinosteroides como reguladores positivos en la señalización del fitocromo, esta hormona permitiría un ajuste fino en las respuesta disminuyendo la regulación del VLFR y aumentando el LFR y HIR (Luccioni *et al.* 2002).

El análisis de las respuestas fotobiológicas en mutantes de *Arabidopsis* sigue siendo una herramienta poderosa para la comprensión de los caminos de transducción de señales de los fotorreceptores y su regulación.

Tabla 1: Resumen de los resultados obtenidos con los mutantes estudiado en esta tesis.

Proceso	Alargamiento del hipocotilo y apertura de los cotiledones				Bloque en la síntesis de clorofila		Antocianinas		Germinación	
	VLFR phyA	HIR phyA	LFR phyB	Luz azul	VLFR phyA	HIR phyA	VLFR phyA	HIR phyA	VLFR phyA	LFR phyB
Modo de acción / fotorreceptores										
Mutante	Morfología del adulto									
<i>cp3</i>	Enano	+	Normal	ND	+	Normal	Normal	Normal	+	Normal
<i>spa1</i>	Normal	+	(+)	ND	+	Normal	Normal	+	ND	ND
<i>gi</i>	Floración tardía	-	Normal	ND	Normal	Normal	Normal	Normal	-	Normal
<i>eve2</i>	Enano	+	Afecta la transición del VLFR al HIR	+	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	ND
			+ en ausencia de phyA	+	Normal	Normal	Normal	Normal	ND	ND

+ Exagerado
 (+) Poco exageradas
 - Reducido
 ND, No determinado

- Ahmad, M. and A. R. Cashmore (1993). *HY4* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**: 162-166
- Ahmad, M. and A. R. Cashmore (1996). The *pef* mutants of *Arabidopsis thaliana* define lesions early in the phytochrome signaling pathway. *Plant Journal* **10**: 1103-1110
- Ahmad, M., J. A. Jarrillo and A. R. Cashmore (1998a). Chimeric proteins between *cry1* and *cry2* *Arabidopsis* blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell* **10**: 197-208
- Ahmad, M., J. A. Jarrillo, O. Smirnova and A. A. Cashmore (1998b). The CRY1 Blue Light Photoreceptor of *Arabidopsis* Interacts with Phytochrome A In Vitro. *Molecular Cell* **1**: 939-948
- Aukerman, M. J., M. Hirschfeld, L. Wester, M. Weaver, T. Clack, R. M. Amasino and R. A. Sharrock (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
- Ballaré, C. L., R. A. Sánchez, A. L. Scopel, J. J. Casal and C. M. Ghera (1987). Early detection of neighbour plants by phytochrome perception of spectral changes in reflected sunlight. *Plant, Cell and Environment* **10**: 551-557
- Ballaré, C. L., A. L. Scopel and R. A. Sánchez (1991). Photocontrol of stem elongation in plant neighbourhoods: effects of photon fluence rate under natural conditions of radiation. *Plant, Cell and Environment* **14**: 57-65.
- Ballaré, C. L. (1999). Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signalling mechanisms. *Trends in Plant Science*
- Ballesteros, M., C. Bolle, L. Lois, J. Moore, J. P. Vielle-Calzada, U. Grossniklaus and N. H. Chua (2001). LAF1, a MYB transcription activator for phytochrome A signaling. *Genes & Development*. **15**: 2613-2625
- Barnes, S. A., N. K. Nishizawa, R. B. Quaggio, G. C. Whitelam and N.-H. Chua (1996). Far-red light blocks greening of *Arabidopsis* seedlings via a phytochrome A-mediated change in plastid development. *Plant Cell* **8**: 601-615

-
- Bolle, C., C. Konkz and N.-H. Chua (2000). PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Genes and Development* **14**: 1269-1278
- Botto, J. F., R. A. Sánchez and J. J. Casal (1995). Role of phytochrome B in the induction of seed germination by light in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* **146**: 307-312
- Botto, J. F., R. A. Sánchez, G. C. Whitelam and J. J. Casal (1996). Phytochrome A mediates the promotion of seed germination by very low fluences of light and canopy shade light in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **110**: 439-444
- Bowler, C., N. Neuhaus, H. Yamagata and N.-H. Chua (1994). Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* **77**: 73-81
- Boylan, M. T. and P. H. Quail (1991). Phytochrome A overexpression inhibits hypocotyl elongation in transgenic *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **88**: 10806-10810
- Briggs, W. R., C. F. Beck, A. R. Cashmore, J. M. Christie, J. Hughes, J. A. Jarillo, T. Kagawa, H. Kanegae, E. Liscum, A. Nagatani, K. Okada, M. Salomon, W. Rüdiger, T. Sakai, M. Takano, M. Wada and J. C. Watson (2001). The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* **13**: 993-997
- Butler, W., K. Norris, H. Siegelman and S. Hendricks (1959). Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Biochemistry* **45**: 1703-1708
- Casal, J. J., R. A. Sánchez and V. A. Deregibus (1986.). The effect of plant density on tillering: The involvement of R/FR and the proportion of radiation intercepted per plant. *Environmental and Experimental Botany* **26**: 365-371
- Casal, J. J. and R. A. Sánchez (1992.). Physiological relationships between phytochrome effects on internode extension growth and dry matter accumulation in light-grown mustard. *Photochemistry and Photobiology* **56**: 571-578

-
- Casal, J. J., R. A. Sánchez, D. Benedetto and L. C. De Miguel (1991). Light promotion of seed germination in *Datura ferox* is mediated by a highly stable pool of phytochrome. *Photochemistry and Photobiology* **53**: 249-254
- Casal, J. J., R. A. Sánchez and R. D. Vierstra (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., R. A. Sánchez, A. R. Paganelli-Blau and M. Izaguirre (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. (1995). Coupling of phytochrome B to the control of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *Planta* **196**: 23-29
- Casal, J. J. and H. Boccalandro (1995). Co-action between phytochrome B and HY4 in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **197**: 213-218
- Casal, J. J., R. A. Sánchez, M. Boylan, R. D. Vierstra and P. H. Quail (1995a). 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., R. A. Sánchez, A. R. Paganelli-Blau and M. Izaguirre (1995b). 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. (1996). Phytochrome A enhances the promotion of hypocotyl growth caused by reductions of phytochrome B Pfr levels in light-grown *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **112**: 965-973
- Casal, J. J., R. A. Sánchez and M. J. Yanovsky (1997). The function of phytochrome A. *Plant, Cell and Environment* **20**: 813-819
- Casal, J. J., R. A. Sánchez and B. J. F (1998). Modes of action of phytochromes. *Journal of Experimental Botany* **49**: 127-138

-
- Casal, J. J. and R. A. Sánchez (1998). Phytochromes and seed germination. *Seed Science Research* **8**: 317-329
- Casal, J. J. and M. A. Mazzella (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 Physiology* **118**: 19-25
- 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. *Photochemistry and Photobiology* **71**: 481-486
- Casal, J. (2000a). Fotomorfogénesis: La luz como factor regulador del crecimiento. Fundamentos de Fisiología Vegetal. (Madrid McGraw-Hill/Interamericana, Edicions Universitat de Barcelona). pp: 377-388
- Casal, J. J. (2000b). Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants. *Photochemistry and Photobiology* **71**: 1-11
- Casal, J. J. (2002a). Environmental cues affecting development. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: (in press)
- Casal, J. J., Davis, S.J., Kirchenbauer, D.J., Viczian, A., Yanovsky, M.J., Clough, R.C., Kircher, S., Jordan-Beebe, E.T., Schäfer, E., Nagy, F., Vierstra, R.D. (2002b). The serine-rich N-terminal domain of oat phytochrome A helps regulate light responses and subnuclear localization of the photoreceptor. *Plant Physiology* **129**: 1127-1137
- Casal, J. J., L. G. Luccioni, K. A. Oliverio and H. E. Boccalandro (2003). Light, phytochrome signalling and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Photochemistry and Photobiology Sciences* **2**: 625-698
- Cashmore, A. R., J. A. Jarillo and Y.-J. Wu, 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., R. J. Staneloni, J. Ortega, M. M. Bunge, J. Rodriguez-Batiller, R. A. Sánchez and J. J. Casal (2000). Sustained but Not Transient Phytochrome A Signaling Targets a Region of a *Lhcb1*2* Promoter Not Necessary for Phytochrome B action. *Plant Cell* **12**: 1203-1211
- Clack, T., S. Mathews and R. A. Sharrock (1994). The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Molecular Biology* **25**: 413-427
- Clough, R. C. and R. D. Vierstra (1997). Phytochrome degradation. *Plant, Cell and Environment* **20**: 713-721
- Cherry, J. R., H. P. Hershey and R. D. Vierstra (1991). Characterisation of tobacco expressing functional oat phytochrome: domains responsible for the rapid degradation of Pfr are conserved between monocots and dicots. *Plant Physiology* **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., C. Peto, R. Feinbaum, L. Pratt and F. Ausubel (1989). *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell* **58**: 991-999
- Christie, J. M., P. Reymond, G. K. Powell, P. Bernasconi, A. A. Raibekas, E. Liscum and W. R. Briggs (1998). *Arabidopsis* NPH1: A Flavoprotein with the Properties of a Photoreceptor for Phototropism. *Science* **282**: 1698-1701
- Clough, R. C., J. J. Casal, E. T. Jordan, P. Christou and R. D. Vierstra (1995). Expression of functional phytochrome A in transgenic rice. *Plant Physiology* **109**: 1039-1043
- Davis, S. J., V. V. Alexander and R. D. Vierstra (1999). Bacteriophytochromes: Phytochrome-Like Photoreceptors from Nonphotosynthetic Eubacteria. *Science* **286**: 2517-2520
- Dehesh, K., C. Franci, B. M. Parks, K. A. Seeley, T. W. Short, J. M. Tepperman and P. H. Quail (1993). *Arabidopsis* hy8 locus encodes phytochrome A. *Plant Cell* **5**: 1081-1088

- Deng, X. W., T. Caspar and P. H. Quail (1991). *cop1*: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes and Development* **5**: 1172-1182
- Devlin, P., S. R. Patel and G. C. Whitelam (1998). Phytochrome E Influences Internode Elongation and Flowering Time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1479-1488
- Devlin, P. F., P. R. H. Robson, S. R. Patel, L. Goosey, R. A. Sharrock and G. C. Whitelam (1999). Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time. *Plant Physiology* **119**: 909-915
- Dunlap, J. C. (1999). Molecular basis for circadian clock. *Cell* **96**: 271-290
- Elich, T. D. and J. Chory (1997). Biochemical characterization of *Arabidopsis* wild-type and mutant phytochrome B holoproteins. *Plant Cell* **9**: 2271-2280
- Fairchild, C. D., Schumaker, M.A., Quail, P.H. (2000). *HFR1* encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes and Development* **14**: 2377-2391
- Fankhauser, C., K. C. Yeh, J. C. Lagarias, H. Zhang, T. D. Elich and J. Chory (1999). PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* **284**: 1539-41
- Fankhauser, C. (2000). Phytochromes as light-modulated protein kinases. *Cell & Developmental Biology* **11**: 467-473
- Fowler, S., S. Lee, H. Onouchi, A. Samarch, K. Richardson, B. Morris, G. Coupland and J. Putterill (1999). GIGANTEA: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *The EMBO Journal* **18**: 4679-4688
- Franklin, K. A., U. Praekelt, W. M. Stoddart, O. E. Billingham, K. J. Halliday and G. C. Whitelam (2003). Phytochromes B, D, and E Act Redundantly to Control Multiple Physiological Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **131**: 1340-1346
- Furuya, M. and P.-S. Song (1994). Assembly and properties of holophytochrome. *Photomorphogenesis in plants*. 2nd (Dordrecht, The Netherlands Kluwer Academic Publishers). pp: 105-140

- Goto, N., T. Kumagai and M. Koornneef (1991). Flowering responses to light-breaks in photomorphogenic mutants of *Arabidopsis thaliana*, a long-day plant. *Physiologia Plantarum* **83**: 209-215
- Guo, H., H. Yang, T. C. Mockler and C. Lin (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 Physiology* **104**: 1311-1315
- Hanelt, S., B. Braun, S. Marx and Scheneider (1992). Phytochrome evolution a phylogenetic tree with the first complete secuencia of phytochrome from (*Selaginella martessii* spring). *Photochemistry and Photobiology* **56**: 751-758
- Heyer, A. G., D. Mozley, V. Landschütze, B. Thomas and C. Gatz (1995). Function of phytochrome A in *Solanum tuberosum* as revealed through the study of transgenic plants. *Plant Physiology* **109**: 53-61
- Hoecker, U., Y. Xu and P. H. Quail (1998). *SPA1*: a new genetic locus involved in phytochrome A-specific signal transduction. *Plant Cell* **10**: 19-33
- Hoecker, U. and P. H. Quail (2001). The phytochrome A-specific signaling intermediate SPA1 interacts directly with COP1, a constitutive repressor of light signaling in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 38173-38178
- Holmes, M. G. and H. Smith (1977). The function of phytochrome in the natural environment. I Characterization of daylight for studies in photomorphogenesis and photoperiodism. *Photochemistry and photobiology* **25**: 533-538
- Hsieh, H.-L., H. Okamoto, M. Wang, L.-H. Ang, M. Matsui, H. Goodman and X. W. Deng (2000). *FIN219*, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of *Arabidopsis* development. *Genes and Development* **14**: 1958-1070
- 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

-
- Huang, Z. J., I. Edery and M. Rosbash (1993). PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* Period and several transcription factors. *Nature* **364**: 259 - 262
- 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. *Genes and Development* **13**: 2017-2027
- Huq, E., J. M. Tepperman and P. H. Quail (2000). GIGANTEA is a nuclear protein involved in phytochrome signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 9789-9794
- Jarillo, J. A., H. Gabrys, J. Capel, J. M. Alonso, J. R. Ecker and A. R. Cashmore (2001). Phototropin-related NPL1 controls chloroplasts relocation induced by blue light. *Nature* **410**: 952-954
- Johnson, E., M. Bradley, P. Harberd and G. C. Whitelam (1994). Photoresponses of light-grown phyA mutants of *Arabidopsis*. Phytochrome A is required for the perception of daylength extensions. *Plant Physiology* **105**: 141-149
- Jones, A. M., J. R. Ecker and J.-G. Chen (2003). A Reevaluation of Role of the Heterotrimeric G Protein in Coupling Light Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **131**: 1623-1627
- Kagawa, T., T. Sakai, N. Suetsugu, S. Ishiguro, T. Kato, S. Tabata, K. Okada and M. Wada (2001). *Arabidopsis NPL1*: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* **291**: 2138-2141
- 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 Physiology* **47**: 775-778
- Kendrick, R. E. and G. H. M. Kronenberg (1994). Photomorfogenesis in plants, 2 Edition (Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers)
- Kim, L., S. Kiercher, R. Toth, E. Adam, E. Schaefer and F. Nagy (2000). light induced nuclear import of phytochrome-A:GFP fusions proteins is differentially regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis*. *Plant Journal* **22**: 125-133

- King, R. W. and D. J. Bagnall (1996). Photochromes and photoperiodic response controlling flowering time in Arabidopsis. *Sem Cell. Dev. Biol.* 7: 449-454
- Kircher, S., Kozma-Bognar, L., Kim, L., Adam, E., Harter, K., Schäfer, E., Nagy, F. (1999). Light-quality dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell* 11: 1445-1456
- Koornneef, M., E. Rolf and C. J. P. Spruit (1980). Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 100: 147-160
- Koornneef, M., Van Eden, J., HanHart, J., Stam, P., Braaksman, F., Freenstra, W.J (1983). Linkage map of Arabidopsis thaliana. *Journal of Heredity* 265-272
- Lagarias, J. C. and Lagarias D. M. (1989). Self-assembly of synthetic phytochrome holoprotein *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 86: 5778-5780
- Lagarias, D., S.-H. Wu and C. Lagarias (1995). Atypical phytochrome gene structure in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *Plant Molecular Biology* 29: 1127-1142
- Lariguet, P., H. Boccalandro, J. M. Alonso, J. M. Ecker, J. Chory, J. J. Casal and C. Fankhauser (2003). The Balance between PKS1 and PKS2 Provides Homeostasis for Phytochrome A Signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell* in press
- Lee, Y., A. M. Lloyd and S. J. Roux (1999). Antisense Expression of the CK2 alpha-Subunit Gene in Arabidopsis. Effects on Light-Regulated Gene Expression and Plant Growth. *Plant Physiology* 119: 989-1000
- Lissemore, J. L. and P. H. Quail (1998). Rapid transcriptional regulation by phytochrome of the genes for phytochrome and chlorophyll a/b-binding protein in Avena sativa. *Molecular Cell Biology* 8: 4840-4850
- López Juez, E., A. Nagatani, K.-I. Tomizawa, M. Deak, R. Kern, R. E. Kendrick and M. Furuya (1992). The cucumber long hypocotyl mutant lacks a light-stable PHYB-like phytochrome. *Plant Cell* 4: 241-251

- Mancinelli, A. L., F. Rossi and A. Moroni (1991). Cryptochrome, phytochrome and anthocyanin production. *Plant Physiology* **96**: 1079-1085
- Mancinelli, A. L. (1994). The physiology of phytochrome action. Photomorphogenesis in plants. 2 (Dordrecht, The Netherlands Kluwer Academic Publishers). pp: 211-269
- Mazzella, M. A. (1995). Control de los mecanismos de la partición del carbono por el fitocromo. Seminario de Licenciatura FCEyN.
- Mazzella, M. A., T. M. Alconada Magliano and J. J. Casal (1997). Dual effect of phytochrome A on hypocotyl growth under continuous red light. *Plant, Cell and Environment* **20**: 261-267
- McCormac, A. C., D. Wagner, M. T. Boylan, P. H. Quail, H. Smith and G. C. Whitelam (1993). Photoresponses of transgenic *Arabidopsis* seedlings expressing introduced phytochrome B- encoding cDNAs: evidence that phytochrome A and phytochrome B have distinct photoregulatory functions. *Plant Journal* **4**: 19-27
- McNellis, T. W. and X.-W. Deng (1995). Light control of seedling morphogenetic pattern. *Plant Cell* **7**: 1749-1761
- Meinke, D. W., J. M. Cherry, C. Dean, S. D. Rounsley and M. Koornneef (1998). *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* **282**: 662-682
- Mohr, H. (1986). Coaction between pigment systems. Photomorphogenesis in plants. 1 (Dordrecht, The Netherlands Marthinus Nijhoff). pp: 547- 564
- Møller, S., T. Kunkel and N. H. Chua (2001). A plastidic ABC protein involved in intercompartmental communication of light signaling. *Genes and Development* **15**: 90-103
- Monte, E., J. M. Alonso, J. R. Ecker, Y. Zhang, X. Li, J. Young, S. Austin-Philips and P. H. Quail (2003). Isolation and Characterization of *phyc* Mutantants in *Arabidopsis* Reveals Complex Crosstalk between Phytochrome Signaling Pathways. *The Plant Cell* **15**: 1962-1980
- Moran, R. (1982). Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N,N- dimethylformamide. *Plant Physioogy* **69**: 1376-1381

-
- Morgan, D. C. and H. Smith (1976). Linear relationship between phytochrome photoequilibrium and growth in plants under natural radiation. *Nature* **262**: 210-212
- Nagatani, A., J. Chory and M. Furuya (1991). Phytochrome B is not detectable in the hy3 mutant of Arabidopsis, which is deficient in responding to end-of-day far-red light treatments. *Plant Cell Physiology* **32**: 1119-1122
- Nagatani, A., J. W. Reed and J. Chory (1993). Isolation and initial characterization of Arabidopsis mutants that are deficient in phytochrome A. *Plant Physiology* **102**: 269-277
- Nagatani, A., N. K. Nishizawa, S. Mori, S. A. Kay, N.-H. Chua and M. Furuya (1993a). Light regulation of hypocotyl elongation and greening in transgenic tobacco seedlings that over-express rice phytochrome. *Plant Cell Physiology* **34**: 825-833
- Nagatani, A., J. W. Reed and J. Chory (1993b). Isolation and initial characterization of Arabidopsis mutants that are deficient in phytochrome A. *Plant Physiology* **102**: 269-277
- Nagy, F., Kircher, S., Schäfer, E. (2001). Intracellular trafficking of photoreceptors during light-induced signal transduction in plants. *Journal of Cell Science* **114**: 475-480
- Neff, M. and J. Chory (1998). Genetic Interactions between Phytochrome A, Phytochrome B and Cryptochrome 1 during Arabidopsis Development. *Plant Physiology* **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., J. M. Tepperman and P. H. Quail (1999). Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* **400**: 781-4

- Park, D. H., D. Somers, J. S. Kim, Y. H. Choy, H. K. Lim, M. S. Soh, H. J. Kim, S. A. Kay and H. G. Nam (1999). Control of Circadian Rhythms and Photoperiodic Flowering by the Arabidopsis GIGANTEA Gene. *Science* **285**: 1579-1582
- Parks, B. M. and P. H. Quail (1993). hy8, a new class of Arabidopsis long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *The Plant Cell* **5**: 39-48
- Parks, B. M., P. H. Quail and R. P. Hangarter (1996). Phytochrome A regulates red-light induction of phototropic enhancement in Arabidopsis. *Plant Physiology* **110**: 155-162
- Parks, B. M., U. Hoecker and E. P. Spalding (2001). Light-Induced Growth Promotion by SPA1 Counteracts Phytochrome-Mediated Growth Inhibition during De-etiolation. *Plant Physiology* **126**: 1291-1291
- Pepper, A. E., M. Seong-Kim, S. M. Hebst, K. N. Ivey, S. Kwak and D. E. Broyles (2001). *shl*, a New Set of Arabidopsis Mutants with Exaggerated Developmental Responses to Available Red, Far-Red, and Blue Light. *Plant Physiology* **127**: 295-304
- Quail, P. H. (1991). Phytochrome: a light-activated molecular switch that regulates plant gene expression. *Annual Reviews Genetics*. **25**: 389-409
- Quail, P. H. (1997). An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant, Cell and Environment* **20**: 657-665
- Quail, P. (1998). The phytochrome family: dissection of functional roles and signalling pathways among family members. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B*. **333**: 1399-1403
- Quail, P. H. (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature Reviews Molecular and Cell Biology* **3**: 85-93
- Reed, J. W., P. Nagpal, D. S. Poole, M. Furuya and J. Chory (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., A. Nagatani, T. D. Elich, M. Fagan and J. Chory (1994). Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in *Arabidopsis* development. *Plant Physiology* **104**: 1139-1149
- Robson, P. R. H., G. C. Whitelam and H. Smith (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 Physiology* **102**: 1179-1184.
- Salisbury, F. B. and C. W. Ross (1994). Fisiología vegetal, (México, Grupo Editorial Iberoamérica S. A. de C. V.)
- Scopel, A. L., C. L. Ballaré, and R. A. Sanchez (1991). Induction of extreme light sensitivity in buried weed seeds and its role in the perception of soil cultivations. *Plant, Cell and Environment* **14**: 501-508
- Schneider-Poetsch, H. (1992). Signal transduction by phytochrome have a modulate related to the transmitter modules of bacterial sensor pprotein. *Photochemistry and Photobiology* **56**: 839-846
- Shinomura, T., A. Nagatani, J. Chory and M. Furuya (1994). The induction of seed germination in *Arabidopsis thaliana* is regulated principally by phytochrome B and secondarily by phytochrome A. *Plant Physiology* **104**: 363-371
- Shinomura, T., A. Nagatani, H. Hanzawa, M. Kubota, M. Watanabe and M. Furuya (1996a). Action spectra for phytochrome A- and phytochrome B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**: 8129-8133
- Shinomura, T., A. Nagatani, H. Hanzawa, M. Kubota, M. Watanabe and M. Furuya (1996b). Action spectra for phytochrome A-and phytochrome B-specific photoinduction od seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 8129-8133
- Simpson, G. G. and C. Dean (2002). *Arabidopsis*, the Rosetta Stone of Flowering Time? *Science* **296**: 285-289

- Smith, H. and G. C. Whitelam (1997). The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant, Cell and Environment* **20**: 840-844
- Smith, H. (2000). Phytochromes and light signal perception by plants-an emerging synthesis. *Nature* **407**: 585 - 590
- Soh, M.-S., Kim, Y.-M., Ham, S.-J., Song, P.-S. (2000). REP1, a basic helix-loop-helix protein, is required for a branch pathway of phytochrome A signalling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 2061-2073
- Somers, D. E., R. A. Sharrock, J. M. Tepperman and P. H. Quail (1991). The *hy3* long hypocotyl mutant of *Arabidopsis* is deficient in phytochrome B. *Plant Cell* **3**: 1263-1274
- Taylor, B. L. and I. B. Zhulin (1999). PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential and Light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**: 479-506
- Terry, M. J. (1997). Phytochrome chromophore-deficient mutants. *Plant, Cell and Environment* **20**: 740-745
- Thummler, F., M. Dufner, P. Kreisl and P. Dittrich (1992). Molecular cloning of a novel phytochrome gene of the moss *Ceratodon purpureus* which encodes a putative light-regulated protein kinase. *Plant Molecular Biology* **20**: 1003-1017
- Tomato, M., N. Mochizuki and A. Nagatani (2003). Dimers of N-terminal domain of phytochrome B are functional in nucleus. *Science* **424**: 571-574
- van Tuinen, A., L. H. J. Kerckhoffs, A. Nagatani, R. E. Kendrick and M. Koornneef (1995). Far-red light insensitive, phytochrome A deficient mutants of tomato. *Molecular and General Genetics* **246**: 133-141
- Vierstra, R. D. (1994). Phytochrome degradation. *Photomorphogenesis in plants*. 2nd (Dordrecht, The Netherlands Kluwer Academic Publishers). pp: 141-162
- Wagner, D., J. M. Tepperman and P. H. Quail (1991). Overexpression of phytochrome B induces a short hypocotyl phenotype in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell* **3**: 1275-1288

- Wagner, D., C. D. Fairchild, R. M. Kuhn and P. H. Quail (1996). Chromophore-bearing NH₂-terminal domains of phytochromes A and B determine their photosensory specificity and differential light lability. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **93**: 4011-4015
- Wei, N. and X.-W. Deng (1992). COP9: A new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in Arabidopsis. *The Plant Cell* **4**: 1507-1518
- Whitelam, G. C. and H. Smith (1991). Retention of phytochrome-mediated shade avoidance responses in phytochrome-deficient mutants of Arabidopsis, cucumber and tomato. *Journal of Plant Physiology* **139**: 119-125
- Whitelam, G. C., E. Johnson, J. Peng, P. Carol, M. L. Anderson, J. S. Cowl and N. P. Harberd (1993). Phytochrome A null mutants of Arabidopsis display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell* **5**: 757-768
- Yang, H. Q., Wu, Y.-J., Tang, R.-H., Liu, D., Liu, Y., Cashmore, A.R. (2000). The C termini of *Arabidopsis* cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell* **103**: 815-827
- Yanovsky, M. J., J. J. Casal and G. C. Whitelam (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 & Environment* **18**: 788-794
- Yanovsky, M. J., J. J. Casal and J. P. Luppi (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 Journal* **12**: 659-667
- Yanovsky, M. J., M. Izaguirre, J. A. Wagmaister, C. Gatz, S. D. Jackson, B. Thomas and J. J. Casal (2000a). Phytochrome A resets the circadian clock and delays tuber formation under long days in potato. *Plant Journal* **23**: 223-232
- Yanovsky, M. J., G. C. Whitelam and J. J. Casal (2000b). *phy3-1* retains inductive responses of phytochrome A. *Plant Physiology* **123**: 235-242

- Yanovsky, M. J., J. P. Luppi, D. Kirchbauer, O. B. Ogorodnikova, V. A. Sineshchekov, E. Adam, S. Kircher, R. J. Staneloni, E. Schafer, F. Nagy and J. J. Casal (2002). Missense Mutation in the PAS2 Domain of Phytochrome A Impairs Subnuclear Localization and a Subset of Responses. *The Plant Cell* **14**: 1591-1603
- Yanovsky, M. J. and S. A. Kay (2003). Living by the calendar: How plants know when to flower. *Nature Reviews* **4**: 265-275
- 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. and C. Lagarias (1998). Eukariotic phytochromes: Light-regulated serine / threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **95**: 13976-13981
- Zhong, H. H., J. E. Painter, P. P. Salomé, M. Straume and R. McClung (1998). Imbibition, but Not Release from Stratification, Sets the Circadian Clock in Arabidopsis Seedlings. *The Plant Cell* **10**: 2005-2017



KARINA ANDREA OLIVERIO