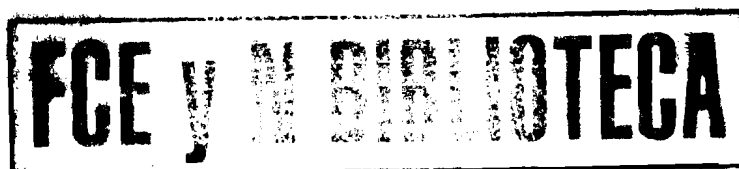




**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**MODULACION DE LA SENSIBILIDAD A LA LUZ EN PLANTAS.
MECANISMOS MOLECULARES Y APLICACIONES
AGRO-BIOTECNOLOGICAS**

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



Licenciado Hernán Esteban Boccalandro

Director: Dr. Jorge José Casal

Consejero: Dr. Norberto Iussem

**Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas Vinculadas a la
Agricultura - CONICET
Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires**

3808



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FISIOLÓGICAS Y
ECOLÓGICAS VINCULADAS A LA AGRICULTURA

Buenos Aires, marzo de 2005

MODULACION DE LA SENSIBILIDAD A LA LUZ EN PLANTAS. MECANISMOS MOLECULARES Y APLICACIONES AGRO-BIOTECNOLOGICAS

RESUMEN

Incrementos en la densidad de cultivo producen aumentos en el rendimiento por área hasta alcanzar un óptimo. A partir de allí, densidades mayores pueden repercutir negativamente. Esto se debería a una mayor competencia por recursos y a señales lumínicas asociadas a altas densidades. Estas señales son percibidas por fotorreceptores de luz roja y rojo lejano conocidos como fitocromos. Dilucidar los mecanismos mediante los cuales las plantas modulan la sensibilidad a la luz es fundamental para diseñar estrategias que aplaquen el impacto negativo de altas densidades de cultivo sobre el rendimiento. En la primera etapa de esta tesis se estudiaron los papeles que cumplen ciertos actores de la señalización lumínica (PKS1, PKS2 y COP1) bajo condiciones controladas en la planta modelo, *Arabidopsis thaliana*. PKS1 y PKS2 promovieron una rama discreta de la señalización del fitocromo A (VLFR), e interactuaron negativamente entre sí. Un balance entre PKS1 y PKS2 sería necesario para respuestas VLFR normales. COP1, cuya función como represor de la fotomorfogénesis en oscuridad es bien conocida, mostró una inesperada correlación positiva entre los niveles de COP1 y la respuesta de plántulas de *Arabidopsis* a luz roja percibida por el fitocromo B. Al igual que PKS1 y PKS2, COP1 también demostró ser una proteína bifuncional (con actividad represora/activadora). Distintas variantes genéticas con niveles alterados de PKS1, PKS2, COP1 y PHYB (fitocromo B) fueron evaluadas a distintas densidades bajo radiación natural. La sobreexpresión de *PHYB* fue la estrategia más efectiva para producir insensibilidad a la densidad en *Arabidopsis*. La aplicación de esta estrategia en plantas de interés comercial (*Solanum tuberosum*) mostró que la sobreexpresión de *PHYB* es capaz de provocar mayores rendimientos en altas densidades de cultivo.

PALABRAS CLAVES: Fotomorfogénesis, Fitocromo, Transducción de señales, Densidad de cultivo, Rendimiento, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*

MODULATION OF LIGHT SENSITIVITY IN PLANTS. MOLECULAR MECHANISMS AND AGRO-BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

SUMMARY

At low plant densities, increasing the number of plants per unit area results in proportional increments in crop yield, above certain plant densities the marginal increment of yield with increased population decreases and may become negative. This could be due to higher competition by resources and by light signals associated to dense canopies characteristics of high densities. These light signals are perceived by photoreceptors of red and far red light known as phytochromes. Uncovering of the mechanisms through which the plants modulate light sensitivity is crucial to design strategies to abolish deleterious effects of high densities on crop yield. The first step in this theses was to study the role that play certain actors of the light signalling (PKS1, PKS2 y COP1) under controlled environments in the model plant, *Arabidopsis thaliana*. PKS1 and PKS2 promoted a discrete branch of phytochrome A signalling (VLFR), and they negatively interact between them. A balance between PKS1 and PKS2 would be necessary for normal VLFR responses. COP1, a known repressor of photomorphogenesis in darkness, showed an unsuspected positive correlation between COP1 levels and the responses of seedlings of *Arabidopsis* to the red light perceived by phytochrome B. Surprisingly, PKS1, PKS2 and COP1 behaved as bi-functional proteins (with activity of repressor/activator in the same molecule). Different genotypes with altered levels of PKS1, PKS2, COP1 and PHYB (phytochrome B) were evaluated at distinct plant densities under natural radiation. *PHYB* overexpression was the more effective strategy to diminish responses to stand density in *Arabidopsis*. The application of this strategy in crops (*Solanum tuberosum*) showed that *PHYB* overexpression increased potential tuber yield of potato crops planted at high densities.

KEY WORDS: Photomorphogenesis, Phytochrome, Light signalling, Plant density, Yield, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Casal por todo el apoyo brindado durante el transcurso de esta tesis

A los doctores Jorge Casal, Rodolfo Sánchez, Carlos Ballaré y Marcelo Yanovsky por abrirme las puertas del mundo de la fotobiología con tanto entusiasmo, dedicación y haber sido mi guía en el fascinante camino de la investigación.

A mis compañeros del laboratorio de fotomorfogénesis y de UV: Karina Oliverio, Laura Luccioni, Vero Arana, Javier Botto, Teresa Alconada, Sabrina Buchovsky, Constanza Rossi, Santiago Trupkin, Matías Rugnone, Leo Storani, Ana Faigón, Javier Botto, Genault, Ana Zima, Silvia DeSimone y especialmente a Miriam Izaguirre.

A Constanza Rossi y Matías Rugnone por la gran ayuda que me brindaron en el trabajo experimental de esta tesis.

A Carlos Mazza de quien aprendí los secretos de la radiación UV y principalmente con quien compartí muchos de los mejores momentos en el IFEVA.

A mis compañeros y amigos de oficina: Laura Yadhjian, Pamela Graff (temporada invernal), Roxana Aragón, Alfonsina Szpeiner, Irene Fabricante (temporada estival). Y también a mis amigos María José Burgin y Gustavo Marino con quienes compartimos hermosos momentos en nuestra cálida y por momentos tórrida oficina.

A los integrantes del laboratorio de Girasol que me brindaron su ayuda. A su director, Dr. Antonio Hall, por colaborar con la interpretación de mis resultados a campo y la provisión de instrumentos para medir parámetros ecofisiológicos y a sus becarios Deborah Rondanini y Rafael Mac Donough por su generosa y desinteresada ayuda.

Al Dr. Roberto Stanelloni por toda la ayuda brindada en los experimentos realizados en la Fundación Campomar.

Al Dr. Edmundo Ploschuk por la ayuda en las mediciones de fotosíntesis.

A todos los que anónimamente aportaron con materiales a mi tesis y aún los están buscando. Mil disculpas.

A los ecólogos del IFEVA por ampliar mi limitada visión de biólogo molecular.

A mi padres, a Emilio y al resto de mi familia, por el continuo apoyo y amor que me brindaron a cada paso de este largo camino.

A Carla por todo el apoyo y ayuda que me brindó para que esta tesis llegara algún día a esta versión final.

A la naturaleza, madre inspiradora de la admiración y curiosidad.

A Lunita y Carla, con quienes comparto los mejores momentos de mi vida.

Los contenidos de esta tesis fueron total o parcialmente incluidos en las siguientes publicaciones:

- 2005 **Hernán Boccalandro**, Constanza Rossi, Yusuke Saijo, Xing-Wang Deng and Jorge Casal. Promotion of photomorphogenesis by COP1. **Plant Molecular Biology** en prensa.
- 2003 Patricia Lariguet*, **Hernán Boccalandro***, José Alonso, Joseph Ecker, Joanne Chory, Jorge Casal and Christian Fankhauser. A Growth Regulatory Loop That Provides Homeostasis to Phytochrome A Signaling. ***igual contribución de los autores. The Plant Cell**, Vol. 15, 2966-2978.
- 2003 **Hernán Boccalandro**, Edmundo Ploschuk, Marcelo Yanovsky, Christiane Gatz, Rodolfo Sánchez and Jorge Casal. Increased phytochrome B alleviates density effects on tuber yield of field potato crops. **Plant Physiology** **133**, 1539-1546.
- 2003 Jorge Casal, Laura Luccioni, Karina Oliverio and **Hernán Boccalandro**. Light, Phytochrome Signalling and photomorphogenesis in Arabidopsis. **Photochemical and Photobiological Sciences** **2**, 625-636.

Muy probablemente el mundo no se entere de mis hallazgos y desventuras. Mi desafío real es disfrutar la continua búsqueda de caminos que nunca sabré a donde me han de llevar.

CAPITULO 1:

1. INTRODUCCION GENERAL

Ante situaciones adversas tales como condiciones climáticas desfavorables, falta de alimento, agua, etc. la mayoría de los animales pueden moverse a un sitio más favorable. Sin embargo su capacidad de responder a cambios en el ambiente a través de modificaciones en su patrón de crecimiento y desarrollo es muy limitada. Debido a su carácter sésil, las plantas poseen una asombrosa capacidad de responder plásticamente al ambiente, a través de cambios en el patrón de crecimiento y desarrollo a lo largo de su ciclo de vida. No es sorprendente por lo tanto que en el vasto mundo vegetal encontremos refinados **sistemas de percepción de señales** ambientales con capacidad de **transducir** información acerca del ambiente e inducir respuestas modificando el **patrón de crecimiento y desarrollo**. Entre los factores ambientales que afectan a las plantas, la luz juega un papel preponderante. A lo largo de la evolución se han desarrollado sistemas capaces de percibir fluctuaciones en calidad, cantidad, dirección y duración del estímulo lumínico. La percepción y respuesta a distintos aspectos de este ambiente producen aclimatación que en muchos casos se traduce en un mayor “*fitness*”.

1.1 EL AMBIENTE LUMINCO

La Tierra posee un amplio espectro electro-magnético en su superficie. Según su longitud de onda (λ), las distintas partes del espectro se clasifican en radiación: UV (200-400 nm), “luz visible” (400-700 nm), infrarrojo (700nm-1mm), microondas (1mm-30cm) y ondas de radio (30cm a muchos km) (Fig. 1).

La mayoría de los organismos somos “ciegos” para percibir una buena parte de este espectro. Sin embargo dentro de la gran diversidad de organismos que pueblan nuestro planeta podemos encontrar seres capaces de percibir total o parcialmente algunas de estas porciones del espectro y aprovecharlo como fuente de energía o bien como información acerca del ambiente circundante.

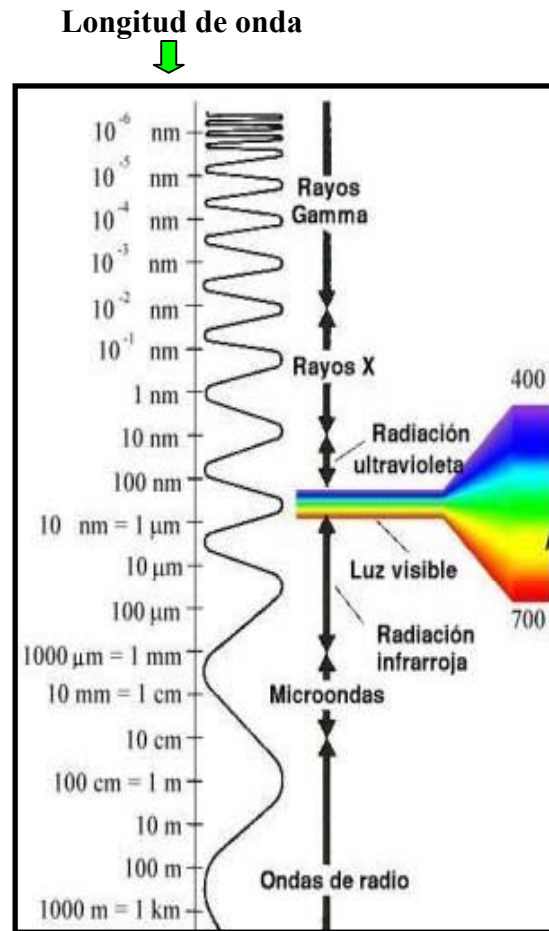


Figura 1. Espectro electromagnético

En las plantas, la luz visible es crucial como fuente de energía; con capacidad para producir saltos electrónicos en los centros de reacción del aparato fotosintético, que más tarde se traducen en energía química que culmina en la fijación de CO_2 ambiental. Sin embargo la importancia de la luz en los vegetales, no se limita a su función energética.

También es fuente de **señales ambientales** cuya percepción es de potencial valor adaptativo, llegando a cumplir el sensado de luz en plantas un papel tan crucial como lo es

el sistema de visión en animales (Smith, 2000). 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**.

Ahora bien, ¿qué aspectos del ambiente lumínico sufren cambios substanciales en el tiempo y el espacio cuya detección es de potencial utilidad para las plantas?

El ambiente lumínico sufre modificaciones naturales que tienen que ver con:

- a) la **duración** del estímulo lumínico, es decir con su fotoperíodo (cantidad de horas de luz diarias). Este parámetro varía a lo largo de todo el año (estaciones) en latitudes alejadas del ecuador.
- b) la **irradiancia**, (la cantidad de luz por unidad de tiempo y superficie). Este aspecto del ambiente lumínico varía a lo largo del día y del año, con el clima, con la proximidad a la superficie del suelo, con el sombreado, etc.
- c) la **dirección del estímulo lumínico**. Este parámetro varía a lo largo del día y año (excepto en zonas ecuatoriales) y en los claros de luz que se producen típicamente dentro de un canopeo vegetal o debajo de la hojarasca, donde se generan gradientes de luz.
- d) la **composición espectral o calidad de luz**, (asociado a la cantidad relativa de luz en cada zona del espectro). Este parámetro varía principalmente ante la presencia de otras plantas (que absorben, reflejan y refractan diferencialmente luz azul, verde, roja [R] y rojo lejano [RL]) y en ambientes acuáticos según la profundidad y el tipo de partículas en suspensión. En menor medida varía con el tipo de suelo, la presencia de nubosidad, al amanecer y atardecer.

Los cambios en las características del ambiente lumínico se asocian a situaciones ecológicas tan variadas como la proximidad a la superficie del suelo durante el proceso de emergencia, la apertura de claros en un dosel vegetal que promueven la germinación de semillas o direccionamiento del crecimiento vegetativo hacia el claro, la proximidad a plantas vecinas que promueven la elongación del tallo y la llegada de la estación climática favorable para el crecimiento y/o inducción floral (Casal *et al.*, 2003).

1.1.1. Ambiente lumínico asociado al proceso de Germinación

El momento y lugar en los cuales germinan las semillas son críticos para la futura supervivencia y *fitness* de las plantas. Muchas especies producen semillas que, dependiendo de las condiciones ambientales, requieren ser expuestas a la luz para germinar (Casal y Sánchez, 1998). La germinación de varias especies está afectada fuertemente por la calidad de luz. La presencia de otras plantas reduce la radiación total y altera la composición espectral de la luz incidente. Los órganos verdes de las plantas absorben mucho más intensamente R y azul que RL, al mismo tiempo que transmiten (Fig. 2A) y reflejan (Fig. 2B) en mayor medida esta última radiación.

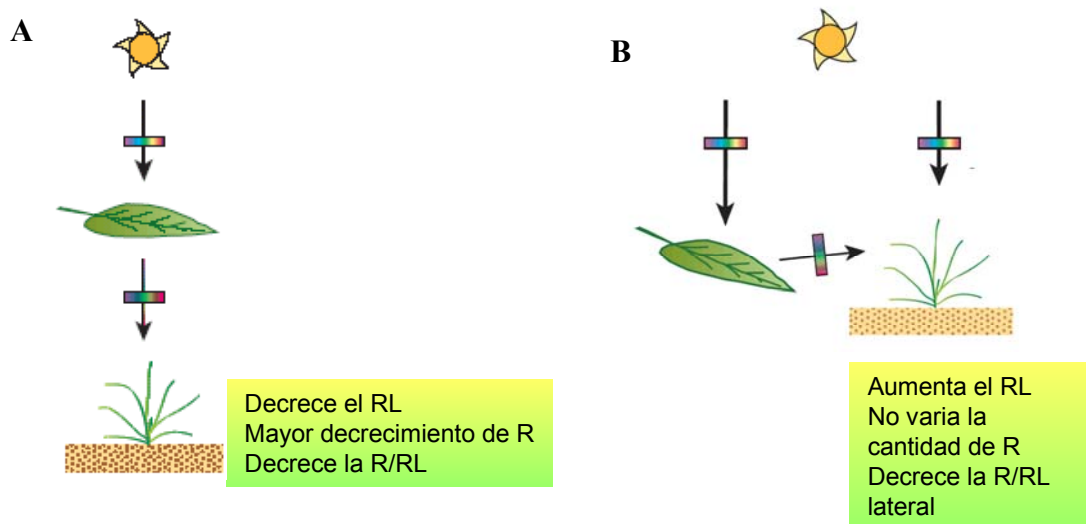


Figura 2: Modificaciones en la calidad de luz transmitida o reflejada por un canopeo.

(A) Cambios en la luz solar que se transmite a través de un canopeo típico.

(B) Cambios cualitativos en la luz reflejada por un camopeo típico.

A medida que la radiación solar penetra en el canopeo de los cultivos sufre cambios graduales en la radiación fotosintéticamente activa (RFA) y en la relación de R sobre RL (R/RL) (Holmes y Smith, 1977). La R/RL percibida por las plantas o semillas es un parámetro asociado a la densidad del follaje o proximidad a plantas vecinas (Ballaré *et al.*,

1987). Por lo tanto la luz recibida por semillas dispuestas sobre el suelo cubierto de vegetación es proporcionalmente más rica en RL. Las altas relaciones de R/RL que se producen en claros en la vegetación promueven la germinación de muchas especies, permitiendo el establecimiento de nuevas plántulas evitando la competencia (Casal, *et al.*, 2003). Pequeñas disminuciones en la R/RL son suficientes para inhibir o reducir la germinación en varias especies (Batla *et al.*, 2000). Por otro lado, altas irradiancias de RL, típicas de canopeos densos, inhiben la germinación de muchas especies (De Miguel *et al.*, 2000). Es decir que flujos altos de radiación RL serían una señal indicadora de alta cobertura vegetal que implican alta competencia por luz y por lo tanto un sitio potencialmente adverso desde el punto de vista de la adquisición de energía lumínica y otros recursos. Altos niveles de luz azul también pueden inhibir la germinación en semillas de algunas especies. Posiblemente alta radiación azul actúe como una señal de un sitio potencialmente desecante para el establecimiento de las plántulas (Attridge, 1990). La germinación de algunas especies también puede desencadenarse por muy breves transiciones de la oscuridad a la luz experimentadas por semillas enterradas durante la remoción del suelo en la labranza (Scopel *et al.*, 1991).

1.1.2. Ambiente lumínico asociado al proceso de Emergencia (etiología y des-etiología).

Luego de la germinación, las plántulas que se desarrollan en oscuridad (bajo el suelo) crecen a expensas de sus reservas, siguiendo un patrón de crecimiento y desarrollo, conocido como escotomorfogénesis, presentando un fenotipo etiolado. El mismo se caracteriza por plántulas con tallos o hipocotilos largos, cotiledones cerrados y poco expandidos, gancho apical, maquinaria fotosintética rudimentaria, raíz pequeña, etc. (Fig. 3A). La etiología incrementa así la posibilidad de que las futuras hojas sean elevadas por sobre la superficie del suelo y alcancen la fotoautotrofia antes que se agoten las reservas de la semilla. Una vez que la plántula se encuentra cercana a la superficie, se produce un profundo cambio en el desarrollo teniendo lugar la des-etiología. Este proceso involucra cambios morfológicos como la inhibición del crecimiento del hipocotilo, la estimulación del desarrollo de los cotiledones, desarrollo de una maquinaria fotosintética funcional,

crecimiento de la raíz (Fig. 3B). Parte de estos cambios se deben a modificaciones en la expresión de numerosos genes, inducidos o reprimidos por la luz (Fig. 3C). 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 fotomorfogénico está reprimido (Chory *et al.*, 1989, Deng *et al.*, 1991).

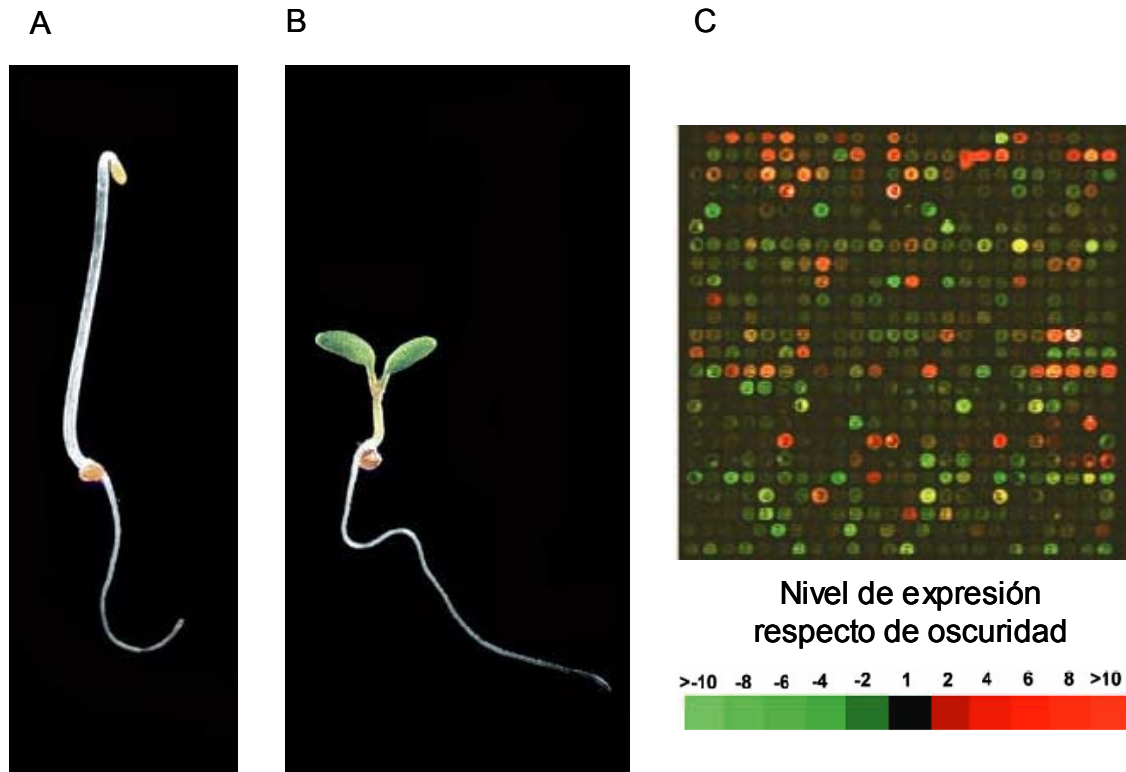


Figura 3 : Morfología y patrón de expresión genética de plántulas WT sometidas a oscuridad o luz. (A) Morfología de una plántula etiolada de *Arabidopsis thaliana* cultivada durante 3 días en oscuridad. (B) Morfología de una plántula des-etiolada de *Arabidopsis thaliana* cultivada días bajo luz blanca. (C) Patrón parcial de la expresión genética relativa de plántulas cultivadas en luz respecto de otras cultivadas por el mismo período en oscuridad. Aproximadamente la tercera parte del genoma modifica su expresión bajo luz respecto de oscuridad. Los diferentes colores muestran incrementos en la expresión de los genes (en rojo) y represión (en verde). Imagen tomada de Ma *et al.*, (2001) *The Plant Cell*, Vol 13, p. 2591.

1.1.3. Ambiente lumínico asociado a la presencia de plantas vecinas y sombreado

A medida que aumenta la densidad de plantas (plantas por unidad de superficie) o se incrementa el índice de área foliar (IAF: superficie de hojas por unidad de superficie de suelo), disminuye la radiación total y la R/RL. Las plantas son capaces de ajustar el crecimiento y desarrollo a la situación de competencia por luz y otros recursos. Las plantas poseen dos estrategias opuestas en respuesta a la competencia por luz: tolerancia o escape al sombreado (Morgan y Smith, 1976). Las plantas tolerantes al sombreado (características de sotobosques) se caracterizan por conservar la energía y los recursos con bajas tasas de crecimiento y por el desarrollo de estructura fotosintéticas muy eficientes en bajos niveles de luz. La otra estrategia, es el “escape al sombreado”, donde las bajas R/RL producen un rápido aumento en la extensión del tallo (Morgan y Smith, 1977), permitiendo así proyectar las estructuras fotosintéticas hacia aquellas partes del ambiente donde el recurso luz está disponible. Otros cambios evocados en esta estrategia, son la reducción del número de ramificaciones o macollos (Deregibus *et al.*, 1983; Casal *et al.*, 1986), alargamiento de los pecíolos, aceleración de la senescencia de hojas basales (Rousseaux *et al.*, 1999) y de la floración, reduciendo la inversión de recursos en reservas y reproducción. Es común que el número de semillas disminuya 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). En canopeos en crecimiento, muchos de los cambios morfológicos y fisiológicos antes mencionados se anticipan a la competencia por RFA, debido a la percepción de señales relacionadas con disminuciones laterales en la R/RL causadas por el RL reflejado lateralmente por la vegetación vecina, aún antes de que exista sombreado mutuo entre plantas (Ballaré *et al.*, 1987; Ballaré *et al.*, 1990; Casal *et al.*, 1986.). Las respuestas a bajas relaciones R/RL son potencialmente adaptativas e incrementan la habilidad competitiva de las plantas (Ballaré *et al.*, 1989; Schmitt, 1997; Smith, 1982)

1.1.4. Ambiente lumínico asociado a la formación de claros en el canopeo

La formación de claros en un canopeo trae aparejado gradientes en la cantidad y calidad de luz, entre otras variables ambientales afectadas. Es así que una vez ocurrido el claro se genera un gradiente lateral en la R/RL y de luz azul que las plantas pueden utilizar como “guía” para repositionar las hojas y redirigir el crecimiento del vástago, ramas o brotación lateral hacia sitios con mayor cantidad de RFA (más luz azul y mayor R/RL; (Ballaré, 1994). Las plantas poseen la capacidad de explorar el ambiente que las rodea favoreciendo no sólo la captura de mejor calidad y cantidad de luz (Ballaré *et al.*, 1992), sino también la de nutrientes y agua.

1.1.5. Ambiente lumínico asociado a la densidad de los cultivos. Potenciales implicancias de la manipulación de la densidad sobre el rendimiento.

El ambiente lumínico asociado a los cultivos anuales, tiene la particularidad de cambiar drásticamente en la cantidad y calidad de luz a lo largo de todo el ciclo. Es así que en sistemas con labranza tradicional, las semillas se siembran sobre suelo desnudo, es decir bajo condiciones donde la radiación y calidad lumínica que recibirán las plántulas cuando emerjan es básicamente idéntica al de la luz solar directa (alta RFA y R/RL cercana a 1.2). Luego de emergidas, las plántulas van cubriendo el suelo a medida que desarrollan un mayor IAF. Esto implica cambios graduales en la calidad y cantidad de luz que llega a los estratos medio e inferior de un canopeo en desarrollo. Por un lado, la R/RL disminuye en dichos estratos debido a la reflexión lateral y transmisión diferencial de R y RL a medida que la luz atraviesa el dosel vegetal. La magnitud de estos cambios esta fuertemente asociado a la densidad del cultivo (cantidad de plantas por unidad de superficie), el arreglo espacial utilizado (diseño en surcos, diseño cuadrado, etc.), la disposición de las hojas dentro del canopeo (ubicación plana o erecta) y la forma de la lámina foliar (intuitivamente es fácil imaginar que dos cultivos con igual IAF no poseerán igual perfil de distribución de la cantidad y calidad de luz si poseen formas de las láminas y ángulo de inserción foliar contrastantes). El manejo de la densidad es una de las herramientas culturales más importantes al momento de optimizar la producción del cultivo. Densidades bajas implican

mayor disponibilidad de recursos por planta (agua y nutrientes) y mayor cantidad de luz disponible en los estratos medio y bajo del canopeo. La disminución de la R/RL en estos estratos no será tan pronunciada y por lo tanto las plantas presentan menor porte en altura, con menor inversión de asimilados en tallos, menor probabilidad de volcado, aunque con mayor desarrollo de ramas. Sin embargo bajas densidades tienen asociada la desventaja de interceptar poca radiación (dejando muchas veces parte del suelo desnudo) y con la consecuencia de alcanzar muy rápidamente un techo en el rendimiento por superficie debido, entre otros factores, a restricciones en el número de órganos cosechables por planta. La utilización de densidades mayores es conveniente desde el punto de vista que permite una rápida cobertura del suelo y colonización del espacio aéreo. Al haber mayor cantidad de plantas por unidad de suelo aumenta también la demanda de nutrientes y agua, así como también la luz pasa a ser factor limitante de la fotosíntesis en estratos medio e inferior del canopeo. Por otra parte las señales asociadas a la presencia de vecinas, tales como baja R/RL, y las respuestas de escape al sombreado asociadas serían potencialmente adaptativas para plantas heliófitas (Schmitt, 1997) que crecen en presencia de vecinas o bajo un canopeo. Sin embargo, no serían necesariamente ventajosas en cultivos, donde el ambiente dista bastante de las condiciones naturales donde fueron seleccionadas estas respuestas. Los cultivos se caracterizan por presentar alta uniformidad genética, control de malezas, patógenos, insectos, fertilización y en muchos casos riego. A parte del control de estas variables, el manejo de la densidad de cultivo (plantas por unidad de superficie) es crucial en el establecimiento final del rendimiento de los cultivos (producto cosechado por unidad de área). Incrementos en la densidad de cultivo producen un aumento del rendimiento hasta un óptimo, a partir del cual comienza a tener efectos negativos. Parte de estos efectos se deberían a una mayor competencia por recursos (luz, agua, nutrientes, etc.). Sin embargo a medida que crecen las plantas en altas densidades de cultivo, su capacidad individual para ajustar su morfología y fisiología en respuesta a menores R/RL que se establecen en ambientes cada vez más densamente poblados, también podría jugar un papel negativo sobre el establecimiento del rendimiento. Por lo tanto la densidad del cultivo y el grado de respuesta a las mismas (genotipos más o menos sensibles) son variables de ajuste que

pueden ser manipuladas para lograr incrementos en el rendimiento por superficie en la medida que los efectos negativos asociados a altas densidades no superen los positivos.

1.1.6. Ambiente lumínico relacionado con la inducción floral y tuberización

Tanto la calidad, cantidad de luz, así como la duración del día (fotoperíodo) controlan la transición floral.

En *Arabidopsis*, la luz azul y RL promueven la floración, mientras que la R parece tener un efecto inhibitorio del proceso floral (Simpson *et al.*, 2002). Bajas relaciones R/RL que ocurren a medida que un cultivo se hace más denso aceleran la floración (Halliday *et al.*, 1994). 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).

En los vegetales, la duración del día (fotoperíodo) tiene una influencia decisiva sobre la duración del crecimiento vegetativo, la época de floración y la tuberización. El fotoperiodismo es la respuesta biológica a un cambio en las proporciones de luz y oscuridad que tiene lugar en un ciclo diario de 24 horas (circadianos). 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.

Las plantas de papas (*Solanum tuberosum*) ajustan el momento en el cual tuberizan con el fotoperíodo. La mayoría de las especies y subespecies de papas son PDC. Dado que la papa es un cultivo estival, sensible a las bajas temperaturas, cuando los días se acortan por debajo de cierta cantidad de horas se producen estolones subterráneos que actúan como órganos de reserva capaces de perdurar durante el invierno y brotar nuevamente en la

primavera. Existen una subespecie de *Solanum tuberosum* ssp. *andígena* que es una PDC cualitativa, y sólo tuberiza con fotoperíodos iguales o menores a 12hs. Debido a su carácter estricto para inducir tuberización según el fotoperíodo, esta subespecie es muy usada en experimentos para estudiar efectos del fotoperíodo sobre la tuberización (Jackson, 1999). La interrupción de una noche larga (que debería promover la tuberización) con un breve pulso de R fue suficiente para inhibir por completo la tuberización y esta inhibición puede ser casi totalmente revertida por un pulso subsecuente de RL (Jackson, 1999). Esto pone en evidencia que las PDC en verdad inducen la tuberización sensando la duración de la noche, en lugar de sensar el largo del día. Así como también que existirían sistemas fotorreceptores que perciben distintas calidades de luz, capaces de interrumpir o revertir el efecto de pulsos suministrados en medio de la noche.

1.1.7. Manipulación artificial del ambiente lumínico a escala de cultivo.

La manipulación del ambiente lumínico es factible a través de la utilización de filtros, plásticos de colores, luces y espejos que pueden enriquecer o quitar diferencialmente ciertas partes del espectro. Utilizando la estrategia de modificar el ambiente lumínico, a través del uso de “*mulches*” plásticos de diferentes colores, el grupo del Dr. Kasperbauer del USDA, logró modificar diversas características cuali y cuantitativas del rendimiento de tomate (Kasperbauer y Hunt, 1998), zanahoria (Antonious y Kasperbauer, 2002), algodón (Kasperbauer, 2000a) y frutilla (Kasperbauer *et al.*, 2001; Kasperbauer, 2000b) entre otros cultivos.

Como se mencionó anteriormente, muchas especies de plantas poseen respuestas al fotoperíodo para controlar el momento de la floración. Mediante el control artificial del período de iluminación diurno o bien a través de la interrupción de la noche, floricultores y horticultores pueden provocar a voluntad la floración de plantas ornamentales en la fecha deseada, la obtención de frutos fuera de temporada, etc. Si bien la estrategia de modificar el ambiente lumínico puede ser ventajosa a pequeña escala y en productos de alto valor agregado, como pueden ser plantas ornamentales, es impracticable a escala de cultivo extensivo.

Hoy en día la posibilidad de manipulación genética a través de técnicas biotecnológicas, en conjunto al conocimiento de las bases fisiológicas de la detección de plantas vecinas o de la inducción floral, a modo de ejemplo, es la estrategia más efectiva para alterar la percepción y respuestas de señales lumínicas asociadas al ambiente del cultivo, con el fin de mejorar cuali o cuantitativamente el rendimiento de los mismos.

1.2. MECANISMOS DE PERCEPCION Y RESPUESTAS AL AMBIENTE LUMINICO

1.2.1. *Diferentes fotorreceptores controlan la percepción de luz en plantas*

El primer paso de la señalización o cadena de transducción lumínica comienza con la percepción de la luz por fotorreceptores especializados. Los mismos desencadenan una serie de eventos bioquímicos y moleculares que culminan con la regulación de la expresión de buena parte del genoma, que eventualmente le permiten a la planta responder fisiológicamente a cambios en la dirección, cantidad, calidad y duración de señales lumínicas del ambiente.

Existen al menos tres familias de fotorreceptores en las plantas: los **criptocromos** y **fototropinas** que absorben luz azul y radiación UV-A (Briggs *et al.*, 2001; Cashmore *et al.*, 1999) y los **fitocromos**, que absorben y responden principalmente a la R, RL y secundariamente a otras regiones del espectro (Quail, 2002). También existen evidencias acerca de la existencia de fotorreceptores de radiación UV-B (Ballaré *et al.*, 1995; Boccalandro *et al.*, 2001), aunque su naturaleza química y genética es aún desconocida.

La presencia de fotorreceptores no se limita a las plantas superiores sino que se encuentran distribuidos ampliamente entre los distintos reinos de los seres vivos.

1.2.2. **FOTORRECEPTORES DE LUZ AZUL: CRIPTOCROMOS Y FOTOTROPINAS**

Hace mucho tiempo que se sabe que las plantas son capaces de responder a la luz azul (Cashmore *et al.*, 1999). Sin embargo recién en 1993 fue publicada por primera vez la secuencia del primer fotorreceptor de azul identificado (*cry1*) (Ahmad y Cashmore, 1993). En *Arabidopsis* se han descrito dos criptocromos (*cry1* y *cry2*) y dos fototropinas (*phot1* y *phot2*), capaces de percibir luz azul y radiación UV-A.

Los **criptocromos** son cromoproteínas (moléculas que combinan una parte proteica o apoproteína y un cromóforo) que presentan en su extremo amino una importante

homología estructural (aunque no funcional) con las fotoliasas tipo I bacterianas y unen FAD (Flavín-adenin-dinucleótido) y MTHF (5,10-meteniltetrahidrofolato) como cromóforos (Cashmore *et al.*, 1999). Los extremos carboxilos de cry1 y cry2 poseen una extensión variable, que no se encuentra en las fotoliasas y que serían esenciales para su función (Yang *et al.*, 2000). La regulación de la transcripción de *CRY1* y *CRY2* es regulada por el reloj circadiano. Tanto *CRY1* como *CRY2* localizan en el núcleo. A diferencia de 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). Desde el punto de vista funcional cry1 media la inhibición de la elongación del hipocotilo por luz azul (Ahmad y Cashmore, 1993) y también promueve otras respuestas relacionadas con la des-etiolación (apertura de los cotiledones, síntesis de antocianas, flavonoides, etc.). 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 *et al.*, 2000).

Las **fototropinas** fueron identificadas más recientemente que los criptocromos y se nombraron phot 1 (Huala *et al.*, 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 LOV (Light Organ Voltage)/PAS (PER ARNT SIM) en la parte amino terminal de la molécula. phot1 y phot2 controlan respuestas a la luz azul de manera similar. Una vez que perciben la luz, PHOT1 y PHOT2 ponen en juego su actividad de quinasas de residuos serinas y treoninas, autofosforilándose e induciendo la transducción de la señal lumínica percibida (Christie *et al.*, 1998).

Funcionalmente las fototropinas median respuestas fisiológicas transitorias en respuesta a la luz azul, que sirven para incrementar la eficiencia fotosintética. Es así que regulan el fototropismo de tallos hacia la luz azul, el movimiento de los cloroplastos hacia bajas intensidades o bien en contra de altas intensidades de luz azul y la apertura de los

estomas. También modulan el fototropismo de raíces promoviendo su crecimiento en contra del estímulo lumínico.

1.2.3. FITOCROMOS

1.2.3.1. Estructura de los fitocromos

En *Arabidopsis* hay cinco fitocromos (phyA-phyE) y al menos seis en tomate (*Solanum lycopersicum*). Los fitocromos son cromoproteínas diméricas 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 implica: la percepción de la señal luminosa y la transducción en una señal bioquímica. En cada monómero pueden distinguirse dos grandes dominios estructurales y funcionales. En el dominio amino terminal, de aproximadamente 70 Kda, se encuentran los sitios necesarios para la unión del cromóforo y para mantener la especificidad fotosensorial (Wagner *et al.*, 1996) (Fig. 4A). En 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). Este tipo de dominio fue encontrado originalmente en un gran número de proteínas regulatorias de moscas y mamíferos (Huang *et al.*, 1993) y serían 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 estructuralmente con quinasas de residuos histidina, al menos phyA parece funcionar como una proteína quinasa de residuos serina (Yeh y Lagarias, 1998).

El grupo cromóforo absorbe principalmente R o RL, modificando su conformación. La excitación del cromóforo altera a la apoproteína y, por ende, su capacidad de acción biológica. La apoproteína condiciona las características fotoquímicas del cromóforo.

1.2.3.2. Familia de los fitocromos

Los fitocromos son codificados por una pequeña familia de genes (Clack *et al.*, 1994). En *Arabidopsis* hay cinco fitocromos (phyA a phyE), siendo los más abundantes el phyA y el phyB. En tomate existen dos phyB (B1 y B2). Dado que los genomas de tomate y papa (*Solanum tuberosum*) están estrechamente emparentados es factible que las papas también posean 6 fitocromos. El análisis filogenético de las secuencias de los genes de los fitocromos en *Arabidopsis* sugieren que se habrían originado por eventos de duplicación. El primer evento de duplicación 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* (Fig. 4B). 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*.

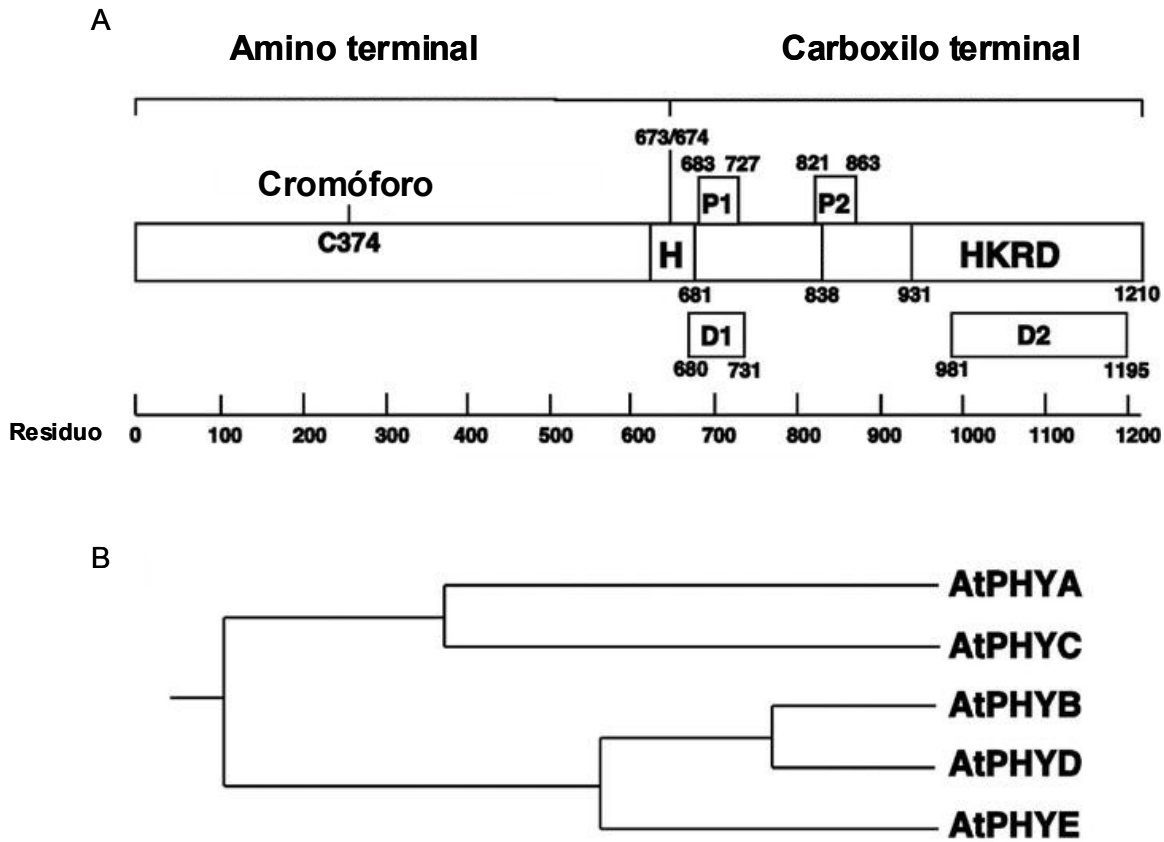


Figura 4. Estructura genérica de los fitocromos y origen filogenético de la familia de fitocromos de *Arabidopsis*. (A) Estructura de los dominios que componen una molécula genérica de fitocromo. La región N-terminal es el dominio fotosensor (posee el sitio de unión al cromóforo). La porción C-terminal posee función regulatoria. Ambas regiones se encuentran unidas por una región intermedia flexible (H). El sitio de unión al cromóforo (C374) está localizado en el dominio N-terminal. El dominio C-terminal contiene varias regiones motivo conservadas, incluyendo dos motivos de dimerización (D1 y D2), dos dominios PAS (P1 y P2) y un dominio relacionado con la función de kinasa de histinas (HKRD). (B) Esquema en árbol de la distancia filogenética entre los miembros de la familia de los fitocromos. Adaptado de Wang y Deng (2004), *The Arabidopsis book*, ASPB

1.2.3.3. 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 en R (660 nm) y es convertido en Pfr por la RL (730 nm). El Pfr es considerada la forma fotobiológicamente activa (Fig. 5).

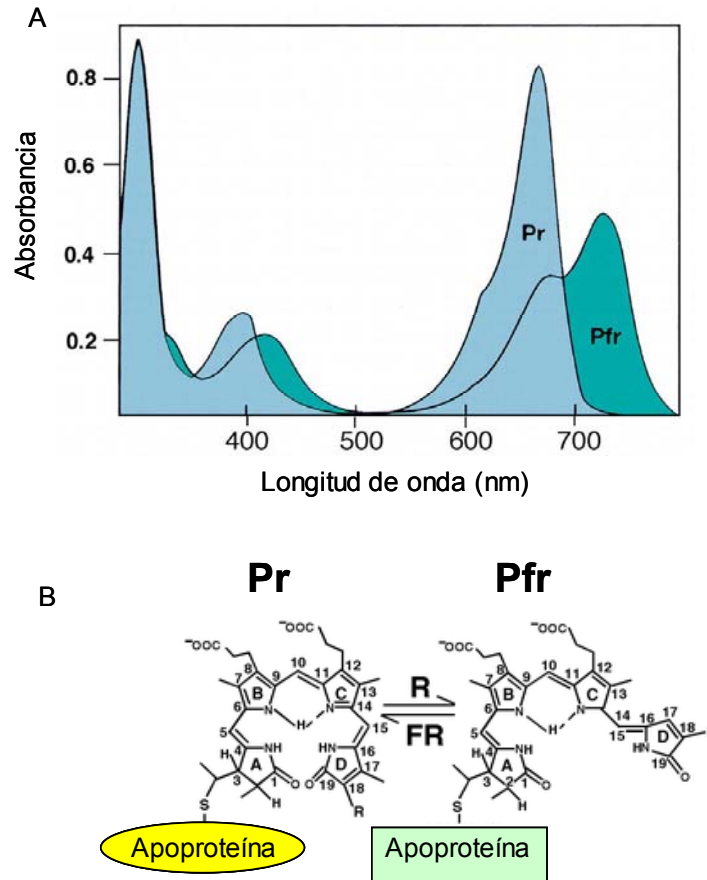


Figura 5. Espectro de absorción del fitocromo e interconversión de Pr a Pfr por luz R y RL. (A) Espectro de absorción de las formas Pr y Pfr de los fitocromos. La forma Pr tiene su pico de absorción en 660 nm y la Pfr en 730 nm. (B) La conversión de Pr a Pfr produce cambios en estructurales en el cromóforo que repercuten en la estructura de la apoproteína.

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 y cuando pasa a la forma Pfr se transloca hacia el núcleo (Nagy *et al.*, 2001). 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 plántulas etioladas todo el fitocromo se encuentra en la 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 de intermediario, a la formación del Pfr (Furuya y Song, 1994) (Fig. 5B).

La fotoconversión es un proceso fotorreversible, por lo tanto la absorción de luz RL por la forma Pfr regenera a la forma Pr (Fig. 6).

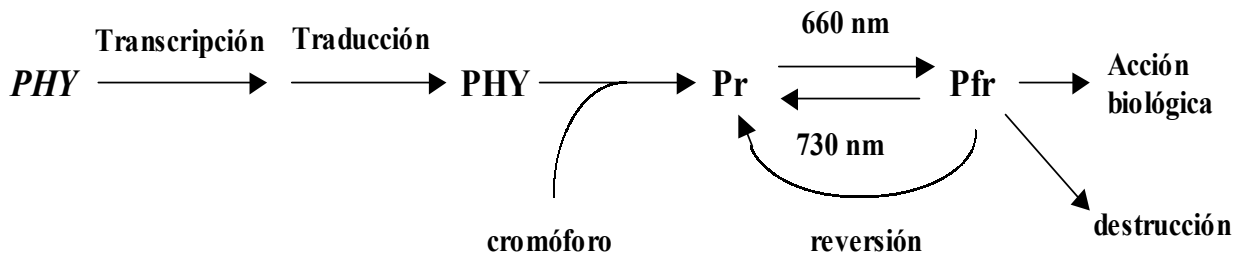


Figura 6: Diagrama de la fototransformación reversible del fitocromo.

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. 5A). 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 convierte un 87% del fitocromo a la forma Pfr, mientras que luz monocromática de 730 nm establece un 3% de Pfr/P. Cuando se exponen las plántulas a radiación policromática (por ej. radiación solar), el Pfr/P estará determinado principalmente por la proporción de R y RL de la luz incidente (Mancinelli, 1994). Cuanto mayor sea la 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 las moléculas de Pfr de phyA. Por último, la reversión del Pfr a Pr es una reacción más rápida que la destrucción pero muy lenta comparada con la fotoconversión de Pr a Pfr y por lo tanto, es cuantitativamente importante sólo en tratamientos 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. Más adelante se describirá el papel clave que juega COP1 en la degradación proteica de phyA. 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 ha sido observada *in vivo* para el phyA, e *in vitro* para el phyA y phyB. Es importante señalar que 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).

1.2.3.4. 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) 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 fallar en la inhibición del crecimiento del hipocotilo y apertura de los cotiledones en 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 la RL y 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 también 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 continua 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 de la R continua 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 de luz, 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.

1.2.3.5. Modos de acción mediados por el fitocromo A

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 continua 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 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, los mutantes *phyA302-1* y *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.*, 2002b). De este modo el *phyA302* separa los modos de acción VLFR y 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 delecionada. La hiperactividad depende del contexto del desarrollo pero siempre está limitada al VLFR. Contrariamente, el HIR está regulado negativamente por la misma deleción (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 deleciones y sustituciones del promotor de un gen fotosintético *LHCBI*2* fusionado a gen reportero

permitió identificar regiones que se requieren para la señalización del phyA vía 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 continua (translocación mediada por el HIR) (Kim *et al.*, 2000).

1.2.3.6. 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 continua. 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).

1.2.3.7. Modo de acción mediado por phyB

El phyB cumple un importante papel 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). Las respuestas mediadas por phyB, es decir en el modo de acción LFR, muestran 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 a la RL continua (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 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 papel inhibitorio 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 *et al.*, 1999). El dominio amino-terminal aislado de phyB, cuando se dimeriza se localiza en el núcleo y gatilla respuestas mayores 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).

1.2.3.8. Interacciones entre el *phyA* y el *phyB*

Los distintos modos de acción pueden interactuar entre sí favoreciendo o antagonizando su acción bajo distintas circunstancias, creando una compleja red de las tres cadenas de transducción de los fitocromos (VLFR, LFR y HIR).

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).

1.2.3.9. Los fitocromos C/D/E

Experimentos realizados con mutantes de *phyD*, *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 débil 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 R/RL (Franklin *et al.*, 2003). Estudios recientes realizados con dobles mutantes *phyB phyC* muestran que las plántulas no presentan una disminución en la sensibilidad a R, para regular la des-

etiología, comparado con el mutante simple *phyB*. El *phyC* participa en la percepción de la duración del día, dado que el mutante de *phyC* florece temprano en fotoperíodos de DC (al igual que *phyB*). En fotoperíodos de DL el doble mutante *phyA phyC* florecen más tarde que el mutante simple *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* (Monte *et al.*, 2003).

1.2.3.10. Jerarquía e interacciones de los fotorreceptores bajo radiación natural y en condiciones artificiales de luz.

En la naturaleza, las plantas están sujetas a numerosas señales lumínicas que estimulan más de un sistema fotorreceptor al mismo tiempo. A su vez, los fotorreceptores no actúan de modo independiente entre sí. La interacción entre las vías de señalización de los distintos fotorreceptores ha sido bien documentada tanto bajo condiciones controladas (Casal y Mazzella, 1998; Casal y Boccalandro, 1995) así como también bajo radiación natural (Mazzella y Casal, 2001). Es importante destacar que un fotorreceptor que cumple un papel preponderante mediando una respuesta bajo condiciones controladas, puede ser completamente redundante y prescindible bajo condiciones naturales para mediar la misma respuesta (Mazzella *et al.*, 2001). Sin embargo, también puede suceder exactamente lo contrario, un fotorreceptor que en condiciones controladas posee un papel limitado en mediar una respuesta, posee mayor jerarquía bajo condiciones naturales (Mazzella *et al.*, 2001). En la naturaleza existen fluctuaciones en la cantidad, calidad, dirección y duración del estímulo lumínico a lo largo del tiempo y el espacio que suman complejidad para predecir la respuesta resultante al ambiente lumínico. Si bien se conocen los papeles que juegan los fotorreceptores bajo condiciones lumínicas controladas, es difícil determinar que fotorreceptor/es o vía/s de señalización lumínica/s poseen mayor jerarquía bajo los distintos contextos ambientales. Es factible que la estimulación de una vía de señalización pueda verse potenciada o enmascarada por otra. Es por ello, que es necesario evaluar los mecanismos que fueron deducidos bajo condiciones artificiales, también bajo radiación natural.

1.3. SEÑALIZACIÓN O CADENA DE TRANSDUCCIÓN DE LOS FITOCROMOS

Luego de la percepción de la luz, ¿de qué modo los fitocromos inician su cadena de transducción? Gatillando tanto eventos nucleares como citoplasmáticos. Los eventos que cambian más rápidamente en la cadena de transducción de los fitocromos, tendrían lugar en el citoplasma, y son aquellos que ocurren modificando la conductancia iónica de la membrana plasmática (Folta y Spalding, 2001), la regulación de la movilidad citoplasmática a través de cambios en la red de actina (Takagi *et al.*, 2003) y la activación de la función quinasa (Yeh y Lagarias, 1998).

A pesar de estas evidencias, las respuestas citoplasmáticas mediadas por fitocromos son pobremente entendidas (Guo *et al.*, 2001; Okamoto *et al.*, 2001; Schafer y Bowle, 2002). En el núcleo, los fitocromos interactúan con factores de transcripción modulando directamente la expresión de genes (Martinez-García *et al.*, 2000). También en el núcleo, regulan negativamente la degradación proteica de factores que promueven la fotomorfogénesis (por ej. HY5). Esto lo hacen indirectamente, a través de la disminución de los niveles nucleares de COP1, una proteína con función regulatoria que etiqueta dichos factores para su degradación en oscuridad.

1.3.1. Proteínas G y segundos mensajeros en la señalización de los fitocromos

A través de las aproximaciones fisiológicas y farmacológicas se ha podido identificar la participación de la proteína G heterotrímica, del cGMP y Calcio (Bowler *et al.*, 1994) como componentes tempranos de la señalización de los fitocromos. Estudios recientes realizados con mutantes nulos simples y dobles de los genes *GPA1* (del inglés, *alpha subunit of heterotrimeric G protein*) y *AGB1* (del inglés, *beta subunit of heterotrimeric G protein*) han permitido reevaluar el papel de esta proteína en la transducción de señales del fitocromo, ya que no se evidenciaron cambios en la sensibilidad a la R y RL en los mutantes respecto de las plantas normales (Jones *et al.*, 2003). Por lo tanto estos estudios contradicen estudios previos que sugerían que esta proteína estaría involucrada en el control de la señalización de los fitocromos (Bowler *et al.*, 1994; Neuhaus *et al.*, 1993).

1.3.2. Actividad quinasa de los fitocromos

La posibilidad que los fitocromos fueran enzimas cuya actividad estuviera regulada por la luz fue planteada hace cerca de 40 años (Butler *et al.*, 1959). Durante los años 80 los datos bioquímicos han sugerido que el fitocromo de avena podría ser una proteína quinasa regulada por luz. El descubrimiento de fitocromos en bacterias (bacterio-fitocromos) tuvo dos consecuencias muy importantes. Por un lado sugiere un proceso histórico evolutivo, ya que se pensaba que sólo las plantas poseían fitocromos. Por otro lado potencian la hipótesis concerniente a que la actividad quinasa de los fitocromos es potencialmente importante en la regulación de procesos biológicos en las plantas. Apoyando la importancia biológica de la función quinasa de los fitocromos se descubrió que Cph1 (fitocromo de cianobacteria) de *Synechocystis* sp. puede unirse al cromóforo de los fitocromos de plantas autocatalíticamente y absorber R y RL de modo normal. Más aún, Cph1 mostró ser una quinasa de histidinas regulada por luz. La R inhibe la autofosforilación de Cph1 y la transfosforilación de Rcp1 (un regulador de la respuesta de Cph1) y la RL promueve ambos procesos (Yeh *et al.*, 1997; Lamparter *et al.*, 1997). Esto sugiere que la fosforilación y defosforilación de Rcp1 podrían ser fisiológicamente relevantes.

La fosforilación en plantas 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, aunque esto aún no ha sido 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 quinasa de histidinas bacteriana. Sin embargo, residuos críticos necesarios para la actividad quinasa 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 quinasa de histidinas ancestral de bacterias (Yeh y Lagarias, 1998) y se lo denominó HKRD (del inglés, *histidine kinase related domain*). Sin embargo, a diferencia de su contraparte en bacterias, los fitocromos fosforilan residuos serina/treonina y no

histidina/asparragina. Se ha demostrado que el phyA de avena tiene actividad de quinasa de serinas y treoninas (Yeh y Lagarias, 1998) y que es capaz de autofosforilarse y de fosforilar otras proteínas, siendo esta fosforilación dependiente de la luz.

Un estudio reciente mostró que phyA es sustrato de una fosfatasa, llamada FyPP (del inglés *flower-specific phytochrome-associated protein phosphatase*). FyPP defosforila a phyA de modo dependiente de luz y modula el control de la floración ejercido por phyA (Kim *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que la fosforilación y defosforilación de phyA podrían jugar un papel importante en regular ciertas funciones de los fitocromos *in vivo*. A pesar de esto, aún no hay muchas evidencias claras de que la actividad quinasa esté vinculada a la actividad biológica de este fotorreceptor.

1.3.3. Interacción de los fitocromos con otras proteínas

Una vez que los fitocromos absorben luz, cambian su conformación, pudiendo interactuar con otros componentes celulares e inducir su señalización hasta desencadenar una respuesta fisiológica.

Tanto la búsqueda de factores que interactúan con fitocromos, como estudios de interacción proteína-proteína permitieron identificar varias proteínas que interactúan con los fitocromos (PIFs, del inglés *phytochrome interacting factors*). Esto incluye a PIF3 (Ni *et al.*, 1998); PKS1 (Fankhauser *et al.*, 1999); NDPK2 (Choi *et al.*, 1999), criptocromos (CRY1 y CRY2) y las proteínas AUX/IAA (Ahmad *et al.*, 1998; Colon-Carmona *et al.*, 2000).

Algunas de estas interacciones revelaron que varios son sustratos *in vitro* de la actividad quinasa de los fitocromos. Por ej. cry1, cry2 y proteínas AUX/IAA interactúan con el phyA *in vitro* y serían sustratos de la actividad quinasa de phyA. La fosforilación del cry1 es estimulada por R *in vivo* (Ahmad *et al.*, 1998b). Estos resultados dan sustento molecular a las interacciones entre fitocromo y receptores de luz azul deducidas en experimentos fisiológicos previos (Casal y Boccacandro, 1995; Mohr, 1986). En 1999, Fankhauser *et al.* (1999), descubrieron el primer sustrato de la actividad quinasa de los

fitocromos, PKS1 (del inglés *phytocrome kinase substrate 1*) que al igual que los criptocromos interactúa con el carboxi-terminal del fitocromo (Fankhauser *et al.*, 1999). La fosforilación de 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 R, lo que sugiere la participación del fitocromo como proteína quinasa (Fankhauser *et al.*, 1999). PKS1, se ha encontrado únicamente en el citoplasma e interactúa con el extremo carboxi-terminal del phyA y phyB. 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 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 quinasa del fitocromo. Los mutantes fallan en R y RL sugiriendo interacción con phyA y phyB. Los sustratos de la actividad quinasa de fosforilación del fitocromo como el cry1, cry2, 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 *et al.*, 1998). La asociación del PIF3 al phyB se induce luego de exposiciones a R y este efecto puede revertirse con RL (Ni *et al.*, 1999). PIF3 es una proteína nuclear que fue previamente identificada como un regulador positivo de la señalización de phyB. Sin embargo, una reevaluación reciente de la función de PIF3 a través de la caracterización de mutantes de pérdida de función por inserción de T-DNA, así como también el uso de sobreexpresantes de este gen, mostraron que PIF3 regula negativamente la elongación del hipocotilo y la apertura de los cotiledones mediada por phyB, y promueve la inducción de la transcripción del gen *CHS* mediada por phyA y phyB (Kim *et al.*, 2003). Otro factor importante en la señalización de phyB es ARR4 (del inglés, *Arabidopsis Response Regulator 4*), que interactúa específicamente con el extremo amino-terminal de phyB, tanto *in vitro* como *in vivo*. La interacción entre ARR4 y phyB resultan en una estabilización de la forma Pfr del fotorreceptor. Plantas sobreexpresantes de *ARR4* presentaron un fenotipo hipersensible a la R presentando hipocotilos más cortos y floración retardada (Sweere *et al.*, 2001).

1.3.4. Elementos de la señalización de los fitocromos identificados por aproximación genética

La aproximación genética consistente en la búsqueda de mutantes que presentan alteraciones en las respuestas a la luz, constituye otra vía sumamente útil para identificar los componentes de la transducción de las señales lumínicas. Se han caracterizado en *Arabidopsis* tres categorías de mutantes que tienen alteradas las respuestas a luz, que no son mutantes alélicos de los fotorreceptores. La primera categoría comprende a un grupo particular de 11 loci pleiotrópicos, ubicados río abajo, conocidos como *COP/DET/FUS*, que codifican para elementos que reprimen la fotomorfogénesis en oscuridad (Chory *et al.*, 1989; Deng *et al.*, 1991; Mísera *et al.*, 1994). La mayoría de los mutantes de los loci *COP/DET/FUS* presentaron un fenotipo fotomorfogénico en oscuridad completa. De estos 11 loci, 8 forman parte del signalosoma COP9, (Chamovitz *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 2000) un homólogo del subcomplejo regulatorio 19S o tapa del proteasoma 26S de *Saccharomyces cerevisiae* y 3 genes no pertenecen a este complejo (*DET1*, *COP10* y *COP1*). *DET1* (De-etiolated 1) es una proteína nuclear que regula la transcripción de genes regulados por luz tanto en oscuridad como bajo luz. A pesar que su mecanismo de acción aún no ha sido claramente determinado, hay evidencias de que *DET1* estaría involucrado en el remodelamiento de la cromatina para cumplir su función (Chory *et al.*, 1989; Maxwell *et al.*, 2003). *COP10* sería una enzima del tipo E2 que conjuga ubiquitina y es parte de un complejo proteico capaz de interactuar directamente con *COP1* y el signalosoma COP9 (Suzuki *et al.*, 2002).

CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (*COP1*) es una proteína regulatoria que reprime la fotomorfogénesis en oscuridad, actuando río abajo de las cadenas de señalización de los fitocromos y criptocromos (Deng *et al.*, 1991a; Deng *et al.*, 1991b; Ang y Deng, 1994). Las plántulas mutantes *cop1* se des-etiolan en oscuridad (McNellis *et al.*, 1994) y el patrón de expresión de su transcriptoma en oscuridad es muy similar al del genotipo salvaje (WT) cultivado bajo luz (Ma *et al.*, 2002). Las plántulas sobreexpresantes de *COP1* (*COP1 OX*) o *COP1* fusionado a *GUS*, (*GUS-COP1 OX*) muestran una pobre des-etiolación bajo luz blanca, RL y azul (McNellis *et al.*, 1994b; Osterlund y Deng, 1998).

Actualmente, existe una buena correlación entre estructura, localización sub-celular y función de COP1. Estructuralmente COP1 es una proteína de 76KD que posee tres dominios. Un dominio *zinc-binding Ring-finger* (residuos 45-94), un dominio *coiled-coil* (*Helix*, residuos 128-209) y un dominio de repeticiones WD-40 (residuos 386-619) (Deng *et al.*, 1992). COP1 es una proteína de ubicación núcleo-citoplasmática. En oscuridad, la importación al núcleo de COP1 es mediada por una señal de localización nuclear (NLS) ubicada en el dominio central de COP1 (residuos 293-314, Stacey *et al.*, 1999). Entre los alelos débiles *cop1*, *cop1-6* está afectado en la NLS (Stacey *et al.*, 1999), *cop1-4* carece del fragmento C-terminal, incluyendo la NLS y el dominio con repeticiones de WD-40 (McNellis *et al.*, 1994) y *cop1^{eid6}* está afectado en el dominio *RING* (Dieterle *et al.*, 2003). Se puede predecir que las proteínas producidas por los alelos *cop1-4* y *cop1-6* localizarían en el citosol. En oscuridad las plántulas de *cop1-4* y *cop1-6* están des-etioladas mientras que *cop1^{eid6}* están etioladas (McNellis *et al.*, 1994a; Dieterle *et al.*, 2003). A nivel molecular COP1 actúa como ligasa de ubiquitina, del tipo E3 dentro del núcleo, confiriendo especificidad de sustrato por reconocimiento directo de las proteínas sustrato (Saijo *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2004).

El efecto represor de COP1 sobre la fotomorfogénesis en oscuridad, resulta de una interacción directa con reguladores positivos de la fotomorfogénesis tales como HY5, y su homólogo HYH, los cuales, como resultado de esta interacción quedan etiquetados (ubiquitinados) para degradación por el proteasoma 26S (Holm *et al.*, 2002; Osterlund, 2000). Luego de la percepción lumínica, muchos fotorreceptores inducen la re-localización de COP1 hacia el citosol (Osterlund y Deng, 1998), incrementando de este modo la cantidad de factores de transcripción que promueven la fotomorfogénesis (por ej. HY5) en el núcleo. La exclusión nuclear de COP1 requiere una señal de localización citoplasmática (CLS) que se superpone con el dominio *Helix* (Stacey *et al.*, 1999). Consecuentemente en la luz, la cantidad de factores de transcripción (por ej. HY5 y HYH) que inducen la fotomorfogénesis, aumentan en el núcleo, gatillando las respuestas inducidas por luz. Sin embargo, la función de COP1 no sólo depende de su localización subcelular. De hecho, su acción represora de la fotomorfogénesis puede ser modificada de manera positiva o

negativa por proteínas conocidas como CIP (del inglés: *COP1 Interactive Proteins*). CIP1, CIP4 y CIP7 modularían negativamente la función represora de COP1, mientras que CIP8 la promovería positivamente (Hardtke y Deng, 2000).

COP1 no sólo juega un papel en oscuridad, regulando negativamente la fotomorfogénesis en oscuridad. Existen evidencias que apoyan funcionalidad de COP1 modulando las respuestas mediadas por luz durante distintas etapas del ciclo de vida de *Arabidopsis*. Primero, mutantes *cop1* presentan fotomorfogénesis exagerada tanto en estadio de plántula como de adulta (por ej. en el estadio de plántula *cop1* no responde al tratamiento de pulsos del final del día de RL, y en el estadio de adultas presenta un fenotipo semi enano que carece de percepción de fotoperíodo (McNellis *et al.*, 1994)). Segundo, COP1 interactúa con componentes de la cadena de transducción de señales lumínicas. Si bien muchos de los experimentos que sustentan esto último fueron realizados *in vitro* en condiciones, existen evidencias que al menos parte de estas interacciones ocurrirían bajo luz. Particularmente COP1 interactúa físicamente con al menos tres fotorreceptores: el criptocromo 1, phyB (Yang *et al.*, 2001) y phyA (Seo *et al.*, 2004) y con varios elementos de la señalización de fotorreceptores (Hoecker y Quail, 2001). Recientemente se descubrió que COP1 puede modular las respuestas inducidas por RL. En este caso, cuando quedan bajos niveles nucleares de COP1 por acción de la luz, COP1 interactúa con SPA1 y ubiquitina a HY5 (Saijo *et al.*, 2003) y LAF1 (Seo *et al.*, 2003), un factor de transcripción MYB que promueve la fotomorfogénesis mediada por phyA (Ballesteros *et al.*, 2001). A su vez, la actividad de COP1 es incrementada por SPA1, un regulador negativo de la señalización de phyA cuya transcripción es estimulada por RL. Sin embargo el fenotipo de *spal* (plántulas más des-etioladas que el WT) se puede observar bajo RL o R, pero no en oscuridad (Hoecker *et al.*, 1998). El efecto represor de COP1 sobre la fotomorfogénesis resulta de una interacción directa con reguladores positivos de la fotomorfogénesis tales como HY5 y su homólogo HYH, los cuales, como resultado de esta interacción quedan etiquetados para degradación vía el proteasoma 26S (Osterlund *et al.*, 2000; Holm *et al.*, 2002). Luego de la percepción lumínica, muchos fotorreceptores inducen la re-localización de COP1 hacia el citosol (Osterlund y Deng, 1998), incrementando de este modo la

cantidad de factores de transcripción que promueven la fotomorfogénesis (por ej. HY5) en el núcleo.

A nivel molecular COP1 actúa como una E3 ligasa para regular la cadena de transducción de phyA a través del etiquetamiento directo del fotorreceptor phyA en sí mismo (Seo *et al.*, 2004). A parte, el alelo *cop1^{eid6}*, retuvo un fenotipo etiolado normal en oscuridad pero mostró mayor sensibilidad a RL para el control del alargamiento del hipocotilo y acumulación de antocianinas (Dieterle *et al.*, 2003). Por lo tanto, COP1 reprime la señalización mediada por phyA bajo RL. Esta acción podría ser independiente de su función represora en la oscuridad ya que el mutante débil *cop1-4* falla en etiolarse en oscuridad pero retiene sensibilidad normal al RL. COP1 podría regular diferencialmente las respuestas de phyA y phyB.

El segundo grupo de mutantes identificados por aproximaciones genéticas, 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) y estaría ubicado río abajo en la cadena de transducción de los mismos. *pefl* 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 Cashmore, 1996). Al igual que *pefl* los mutantes *ndpk2*, *cog1*, *pft1*, *prp7* y *psi2* presentan menor respuesta a la R y RL por lo que serían reguladores positivos que modulan las respuestas de phyA y phyB (Wang y Deng, 2004; Gyula *et al.*, 2003). Otros mutantes, sin embargo, sólo afectan las respuestas a longitudes de onda específicas. Por ejemplo, los mutantes *red1*, *pef2*, *pef3*, *elf3*, *elf4*, *gi*, *srr1*, *srl1* presentan disminuidas las respuestas al R en el rango del LFR, pero no las respuestas al RL (Quail, 1998; Wang y Deng, 2004). Los mutantes *fhy1* y *fhy3* afectan las respuestas mediadas por el phyA al RL continuo (Whitelam *et al.*, 1993) al igual que *far1* (Hudson *et al.*, 1999) *pat1* (Bolle *et al.*, 2000), *laf1* (Ballesteros *et al.*, 2001), *laf6* (Møller *et al.*, 2001), *hfr1* (Fairchild *et al.*, 2000), *fin219* (Hsieh *et al.*, 2000), *fin2* y *fin3* (Wang y Deng, 2004). Las proteínas normales de estos genes actúan como reguladores positivos en las respuestas bajo RL continuo. Los mutantes

spa1 (Hoecker *et al.*, 1998), *eid1* (Dieterle *et. al.*; 2001), *cp3* (Luccioni *et al.*, 2002), 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.

Muchos de los mutantes que presentan respuestas alteradas a la luz también presentaron alteración en el tiempo a floración y viceversa. 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). En PDL es necesaria la coincidencia entre la fase de expresión regulada por reloj biológico de un gen denominado *CONSTANS* (con pico de expresión en oscuridad) y la luz para inducir la floración (Yanovsky, 2002a). Es por esta estrecha conexión entre la percepción de la luz y reloj biológico para regular el tiempo a floración, que muchos mutantes poseen alteradas respuestas a la luz (por ej. des-etiolación) y en el tiempo a floración.

1.4. REGULACION DE LA SENSIBILIDAD A LA LUZ

1.4.1. Cambios en la sensibilidad a lo largo del ciclo de vida

A pesar de la aparente complejidad que exhiben las condiciones naturales; a lo largo de la evolución las plantas adquirieron la capacidad para discriminar el “ruido del ambiente” y responder solamente a las señales ambientales cruciales para el contexto del desarrollo en el que se encuentra. A tal fin, las plantas son capaces de cambiar su sensibilidad a señales del ambiente según la situación actual y su estadio de desarrollo. Por ejemplo, si una plántula emergió bajo un canopeo, la percepción de RL en forma continua estimulará al phyA, a través de su modo de acción HIR permitiendo de este modo percibir luz de oscuridad y estimular la des-etilación de la misma. Sin embargo si este modo de acción persistiera durante todo el ciclo de vida, la plántula no sería capaz de distinguir que emergió bajo otras plantas, evocar las respuestas de escape al sombreado y su capacidad para cosechar RFA serían menores, ya que permanecería situada bajo el canopeo. Paulatinamente el phyA pierde su papel preponderante y el phyB pasa a cumplir el mismo, detectando la R/RL actual. De este modo la planta puede percibir la presencia de vecinas (debido a los bajos niveles de Pfr establecidos), desencadenándose el síndrome de escape al sombreado que le confiere mayor habilidad para ubicar las hojas en sitios con mejor calidad y cantidad de luz. Es decir que a través de modificaciones en la jerarquía que posee cada fotorreceptor en distintos momentos del desarrollo, se estableció un cambio en la sensibilidad al ambiente lumínico, dando mayor jerarquía a un tipo de señal lumínica del ambiente (R/RL en este caso).

1.4.2. Mejoramiento genético a través de la producción de plantas transgénicas con sensibilidad alterada al ambiente lumínico

La habilidad de las plantas para ajustar su morfología y fisiología en respuesta a la presencia de otras plantas en ambientes naturales podría jugar un papel negativo en condiciones de un cultivo monoespecífico. En este sentido, plantas de girasol (*Helianthus annuus*) cultivadas a muy baja densidad, rindieron menos en peso de granos cuando el

crecimiento del tallo fue estimulado localmente con filtros que establecieron bajas relaciones R/RL en los entrenudos en crecimiento (Libenson *et al.*, 2002). El aplacado de las respuestas a bajas relaciones R/RL a través de manipulación genética de los genes de los fitocromos podría resultar en cultivos con mayor proporción de recursos localizados en el material a cosechar, en lugar de órganos no cosechables (Smith, 1992). La expresión moderada de fitocromo A de avena (*Avena sativa*) en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), produjo una reducción en el largo del tallo y en el índice de cosecha (calculada en este caso como la proporción de biomasa fresca localizada en hojas respecto a la biomasa fresca localizada en tallos) siendo este efecto más evidente en altas densidades de cultivo (Robson y Smith, 1996). Sin embargo, como en este trabajo sólo se presentaron datos del índice de cosecha y no del peso seco de hojas, no fue posible evaluar si el menor crecimiento de los tallos con respecto a las hojas, se tradujo en mayor rendimiento de cultivo de tabaco transgénico. También se produjeron plantas de papa (*Solanum tuberosum*) transgénicas que sobreexpresan *PHYB* ectópico de *Arabidopsis thaliana* que incrementaron el rendimiento en tubérculos cuando fueron cultivadas en macetas en el invernáculo (Thiele *et al.*, 1999) indicando que esta estrategia podría ser potencialmente beneficiosa para lograr mejores rendimientos a campo.

1.5. OBJETIVOS de la TESIS y ESTRATEGIAS a UTILIZAR

1.5.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar mecanismos mediante los cuales las plantas modulan la sensibilidad a la luz y de que modo su alteración, es útil para aplacar el impacto negativo de señales lumínicas asociadas a altas densidades de cultivo sobre el rendimiento.

1.5.2. ESTRATEGIAS A UTILIZAR

Para cumplimentar este objetivo se utilizarán distintas estrategias.

Primero se estudiarán las funciones de elementos que podrían jugar un papel en la modulación de la sensibilidad a la luz y por lo tanto ser potencial blanco para alterar la sensibilidad a la densidad del cultivo.

Particularmente se analizarán elementos ubicados río arriba (PKS1 y PKS2) y río abajo (COP1) en la señalización de los fotorreceptores, bajo condiciones lumínicas controladas en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (secciones 2.1. y 2.2.).

Las respuestas en condiciones controladas pueden diferir de lo que ocurre bajo radiación natural. A fin de evaluar si es factible disminuir la sensibilidad a señales lumínicas asociadas a altas densidades de cultivo se cultivarán plantas de *Arabidopsis* mutantes para *pks1*, *pks2*, sobreexpresantes de *COP1* y de *PHYB* en distintas densidades bajo radiación natural (sección 2.3.).

Para poner a prueba el potencial impacto que produce modificar la sensibilidad a la luz sobre el rendimiento de cultivos a escala agronómica, se abordarán ensayos a campo con plantas de papa transgénicas, que sobreexpresan fitocromo B de *Arabidopsis thaliana*. Es decir un fotorreceptor que posee función preponderante en la percepción de señales lumínicas, asociada a la presencia de plantas vecinas es bien conocida (sección 2.4.).

Por último, es objetivo de esta tesis lograr una ubicación de los hallazgos en el contexto del conocimiento actual en los temas abordados y su proyección futura en investigación básica y aplicada (Capítulos 3 y 4).

CAPITULO 2:

2.1. MODULACION DE LA SENSIBILIDAD A LA LUZ POR PKS1 Y PKS2.

2.1.1. INTRODUCCIÓN

La primera etapa de esta tesis implica el estudio de componentes involucrados en la señalización de los fitocromos y dilucidar su papel en la modulación de la sensibilidad al ambiente lumínico.

A pesar de que muchos elementos de la cadena de transducción ya han sido identificados, su conocimiento era pobre al comienzo de esta tesis. Aun hoy los roles exactos y ubicaciones jerárquicas que ocupan la mayoría de estos intermediarios en la red de vías de señalización de los fitocromos no han sido profundamente entendidos (Quail, 2002). Al inicio de esta tesis fue identificada una proteína de ubicación citoplasmática, ubicada río arriba en la cadena de transducción de los fitocromos y de función casi desconocida, llamada PKS1 (del inglés *Phytochrome Kinase Substrate 1*). La misma es el primer sustrato identificado para la actividad quinasa de los fitocromos e interactúa *in vitro* tanto con phyA como phyB, y su fosforilación es estimulada por R *in vivo* (Fankhauser *et al.*, 1999). Resultados fisiológicos, derivados del análisis de la des-etiolación de una línea sobreexpresante de *PKS1*, indicarían que PKS1 interferiría con la cadena de señalización de phyB (Fankhauser *et al.*, 1999). Esto ubica a PKS1 como un candidato posible para regular respuestas a la densidad de cultivo, donde phyB juega un papel preponderante.

Los **objetivos** de este Capítulo son: (a) analizar el papel fisiológico de PKS1 y su homólogo más cercano PKS2, en la regulación de la fotomorfogénesis inducida por fitocromos; (b) analizar la regulación por luz de la transcripción y localización tisular de mensajeros *PKS1* y *PKS2*, así como también la regulación de la traducción de PKS1 por luz y (c) analizar la interacción entre PKS1 y PKS2 en la regulación de la des-etiolación de *Arabidopsis* tanto a nivel molecular como fisiológico.

2.1.2. RESULTADOS

2.1.2.1. El *phyA* juega un papel central en la regulación de la expresión de *PKS1*

Dado que *PKS1* es una proteína que interactúa con fitocromos, se investigó su expresión bajo las porciones del espectro que estimulan más eficientemente a *phyA* (es decir RL) o a *phyB* (es decir R). *PKS2* (At1g14280), el homólogo más cercano a *PKS1* en el genoma de *Arabidopsis*, fue incluido en el análisis con el fin de conocer su función. Estos genes están localizados en un extremo del cromosoma 2 y en el medio del cromosoma 1, respectivamente, dos regiones que provienen de una duplicación evolutivamente reciente. Los niveles de mensajero de *PKS1* exhibieron un pico entre 1 y 2 hs. en respuesta al R o RL (Fig. 7A). La inducción temprana estimulada por luz fue mucho más débil para *PKS2*. Sin embargo luego de 18 hs. ocurrió un segundo incremento en los niveles de mensajero de *PKS2* (Fig. 7A).

También se investigaron las contribuciones de *phyA* y *phyB* en la regulación de la expresión de *PKS1* y *PKS2* comparando su expresión en plantas WT con la de los mutantes nulos de *phyA* (*phyA-211*) y de *phyB* (*phyB-9*). Como era de esperar, la carencia de *phyA* suprimió la inducción por RL de la expresión de *PKS1* y *PKS2*, confirmando que *phyA* es necesario para la inducción de la expresión de *PKS1* y *PKS2* bajo RL (Fig. 7B). Los niveles de mensajeros de *PKS1* y *PKS2* se acumularon con niveles similares a los del WT, en el mutante *phyB-9* cuando fue estimulado con luz R (datos no mostrados). En el mutante *phyA-211*, la inducción rápida y transiente de los mensajeros de *PKS1* y *PKS2* en R disminuyeron, y el segundo pico de *PKS2* no se vio demasiado afectado (Fig. 7B). A pesar que no se puede excluir un papel para *phyB*, estos resultados indican que *phyA* es responsable de la expresión de *PKS1* y *PKS2* en RL y que juega un papel más significativo que *phyB* en la inducción de *PKS1* y *PKS2* por R.

Estos resultados indican que *phyA* es efectivo bajo R, una condición en la cual *phyA* es incapaz de mediar respuestas HIR. Por lo tanto, se investigó si la inducción mediada por *phyA* de la expresión de *PKS1*, podía ser gatillada por el modo VLFR del *phyA*. Al suministrar uno o unos pocos pulsos de RL se logró una fuerte inducción de *PKS1* indicando que cuando *phyA* opera en el modo VLFR, es suficiente para la expresión de *PKS1* (Fig. 7C). Curiosamente el patrón de inducción de *PKS1* en respuesta a pulsos de

RL o bien bajo tratamientos de luz continua, fueron muy similares (Fig. 7). La inducción rápida de *PKS1* fue siempre transiente, sugiriendo adaptación a nuevas condiciones.

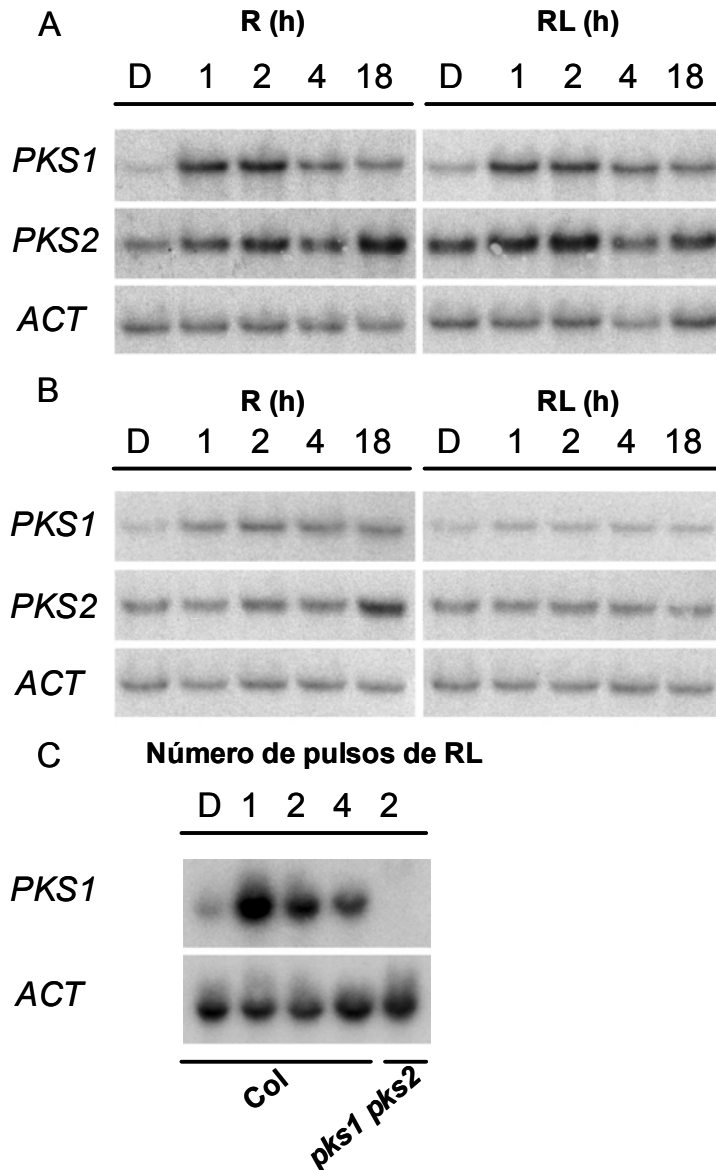


Figura 7. *phyA* controla la expresión de *PKS1* y *PKS2*.

(A) Análisis de ARN (northern blot) de plántulas WT etioladas (de 5 días de edad) tratadas durante 0 (D), 1, 2, 4, o 18 h en R o RL continua, hibridado con las sondas *PKS1*, *PKS2* y *ACT*.

(B) Análisis de ARN de plántulas etioladas (de 5 días de edad) de *phyA-211* tratadas e hibridadas del mismo modo que en (A).

(C) Análisis de ARN (*northern blot*) de plántulas WT etioladas (de 3 días de edad) tratadas con 0 (D), 1, 2 o 4 pulsos de 3 minutos de RL, suministrados cada hora. También se incluyó como control al doble mutante *pks1 pks2* tratado con 2 pulsos de RL. La membrana fue hibridada con las sondas de *PKS1* y *ACT* como control de carga. Col: WT, accesión Columbia. Los geles e hibridaciones de los northern fueron realizados en el laboratorio del Dr. Fankhauser (Suiza).

2.1.2.2. Los patrones de expresión de *PKS1* y *PKS2* se superponen sólo bajo RL

Luego de varios días de exposición a la luz B, la expresión de *PKS1* en el hipocotilo disminuye, mientras que perdura en la raíz. Para determinar el rol de los diferentes fitocromos en esta respuesta, se cultivaron plantas transgénicas que portaban el gen reportero *GUS* bajo el control de los promotores *PKS1* o *PKS2* bajo tratamientos de pulsos

horarios de RL, RL continua o pulsos horarios de R (es decir condiciones donde predominan las respuestas VLFR de phyA, HIR de phyA o LFR de phyB respectivamente (Yanovsky *et al.*, 1997). La expresión de *PKS1* en las raíces fue inducida por todos los tratamientos lumínicos, aunque con distinta intensidad (Fig. 8A). Contrastantemente, *PKS2* no se expresó nunca en la raíz (datos no mostrados). La expresión de *PKS1* fue significativa en el hipocotilo de plántulas cultivadas por 3 días bajo pulsos horarios de RL o RL continua, mientras que los efectos de pulsos horarios de R produjeron una pobre acumulación de *PKS1* en el hipocotilo, de modo similar a lo que ocurre bajo B (Fig. 8A; datos no mostrados). *PKS2* se expresó en los cotiledones y en la parte superior del hipocotilo bajo todas las condiciones lumínicas experimentadas (Fig. 8B). Por lo tanto, sólo existe superposición en el sitio de expresión de *PKS1* y *PKS2* en la parte superior del hipocotilo bajo exposición prolongada a RL (suministrado como pulsos o continua).

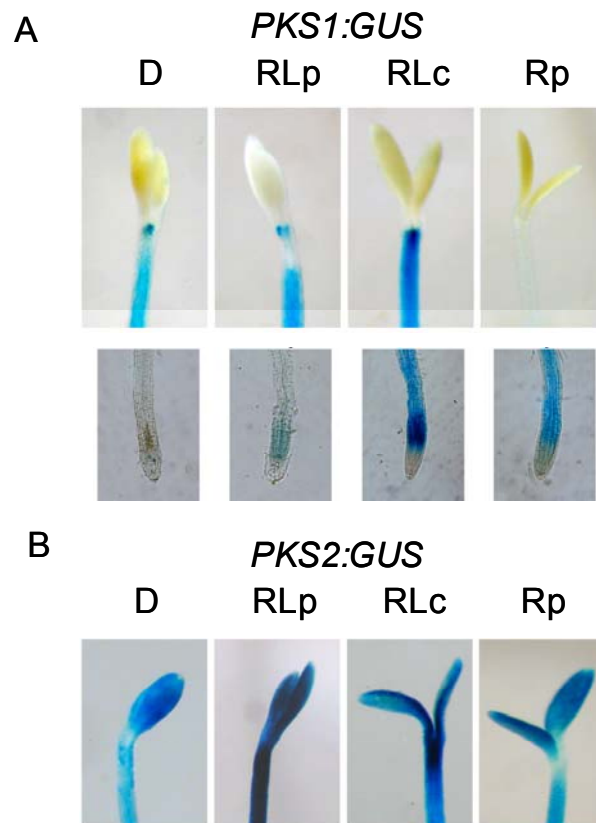


Figura 8. La luz regula la expresión de *PKS1* y *PKS2* específicamente en ciertos tejidos. (A) Plántulas transgénicas de *PKS1-GUS* cultivadas durante 3 días en oscuridad (D), pulsos horarios de RL (RLp), pulsos horarios de R (Rp), o RL continua (RLc). (B) Plántulas transgénicas de *PKS2-GUS* tratadas como fue descrito en (A).

2.1.2.3. Regulación de la acumulación de *PKS1* por calidad de luz

La acumulación de la proteína *PKS1* fue inducida transientemente en respuesta a luz blanca (Fig. 7B). Para determinar si esa respuesta fue dependiente de la calidad de luz, se transfirieron plántulas etioladas a varios tratamientos de luz monocromáticos. Cuando fueron transferidas a R, *PKS1* se acumuló transientemente, con un máximo a las 4 h de transferidas (Fig. 9A). Por otro lado, los tratamientos de RL indujeron una acumulación progresiva de *PKS1* (Fig. 9B).

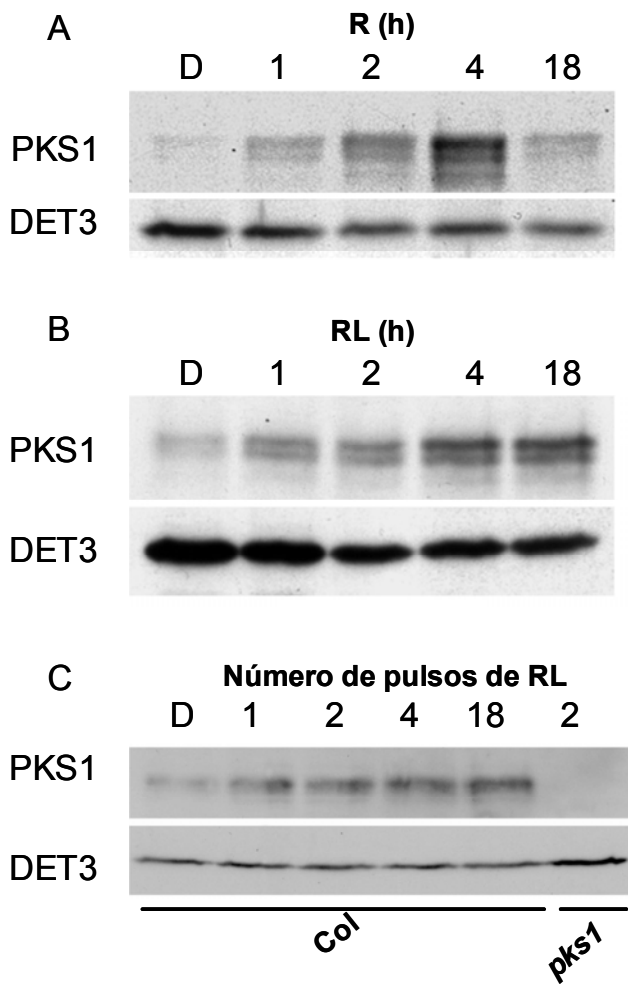


Figura 9. La calidad de luz regula la acumulación de la proteína *PKS1*.

(A) Análisis de inmunoblot (*western blot*) de plántulas etioladas WT de 5 días de edad, transferidas durante 0 (D), 1, 2, 4, o 18 h a R continua.

(B) Análisis de inmunoblot de plántulas etioladas WT de 5 días de edad, transferidas durante 0 (D), 1, 2, 4, o 18 h a RL continua.

(C) Análisis de inmunoblot de plántulas etioladas WT de 3 días de edad, tratadas con 0 (D), 1, 2, 4, o 18 pulsos horarios de RL y un mutante *pks1* tratado con 2 pulsos de RL como control. Todas las transferencias de los geles fueron incubados con anticuerpos anti-*PKS1* y -*DET3* (usado como control de carga). Col: WT Columbia; D: oscuridad. Los geles e incubaciones con los anticuerpos fueron realizados en el laboratorio del Dr. Fankhauser (Suiza).

El hecho que en RL los niveles de proteína *PKS1* aumenten, mientras que sus mensajeros decrecen, sugiere que la expresión de *PKS1* es regulada post-transcripcionalmente por phyA. Con respecto a la inducción de la transcripción de *PKS1*, un simple pulso de RL fue suficiente para incrementar también los niveles de *PKS1* (Fig.

9C), demostrando que la regulación de la acumulación proteica de PKS1 es vía VLFR. Cuando el tratamiento de pulsos horarios de RL fue extendido por 18 hs., los niveles de PKS1 permanecieron altos (Fig. 9C), como se observó para PKS1 luego de transferir las plántulas a RL continua (Fig. 9B).

2.1.2.4. Caracterización de los mutantes nulos *pks1* y *pks2*

La función de PKS1 había sido estudiada a través del fenotipo resultante de sobreexpresar *PKS1* (Fankhauser *et al.*, 1999). Sin embargo, la interpretación de los fenotipos por ganancia de función es difícil en la ausencia del fenotipo de los que pierden función. Por lo tanto, en este Capítulo se utilizaron alelos nulos (por inserción de T-DNA) de *PKS1* y *PKS2*, desarrollados en el laboratorio del Dr. Fankhauser en Suiza.

Para determinar si PKS1 y PKS2 están involucrados específicamente en alguna de las vías de señalización de los fitocromos, se analizaron los fenotipos de los mutantes simples nulos bajo pulsos horarios de RL, RL continua y pulsos horarios de R. Estas condiciones permitieron distinguir si afectaban al phyA actuando en el modo VLFR, al phyA actuando en el modo HIR o a phyB actuando en el modo LFR (Yanovsky *et al.*, 1997). En los controles de oscuridad, el crecimiento del hipocotilo no fue afectado (WT, 11.0 ± 0.4 mm; *pks1*, 11.5 ± 0.4 mm; *pks2*, 11.3 ± 0.5 mm) y los cotiledones permanecieron completamente cerrados. Comparado con el WT, la inhibición del alargamiento del hipocotilo y la apertura de los cotiledones en respuesta a pulsos horarios de RL fueron significativamente mayores en *pks1* y *pks2* ($P < 0.001$) (Fig. 10 A y B). La inhibición del crecimiento del hipocotilo y la apertura de los cotiledones bajo pulsos horarios de RL, son normalmente mediadas por el phyA (Yanovsky *et al.*, 1997). La mutación de phyA fue epistática para *pks1* y *pks2*, porque *phyA*, *phyA pks1* y *phyA pks2* no mostraron respuesta a pulsos horarios de RL (Fig. 10 A y B). Estos hallazgos indican que phyA fue requerido para producir la mayor respuesta a pulsos horarios de RL, observada en *pks1* y *pks2*. No se observaron diferencias entre el WT, *pks1* y *pks2* bajo tratamientos de pulsos horarios de R (Fig. 10 C y D) o RL continua (Fig. 10 E y F). Bajo pulsos horarios de R, las mutaciones *pks1* y *pks2* tampoco tuvieron efecto en el acervo genético de la mutación de *phyA* (Fig. 10 C y D), indicando que la señalización de phyA no enmascaró un efecto de PKS1 o PKS2 sobre la cadena de transducción de phyB. Estos experimentos indican que PKS1 y PKS2 afectan selectivamente la vía VLFR de phyA. A pesar que la inducción de la acumulación

de mensajeros de *PKS1* en las raíces, nosotros no observamos un fenotipo obvio en el crecimiento de las raíces del mutante *pkS1* (datos no mostrados) bajo estos tratamientos de luz.

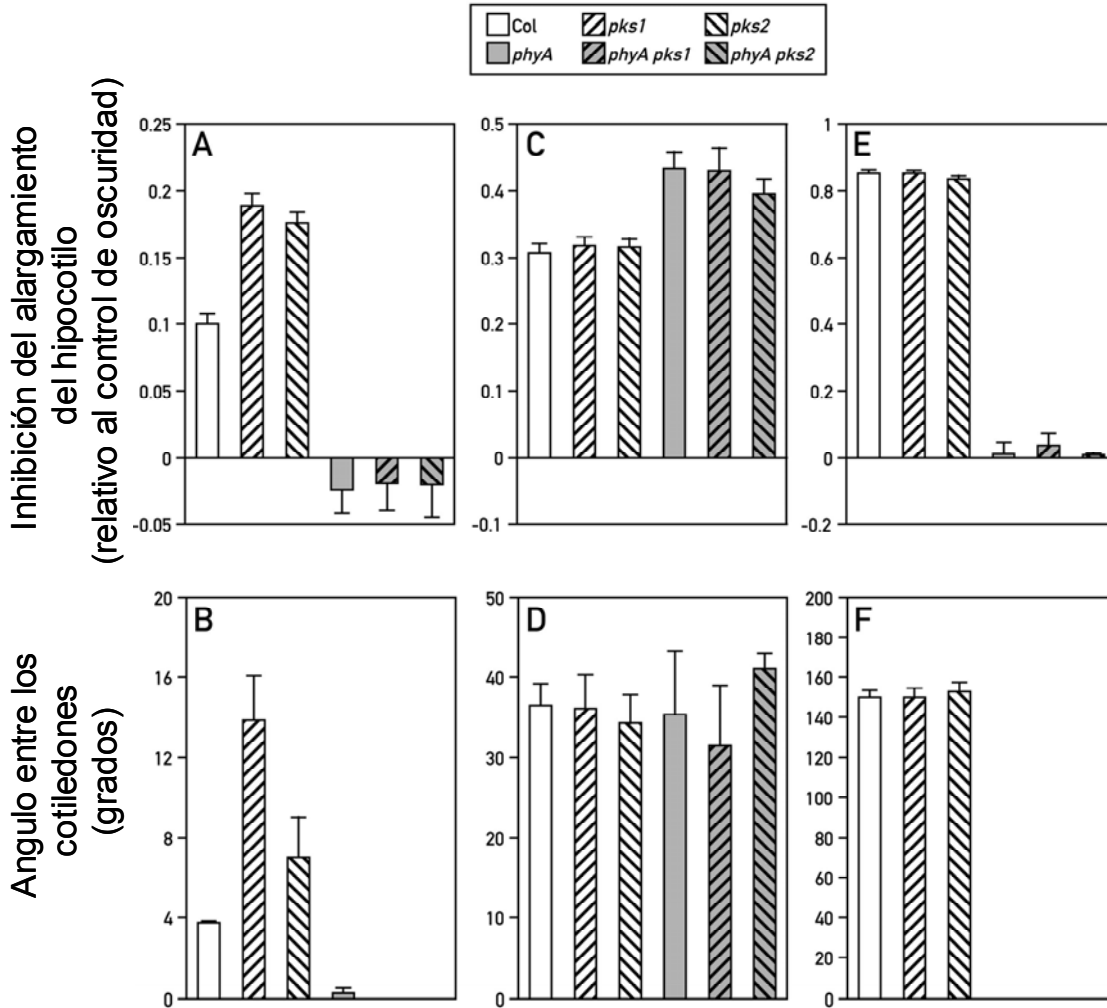


Figura 10. *PKS1* y *PKS2* están involucrados en la regulación de las respuestas VLFR mediadas por *phyA*. Plántulas de un día de los genotipos WT Columbia (Col) y los mutantes *pkS1*, *pkS2*, *phyA*, *pkS1 phyA*, y *pkS2 phyA* se expusieron a pulsos horarios de RL (A y B), pulsos horarios de R (C y D), o RL continua (E y F) durante 3 días antes de las mediciones del largo del hipocotilo (A, C, y E) y el ángulo entre los cotiledones (B, D y F). Los datos mostrados representan la media \pm EE de 32 réplicas (10 plántulas por cajita). La inhibición del alargamiento del hipocotilo está expresada como $1 - \text{largo en luz} / \text{largo en oscuridad}$.

2.1.2.5. *Un VLFR normal requiere de un balance apropiado entre PKS1 y PKS2*

Para probar la relación genética entre *PKS1* y *PKS2*, se utilizaron dobles mutantes para ambos genes y líneas sobreexpresantes de *PKS1* (*PKS1-OX*) o *PKS2* (*PKS2-OX*) desarrolladas en el laboratorio del Dr. Fankhauser (Suiza) y la Dra Chory (San Diego, EEUU) (Fankhauser *et al.*, 1999). Comparado con el WT, la respuesta de inhibición del alargamiento del hipocotilo bajo pulsos horarios de RL, fue mayor no sólo en los mutantes *pks1* y *pks2*, como se mostró previamente; también lo fue en líneas que expresan a *PKS1* en antisentido (*PKS1-AS*; datos no mostrados; $P < 0.03$) y las líneas sobreexpresantes *PKS1-OX* ($P < 0.0015$), y *PKS2-OX* ($P < 0.002$) (Fig. 11A). Sorprendentemente, a pesar que los mutantes simples *pks1* y *pks2* mostraron mayor respuesta a pulsos horarios de RL, el doble mutante *pks1 pks2* presentó respuestas similares a las del WT ($P > 0.2$) (Fig. 11A).

Para determinar si los mutantes *pks* tienen un efecto más amplio dentro de las respuestas VLFR, se investigaron dos respuestas más mediadas por la vía VLFR de phyA. Estas fueron: la apertura de los cotiledones y el bloqueo del desarrollo normal de los cloroplastos y la clorofila (respuesta que en inglés se la conoce como *blocking of greening*). Se pudo observar el mismo patrón de respuestas para la apertura de los cotiledones, con la excepción de que el mutante simple *pks2*, no difirió significativamente del WT en este ensayo (Fig. 11B). Ya había sido descrito previamente que el bloqueo del desarrollo normal de los cloroplastos y la acumulación de clorofila bajo luz blanca son perjudicados por el crecimiento previo de las plántulas bajo pulsos horarios de RL o RL continua (Barnes *et al.*, 1996; Luccioni *et al.*, 2002). Esta falla es causada por la separación temporal de procesos mediados por fitocromos (inducidos por R y RL) y un paso que requiere R para la síntesis de clorofila (Armstrong *et al.*, 1995). El bloqueo de la acumulación de clorofila fue incrementado en *pks1*, *pks2* ($P < 0.0001$), y *PKS1-AS* expuestos a pulsos horarios de RL ($P < 0.05$) (Fig. 11C y datos no mostrados, respectivamente). No se observaron efectos en los sobreexpresantes (Fig. 11C). Como se observó para el crecimiento del hipocotilo y la apertura de los cotiledones, a pesar que los mutantes simples *pks1* y *pks2* mostraron mayor bloqueo del desarrollo normal de acumulación de clorofila, el doble mutante presentó respuestas similares a las del WT (Fig. 11C). Ninguno de los genotipos fueron afectados en esta respuesta bajo RL continua (Fig. 11D).

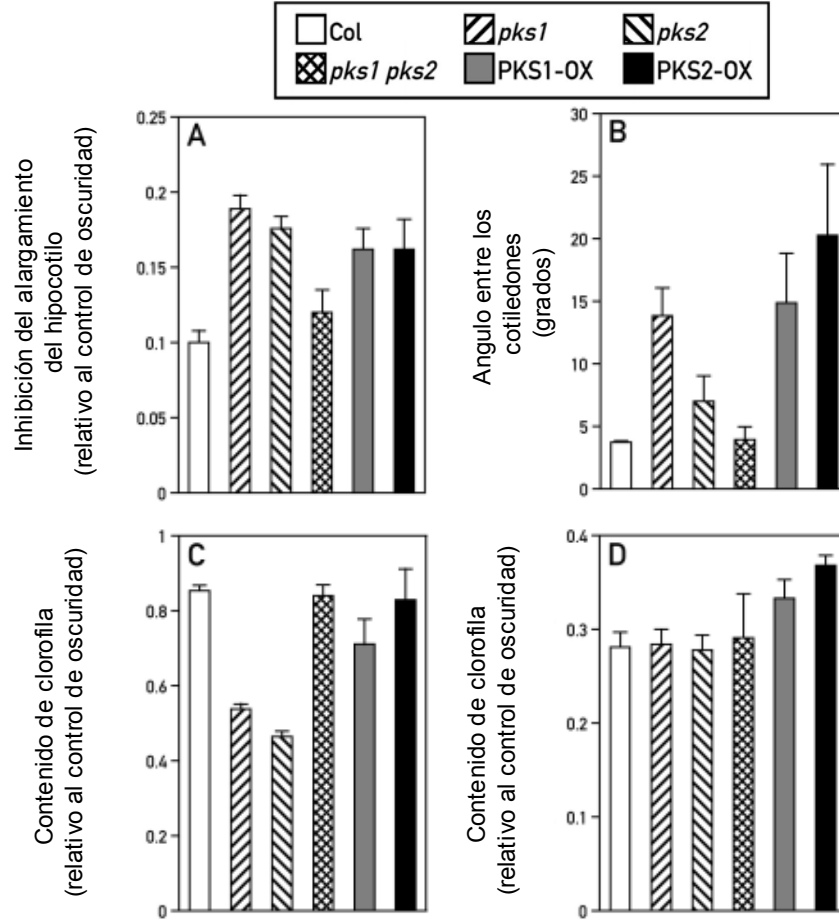


Figura 11. Se requiere un balance apropiado entre PKS1 y PKS2 para un desarrollo normal del VLFR.

(A) Inhibición del alargamiento del hipocotilo bajo pulsos horarios de RL. Plántulas de un día de edad de los genotipos WT Columbia (Col), los mutantes *pks1*, *pks2*, y *pks1 pks2*, y las plántulas transgénicas sobreexpresantes de PKS1 o PKS2 fueron expuestas durante 3 días a pulsos horarios de RL antes de las mediciones del largo del hipocotilo. Los datos mostrados corresponden a la media \pm EE de por lo menos 15 cajitas (10 plántulas por cajita). La inhibición del alargamiento del hipocotilo se expresó como en la Figura 10.

(B) Apertura de los cotiledones bajo pulsos horarios de RL. Las condiciones experimentales ya fueron descritas en (A).

(C) Bloqueo del desarrollo normal de los cloroplastos y la clorofila (en inglés: blocking of greening) bajo pulsos horarios de RL. Se expusieron plántulas de un día de edad de los genotipos WT, mutantes *pks1*, *pks2*, y *pks1 pks2*, y transgénicas sobreexpresantes de PKS1 o PKS2 fueron cultivadas durante 3 días en oscuridad o bajo pulsos horarios de RL y transferidos subsecuentemente a luz blanca durante 2 días antes de la cosecha para las determinaciones de clorofila. Los datos mostrados están expresados relativos a los controles transferidos a luz blanca sin pulsos de RL y representan la media \pm EE de al menos 8 réplicas.

(D) Bloqueo del desarrollo normal de los cloroplastos y la clorofila bajo RL continua. Las condiciones experimentales fueron idénticas a las descritas en (C) excepto que las plántulas fueron cultivadas en RL continua en lugar de pulsos horarios de RL.

Estos resultados indican que los mutantes simples *pks1* y *pks2* son selectivamente perjudicados en la percepción de la luz durante condiciones dominadas por las respuestas VLFR mediadas por phyA (es decir pulsos horarios de RL) y que los mutantes *pks* afectan todas las respuestas evaluadas resultantes del modo VLFR.

2.1.2.6. Interacción genética negativa entre PKS1 y PKS2

El análisis de las tres respuestas fisiológicas (crecimiento del hipocotilo, apertura de los cotiledones y bloqueo del desarrollo normal de acumulación de clorofila) bajo pulsos horarios de RL revelaron un patrón complejo pero robusto desde el punto de vista experimental. Las respuestas a pulsos horarios de RL fueron incrementadas en plántulas de *pks1*, *PKS1-AS*, y *pks2*, y en todos los casos, el doble mutante *pks1 pks2* no difirió significativamente del WT. Mas aún, excepto para el bloqueo de la acumulación de clorofila, *PKS1-OX* y *PKS2-OX* fueron una fenocopia de los mutantes simples *pks1* y *pks2*. Estos hallazgos sugieren que en el WT, PKS1 y PKS2 podrían ser componentes de un sistema mutuamente regulado y que requiere un balance adecuado entre la actividad de estos dos productos génicos (Fig. 12A). Para explorar esta red en más detalle, se analizaron el crecimiento del hipocotilo y apertura de los cotiledones en líneas que sobreexpresan *PKS2* en el acervo genético de *pks1*, y viceversa. El modelo genético (Fig. 12A) predice que en estos genotipos, las respuestas deberían ser modificadas aún más que en los mutantes simples. *pks1 PKS2-OX* y *pks2 PKS1-OX* se comportaron como WT cuando crecieron en oscuridad, RL continua o pulsos horarios de R (datos no mostrados). Sin embargo, cuando crecieron bajo pulsos horarios de RL, *pks1 PKS2-OX* y *pks2 PKS1-OX* mostraron mayor inhibición del alargamiento del hipocotilo y mayor apertura de los cotiledones que sus líneas parentales correspondientes (Fig. 6B y datos no mostrados). Es notable que el efecto de la sobreexpresión de *PKS1* sobre la apertura de los cotiledones fue significativamente mayor en el acervo genético de *pks2* con respecto al acervo genético de *PKS2* normal, y el efecto de la sobreexpresión de *PKS2* fue significativamente mayor en el *pks1* con respecto al acervo genético de *PKS1* (P=0.04) (Fig. 12C). Estos resultados sustentan la idea de que PKS1 y PKS2 son piezas de un sistema regulado mutuamente que modula las respuestas VLFR desencadenadas por phyA.

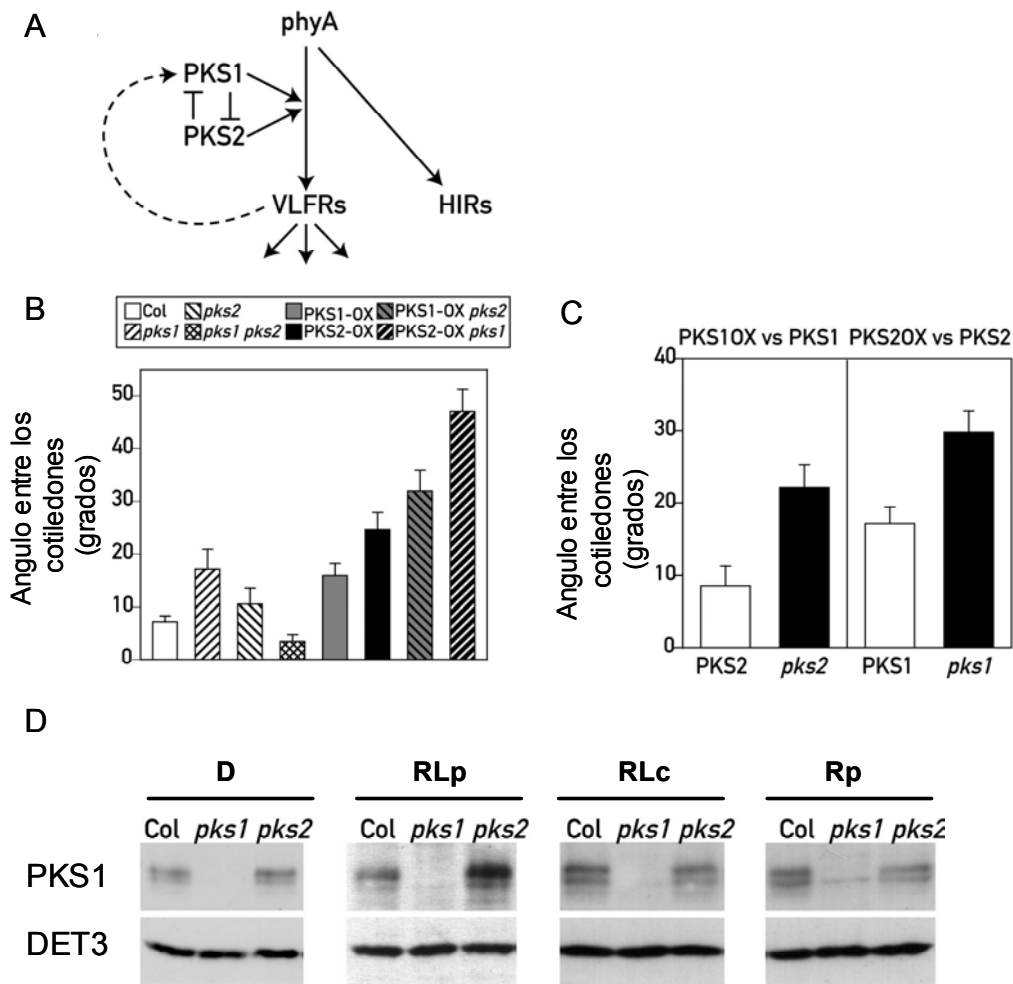


Figura 12. Interacción entre PKS1 y PKS2 en la señalización del VLFR mediado por *phyA*.
 (A) Modelo de las interacciones genéticas entre PKS1 y PKS2. *phyA* media tanto respuestas del tipo HIR como VLFR. PKS1 y PKS2 afectan sólo las VLFR. Los datos genéticos son consistentes con un modelo en el cual PKS1 y PKS2 se regulan de modo negativo entre sí. Para un VLFR normal sería necesario un balance adecuado de sus actividades. En el WT, las funciones regulatorias de PKS1 y PKS2 están enmascarada debido a su inhibición mutua. Más aún, *phyA* regula positivamente la expresión de *PKS1* en el modo VLFR.
 (B) Apertura de los cotiledones bajo pulsos horarios de RL. Se expusieron por 3 días a pulsos horarios de RL a plántulas WT Columbia (Col), mutantes *pk1*, *pk2*, y *pk1 pk2*, sobreexpresantes *PKS1-OX* y *PKS2-OX*, y plántulas que contienen la mutación *pk1* en el acervo genético del sobreexpresante *PKS2-OX* o la mutación *pk2* con la sobreexpresión de *PKS1* (*PKS1-OX*). Las líneas *pk2* *PKS1-OX* y *pk1* *PKS2-OX* mostraron VLFR más pronunciados que sus líneas parentales. Los datos presentados representan la media \pm EE de 22 cajitas o réplicas.
 (C) El efecto de *PKS1-OX* fue mayor en el acervo de la mutación *pk2* comparado al efecto producido en el acervo de *PKS2*, y el efecto de *PKS2-OX* fue mayor en el acervo de *pk1* comparado con el de *PKS1*. Las diferencias entre los genotipos con niveles normales de expresión y los sobreexpresantes se calcularon utilizando los datos mostrados en (B).
 (D) Análisis de inmunoblot del WT Columbia, *pk1* y *pk2* cultivados en oscuridad, pulsos horarios de RL (RLp), pulsos horarios de R (Rp), o RL continua (RLc) durante 3 días e incubado con sueros anti-PKS1 y anti-DET3 usado como control de carga. Los gels e incubaciones con los anticuerpos fueron realizados en el laboratorio del Dr. Fankhauser (Suiza).

2.1.2.7. Interacciones moleculares entre PKS1 y PKS2

Nuestros experimentos genéticos sugieren una interacción negativa entre PKS1 y PKS2. Para investigar a nivel molecular dicha interacción analizamos los niveles de proteína PKS1 en el WT y el acervo genético de *pks2* bajo diferentes condiciones lumínicas (Fig. 12D). Los niveles de proteína de PKS1 sólo se vieron incrementados bajo pulsos horarios de RL en *pks2*, mientras que no sufrieron modificaciones bajo pulsos de R, RL continua u oscuridad (es decir específicamente bajo las condiciones lumínicas en las cuales los mutantes *pks2* presentaron respuestas incrementadas) (Fig. 12D). Por lo tanto, PKS2 es un regulador negativo de la acumulación de PKS1 en las condiciones de VLFR. Como el mutante *pks2* mostró respuestas VLFR incrementadas (Fig. 10) y la proteína PKS1 fue inducida por VLFR (Fig. 9), este experimento también demostró que *PKS2* afecta otra resultante del VLFR.

2.1.3. MATERIALES Y METODOS

2.1.3.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Todos los alelos usados en este estudio están en *Arabidopsis thaliana* accesión Columbia-O. Las semillas fueron sembradas sobre agar-agua 0.8% en cajitas plásticas transparentes (42 x 35 mm² x 20 mm) para los análisis fisiológicos o en cajas de Petri conteniendo la mitad del volumen con medio Murashige y Shoog 0.7% en agar y 1.5% de sacarosa para los análisis de *northern blot*, *western blot*, y de expresión tisular. Las cajas fueron guardadas en oscuridad a 4°C durante 3 días y la germinación fue inducida tanto por 1 hora de R saturante para los análisis fenotípicos. Las intensidades lumínicas fueron determinadas con un fotómetro IL1400A equipado con un sensor SEL033 con los filtros de luz apropiados.

2.1.3.2. Plantas transgénicas

Todo el material vegetal mutante y transgénico fue desarrollado en el laboratorio del Dr. Christian Fankhauser en Ginebra (Suiza) o en el laboratorio de la Dra Joanne Chory en San Diego (EEUU). La obtención del material genético usado en este Capítulo (Parte A) ya fue descrito en Fankhauser *et al.* (1999) y Lariguet *et al.*(2003).

2.1.3.3. Largo del hipocotilo, apertura de los cotiledones y acumulación de clorofila

Plántulas de un día de edad fueron expuestas tanto a pulsos horarios de R o RL (3 min, 40 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o RL continua (2.5 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$); plántulas control fueron mantenidas en oscuridad. Más detalles de las fuentes de luz fueron descritas por Yanovsky *et al.*, (2000) y en Fankhauser y Casal (2004). Tres días después, el largo del hipocotilo fue medido con una aproximación de 0.5 mm, con una regla, en las 10 plántulas más largas de las 15 que fueron sembradas por cajita (esto elimina el ruido introducido por las semillas que germinan más tarde). El ángulo entre los cotiledones fue medido en las mismas plántulas usando un transportador. Cada experimento fue conducido por lo menos en cuatro ocasiones independientes. Los datos de las plántulas fueron promediados por cajita (una réplica) y analizados por análisis de varianza. Para investigar el bloqueo del desarrollo normal de la acumulación de clorofila mediado por phyA bajo RL, se sembraron 25

plántulas por cajita. Plántulas de un día de edad fueron transferidas a pulsos horarios de RL (3 min, 40 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o RL continua (2 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de longitud de onda larga (provista de una lámpara incandescente en combinación con un filtro de agua y un filtro RG9, Schott, Mainz, Alemania), o mantenidas en oscuridad. Tres días más tarde las plántulas fueron transferidas a luz blanca (provista por tubos fluorescentes, 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 2 días. Las plántulas fueron cosechadas y colocadas en 1 ml de *N,N'*-dimetil formamida e incubadas en oscuridad a -20 °C por 3 días. Se midió la absorbancia a 647 y 664 nm, y los niveles de clorofila fueron calculados de acuerdo con Moran (1982).

2.1.3.4. Análisis de Northern blotting

Se llevaron a cabo experimentos con luz monocromática en una cámara Percival E-30 LED usando tanto R (120 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o RL (35 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) continua a 22°C.

El ARN fue extraído de plántulas usando el reactivo TRIzol (Gibco BRL). Los *northern blots* fueron hechos como se describe en Staiger *et al.*, (2003). Las sondas para *PKS1* y *PKS2* fueron generadas por PCR y *random priming*. Para asegurar la especificidad de las pruebas se amplificaron las regiones de los cADNs con la menor homología entre *PKS1* y *PKS2*. Se utilizó un fragmento de 500 pb para amplificar *PKS1* usando los iniciadores (en inglés *primers*) CF269 5'-TCGAAGCAGAGCGCGAAGA-3' y CF270 5'-GCTTGAATCACTCCCTTCA-3' y un fragmento de 420 pb para amplificar *PKS2*, usando los iniciadores CF134 5'-CTGCCAGATCCAGAAGTTC-3' y CF141 5'-CTTCCTCTGCTCTAGCATTG-3'. La hibridización de los respectivos mutantes de pérdida de función, confirman la especificidad de las sondas. Las sondas *ACT* fueron descritas por Armstrong *et al.*, (1995). Las muestras y extracciones de RNA fueron realizadas en el laboratorio del Dr. Casal y las corridas en gel e hibridaciones en el laboratorio del Dr. Fankhauser (Suiza).

2.1.4.5. Western blotting

Las plántulas fueron cosechadas y homogeneizadas en mortero con N_2 líquido. Se agregó un volumen de buffer de muestra 2X (125 mM Tris pH6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 0.02% azul de bromofenol, 10% β -mercaptoetanol) a un volumen de polvo de plántulas homogeneizadas, se calentaron a 90°C por 10 minutos, se mezclaron con vortex, se centrifugaron por 10 minutos y se rescató el sobrenadante. Las proteínas fueron separadas

en un gel desnaturalizante de 10% de acrilamida (*SDS-PAGE*) y transferido por una hora a 100V sobre una membrana de nitrocelulosa (Trans-blot, BioRad). Las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-DET3 como fue descrito por Schumacher *et al.*, (1999) o con el anticuerpo anti-PKS1 como describió Fankhauser *et al.*, (1999). Las muestras fueron realizadas en el laboratorio del Dr. Casal y las *SDS-PAGE* e hibridaciones con los anticuerpos en el laboratorio del Dr. Fankhauser (Suiza).

2.1.3.6. Tinciones de GUS

Las tinciones de GUS fueron hechas de acuerdo a Blázquez *et al.*, (1997). Brevemente, las plántulas transgénicas fueron suavemente embebidas en acetona fría 90% por 20 minutos (pre-fijación) y posteriormente embebidas en agua (bajo luz verde de seguridad). Se infiltró la solución de tinción fría (2 mM 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -Dglucuronide, 2 mM ferrocyanide, 50 mM buffer fosfato de sodio) en hielo y luego se incubaron las plántulas a 37 °C en tiempos variables entre 30 minutos y 2.5 horas. Las plántulas teñidas fueron fijadas 30 minutos en cada una de las siguientes soluciones: 20% etanol, 35% etanol, FAA (50% etanol, 5% formaldehído, 10% ácido acético), 50% etanol: 43.5% glicerol. Las plántulas fueron observadas con una lupa binocular o microscopio (según el aumento requerido) y fotografiadas con una cámara digital.

CAPITULO 2:

2.2. MODULACION DE LA SENSIBILIDAD A LA LUZ POR COP1

2.2.1. INTRODUCCION

COP1 actúa como regulador negativo de la fotomorfogénesis en oscuridad. Evidencias recientes demostraron que COP1 modula negativamente la señalización de phyA bajo RL. El hecho de que COP1 sea un regulador de la sensibilidad a la luz y dado que no se conoce de que modo regula la señalización de phyB, y por lo tanto de que modo podría afectar la sensibilidad a la presencia de plantas vecinas en los cultivos, el **objetivo** de esta parte del Capítulo es investigar el papel de COP1 en la fotomorfogénesis mediada por phyB.

2.2.2. RESULTADOS

2.2.2.1. Comportamiento de mutantes *cop1* bajo luz roja

Para investigar los efectos de COP1 sobre la magnitud de las respuestas a la luz roja, se cultivaron plántulas de los genotipos WT (Columbia) y los mutantes *cop1-6* y *cop1-4* (dos alelos débiles de *cop1*) en oscuridad o bajo pulsos horarios de R, una condición lumínica donde la des-etiolación es mediada principalmente por phyB (Yanovsky *et al.*, 1997). Como era de esperar, ambos mutantes *cop1-6* y *cop1-4* mostraron hipocotilos cortos y cotiledones abiertos en oscuridad (Fig. 13A). La reducción del alargamiento del hipocotilo causada por R comparado con oscuridad fue menor en los mutantes *cop1* comparado con el WT. Pero esto podría ser consecuencia de la reducida longitud del hipocotilo ya presente en los mutantes en oscuridad (Fig. 13B). Llamativamente, mientras la R promovió la apertura de los cotiledones en el WT, el mismo tratamiento redujo el ángulo entre los cotiledones en *cop1-6* y *cop1-4*; es decir que estos mutantes mostraron una respuesta contraria o inversa al WT para la apertura de los cotiledones en respuesta a la R (Fig. 13C). El análisis de la apertura de los cotiledones bajo distintas tasas de flujo de R mostró umbrales de sensibilidad similares tanto para la respuesta positiva de apertura en el WT, así como la respuesta negativa de los mutantes *cop1* (Fig. 13D). Para investigar si la apertura de los cotiledones es normalmente reducida en respuesta a una señalización lumínica exagerada (respuesta que se llamará de ahora en más: respuesta inversa para la apertura de los cotiledones) se abordaron dos aproximaciones diferentes. Por un lado, se observó que una línea transgénica sobreexpresante de *PHYB* (Wagner *et al.*, 1991) mostró respuesta máxima para la apertura de los cotiledones a partir de tasas de flujo de $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de R continua y retuvo apertura completa de los cotiledones hasta $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 13D). Este patrón contrasta con el observado en los mutantes *cop1*, que retuvieron máxima apertura de los cotiledones bajo $0.01 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y redujeron dicho ángulo cuando fueron cultivados bajo $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 13D). Por otro lado se observó que plántulas WT (Columbia o Nossen) cultivadas bajo $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca, mostraron máxima apertura de los cotiledones. Sin embargo, al incrementar la tasa de flujo a valores superiores a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no se redujo la apertura de los cotiledones (datos no mostrados).

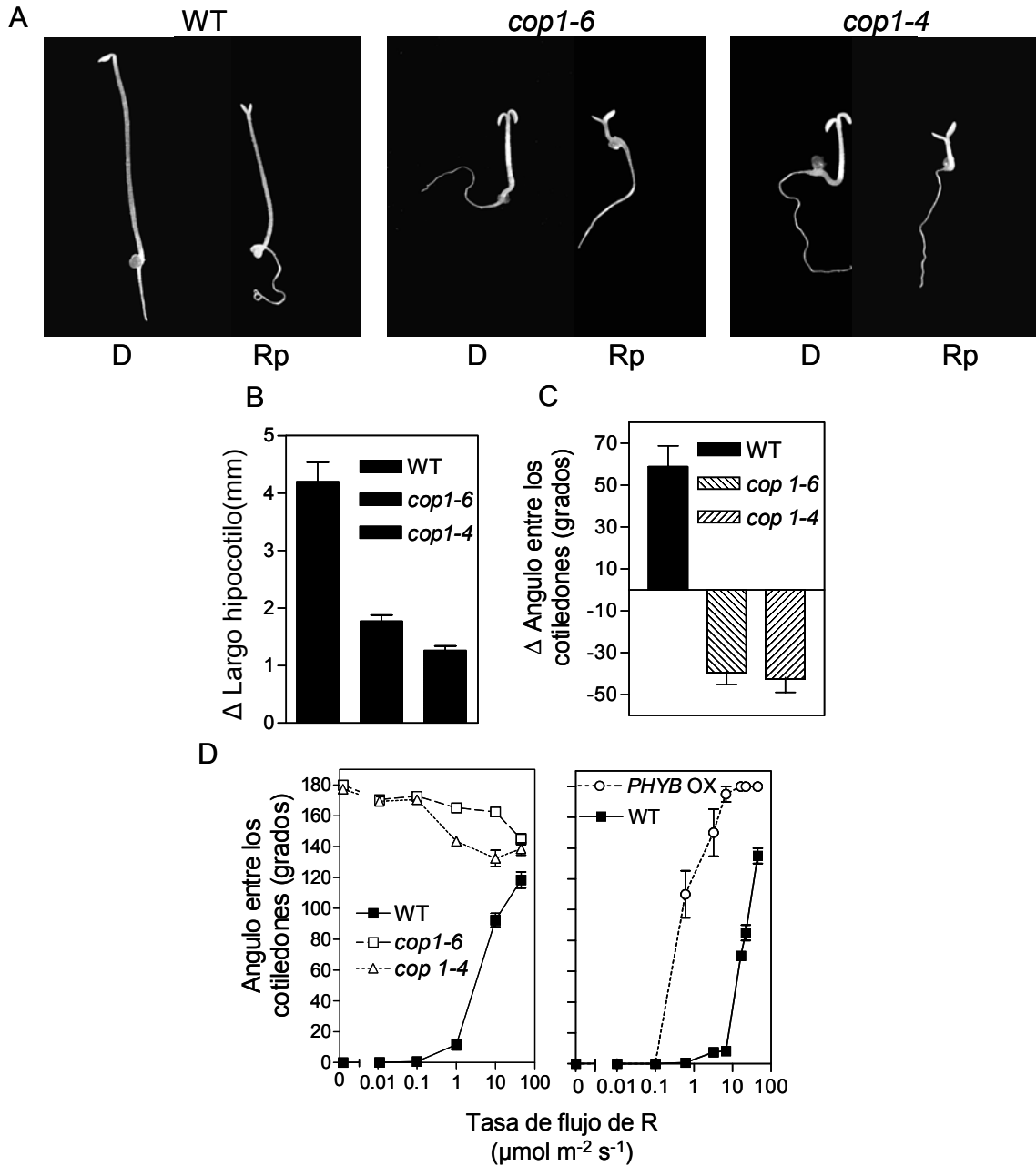


Figura 13. Respuesta a la R en los mutantes *cop1-4* y *cop1-6*.

(A) Plántulas de WT (Columbia) y los mutantes *cop1-4* y *cop1-6* cultivados bajo pulsos horarios de R (3 min, $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Rp) o en oscuridad (D).

(B) El Δ largo del hipocotilo se calculó como el largo del hipocotilo de las plántulas cultivadas en oscuridad menos el largo del hipocotilo de las plantas cultivadas bajo pulsos horarios de R.

(C) El Δ Angulo entre los cotiledones se calculó como la apertura de los cotiledones de plántulas cultivadas bajo pulsos horarios de R (en grados) menos el ángulo entre los cotiledones presente en las plántulas cultivadas en oscuridad.

(D) Las plántulas mutantes *cop1*, de la línea sobreexpresante de *PHYB* (*PHYB OX*) y sus WT (Columbia y Nossen, respectivamente) fueron también expuestas a diferentes tasas de flujo de R continua. Los datos representan la media \pm EE de 5 experimentos independientes (un valor de Δ por experimento) (B, C) y por lo menos 3 réplicas para (D).

Por lo tanto se puede concluir que la respuesta inversa para la apertura de los cotiledones, manifestada por los mutantes *cop1*, no es fenocopiada ni por el WT ni por los sobreexpresantes de *PHYB* bajo las altas irradiancias probadas aquí.

2.2.2.2. La presencia de *phyB* es necesaria para que los mutantes *cop1* presenten la respuesta inversa para la apertura de los cotiledones promovida por R

Los mutantes *cop1-6* y *cop1-4* cultivados bajo pulsos horarios de RL (3 min, 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) presentaron una inhibición del alargamiento del hipocotilo similar al WT (Δ del largo del hipocotilo comparado con los controles de oscuridad, mm, media \pm EE, WT: 1.2 ± 0.1 ; *cop1-4*: 1.1 ± 0.1 ; *cop1-6*: 1.6 ± 0.2). Por otra parte, la respuesta inversa para la apertura de los cotiledones no fue estadísticamente diferente entre genotipos bajo pulsos horarios de RL (Δ apertura de los cotiledones comparado con los controles de oscuridad, grados, media \pm EE, WT: 10 ± 5 ; *cop1-4*: -9 ± 6 ; *cop1-6*: -5 ± 3). Dado que los efectos de RL son mediados por *phyA*, mientras que los de R son mediados ampliamente por *phyB*, es factible especular que la respuesta inversa para la apertura de los cotiledones podría ser específica de fotorreceptor. Para investigar este punto se produjeron mutantes dobles de *cop1* con *phyB* y *phyA* en el mismo acervo genético. Las plántulas fueron expuestas a pulsos horarios de R o RL continua. A pesar de que la RL continua, percibida por *phyA*, tuvo un efecto mucho mayor que los pulsos horarios de R para promover la apertura de los cotiledones en el WT, en los mutantes *cop1* causó una débil respuesta inversa para la apertura de los cotiledones (Fig. 14). Esta evidencia da mayor sustento en favor de un efecto selectivo dependiente del modo de acción estimulado. La mutación *phyB-9* fue epistática a las de *cop1-6* y *cop1-4* para la respuesta inversa para la apertura de los cotiledones bajo R o RL (Fig. 14). La mutación *phyA-211* tuvo poco efecto bajo R pero fue epistática bajo RL (Fig. 14). Se concluye que la respuesta inversa para la apertura de los cotiledones es mediada principalmente por *phyB* y secundariamente por *phyA*.

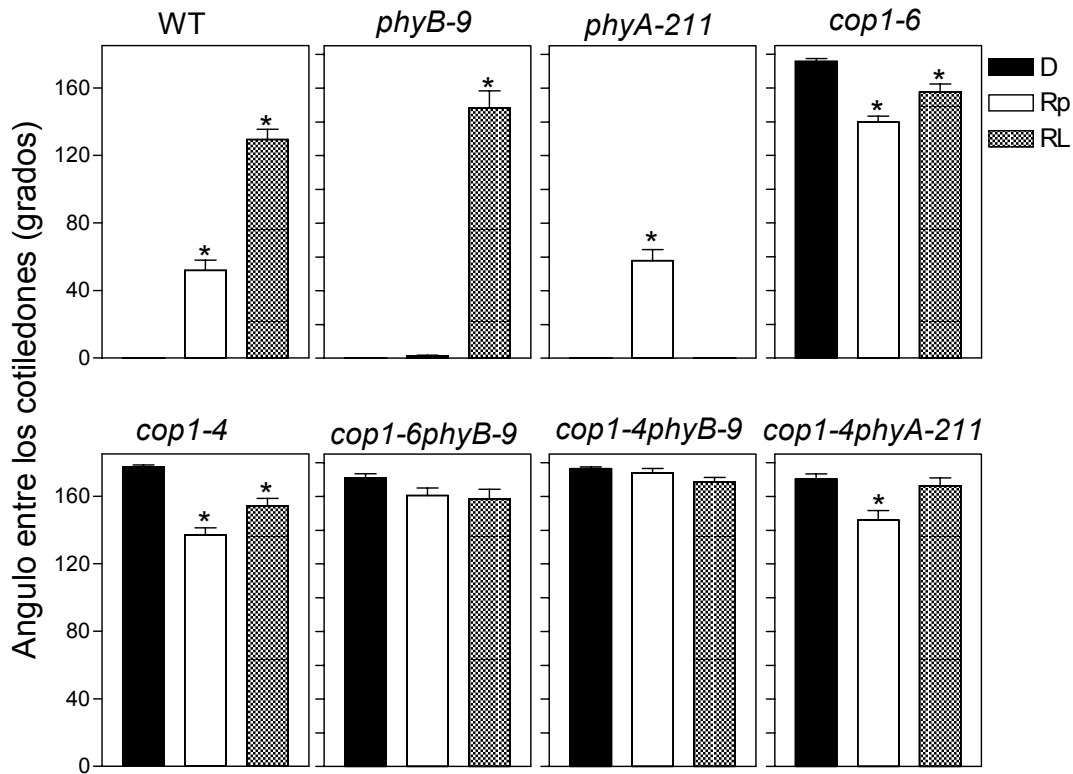


Figura 14. La presencia de *phyB* es necesaria para que los mutantes *cop1* presenten la respuesta inversa para la apertura de los cotiledones promovida por R. Plántulas de WT, *phyB-9*, *phyA-211*, *cop1-6*, *cop1-4*, *cop1-6 phyB-9*, *cop1-4 phyB-9* y *cop1-6 phyA-211* fueron cultivadas bajo pulsos horarios de R (3 min, 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Rp), RL continuo (10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o en oscuridad. Los datos representan la media y el EE de por lo menos 8 réplicas. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto de oscuridad.

2.2.2.3. Los sobreexpresantes de *COP1* poseen fotomorfogénesis exagerada bajo R

Para caracterizar en mayor detalle el papel de COP1 bajo luz, se investigaron las respuestas fotomorfogénicas de dos líneas sobreexpresantes de *COP1* (*COP1 OX* y *GUS-COP1*). En concordancia con estudios previos (McNellis *et al.*, 1994b; Osterlund y Deng, 1998), las líneas sobreexpresantes mostraron una reducción en la inhibición del

alargamiento del hipocotilo y menor apertura de los cotiledones bajo RL continua o A y presentaron un fenotipo similar al WT en oscuridad (Fig. 15A y B). Sin embargo, bajo R las líneas sobreexpresantes de *COP1* mostraron una amplificación de la fotomorfogénesis, en lugar de una reducción (Fig. 15A y B).

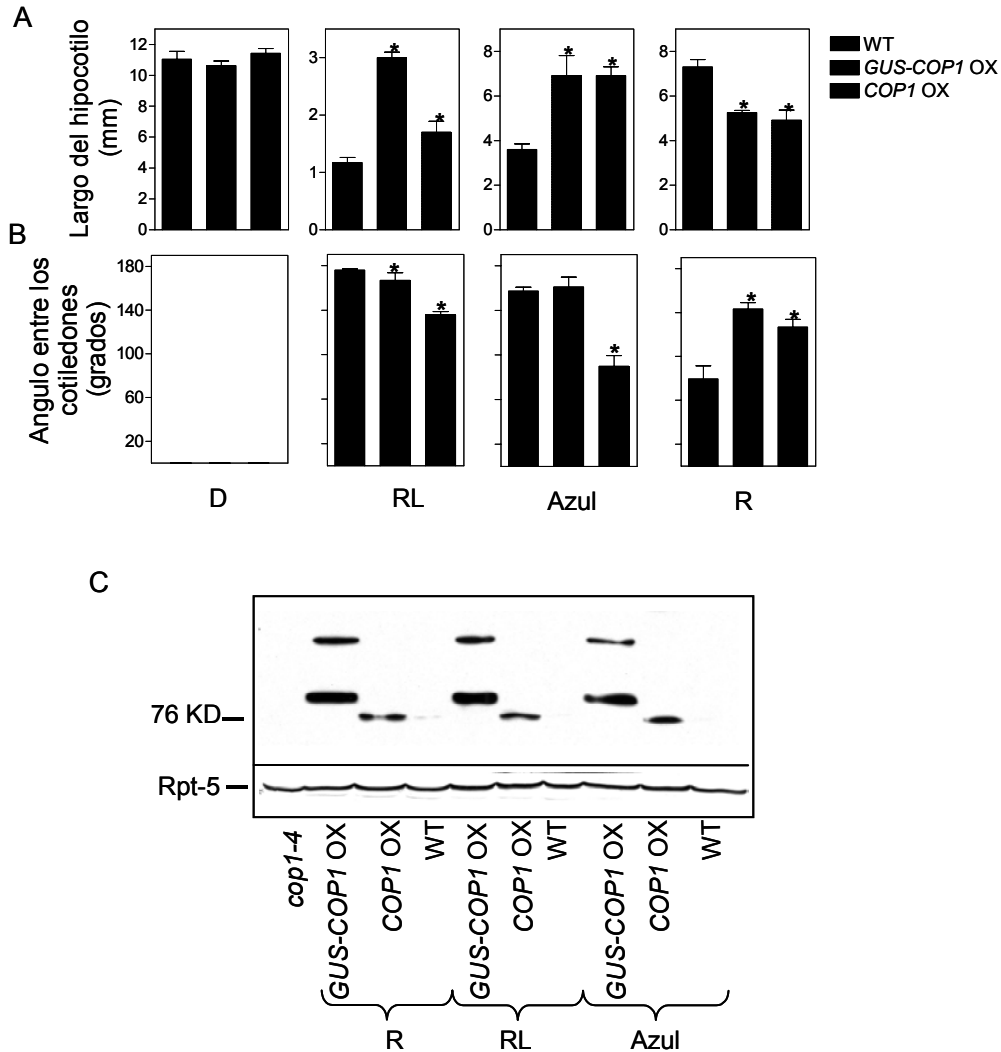


Figura 15. La sobreexpresión de *COP1* incrementa la fotomorfogénesis bajo R y la reprime bajo luz azul o RL Largo del hipocotilo (A) y ángulo entre los cotiledones (B) en plántulas de WT (Nossen) y *COP1* OX cultivadas bajo RL continuo ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), azul ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), R ($17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), o en oscuridad. Los datos representan la media y EE de al menos 7 réplicas. Se analizaron los niveles de proteína *COP1* en plántulas WT y *COP1* OX cultivadas durante 5 días bajo R continua, RL continua y azul (C). Se incluyeron plántulas de *cop1-4* cultivadas bajo luz blanca como control negativo (calle de la izquierda). El anticuerpo anti-*COP1* utilizado reveló la presencia de 3 bandas al detectar GUS-*COP1*, correspondientes a una forma truncada de GUS-*COP1* (de tamaño intermedio entre GUS-*COP1* y *COP1*), así como también detectó a la proteína endógena *COP1*. Las membranas fueron también incubadas con el anticuerpo anti-Rpt-5 como control de carga de proteína por calle. Las incubaciones con el anticuerpo fueron realizadas en el laboratorio del Dr. Deng (EEUU).

Esta observación admite dos interpretaciones. Una, consistente con el comportamiento de los mutantes *cop1*, es que COP1 puede promover la fotomorfogénesis mediada por *phyB*. La otra es que el transgen *COP1* este causando co-supresión dependiente de la calidad de luz del gen *COP1*. Sin embargo, la detección inmunológica de la proteína COP1 mostró niveles similares de esta proteína en extractos de plántulas cultivadas bajo R comparado con RL o luz azul, descartando esta última posibilidad (Fig. 15C).

Para caracterizar en mayor detalle esta respuesta, se investigó la amplificación de la apertura de los cotiledones en las líneas sobreexpresantes de *COP1* en respuesta a distintas tasas de flujos de R. Las líneas transgénicas presentaron mayor sensibilidad y una respuesta máxima mayor que el WT (Fig. 16A). A fin de caracterizar la cinética de la apertura de los cotiledones en las sobreexpresantes de *COP1*, se cultivaron plántulas en oscuridad durante 2 d y luego fueron transferidas a R continua. Bastaron 12 h de luz R para distinguir la apertura de los cotiledones de las líneas *COP1* OX y *GUS-COP1* OX respecto del WT, que permaneció con los cotiledones cerrados durante ese período (Fig. 16B y C).

Siguiendo un protocolo similar se observó que los transgénicos también presentaron mayor acumulación de clorofila en las primeras 36 h de R (Fig. 17A). También en este sentido, se observaron mayores niveles de transcritos del gen *CAB1* en *COP1* OX al compararlo con el WT (Fig. 17B). Por lo tanto la sobreexpresión de *COP1* no sólo incrementó sus respuestas morfológicas a la R, sino también el ensamblaje de la maquinaria fotosintética.

La amplificación de la fotomorfogénesis producida por la sobreexpresión de COP1 bajo R requiere *phyB*

En el acervo del mutante *phyB*, la sobreexpresión de *COP1* no produjo una amplificación de la apertura de los cotiledones en respuesta a R (Fig. 18). La mutación de *phyA* no tuvo efectos significativos bajo R.

Como era de esperar bajo RL continua, *COP1* OX mostró menor ángulo de apertura entre los cotiledones comparado con el WT (WT: 170 ± 4 grados; *COP1* OX: 137 ± 4 grados); mientras que el agregado de la mutación de *phyB* al acervo de *COP1* OX causó

una mayor reducción de la apertura de los cotiledones (*COP1 OX phyB*: 116 ± 4), es decir que potenció el efecto negativo de la sobreexpresión de *COP1* bajo RL. Esto sugiere que el desempeño del *COP1 OX* bajo esta condición lumínica podría ser la resultante de un balance entre la represión de la vía de señalización mediada por *phyA* y la promoción de la vía mediada por *phyB*.

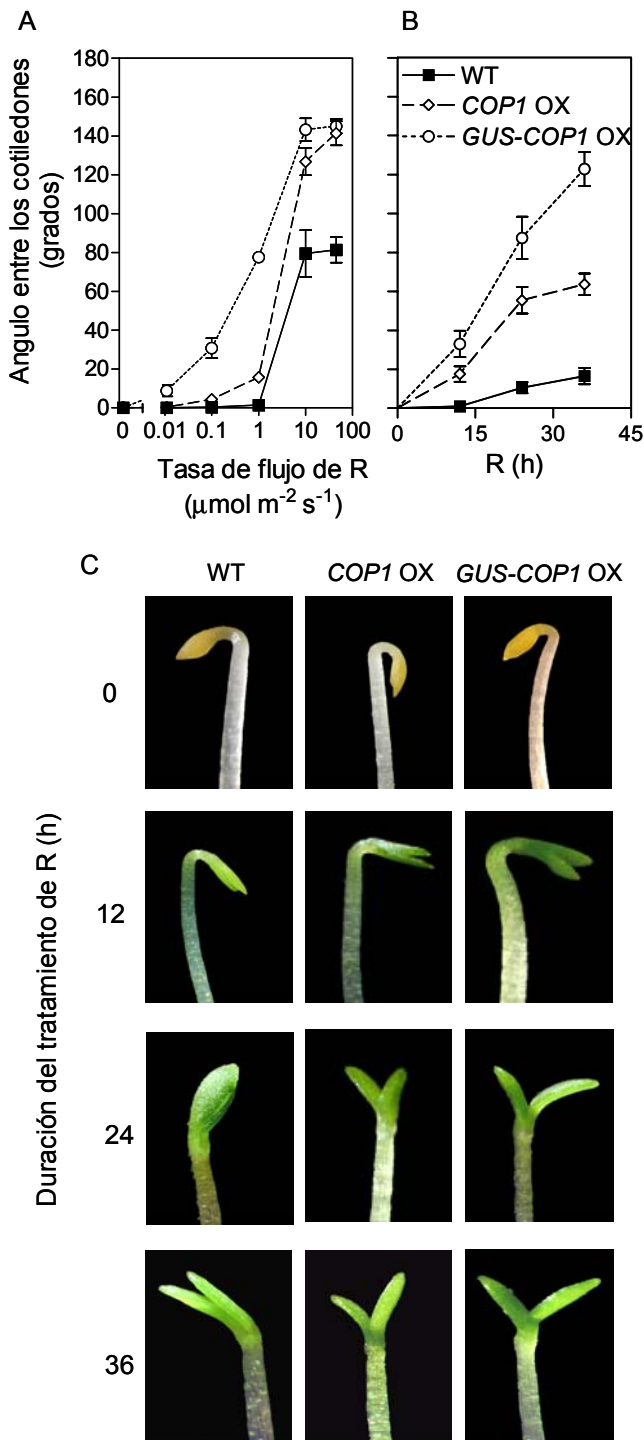


Figura 16. Apertura de los cotiledones de plántulas WT y *COP1 OX* bajo R.

Angulo entre los cotiledones de plántulas expuestas por 3 días a los flujos de R indicados (A). Para estudios cinéticos, plántulas etioladas WT (Nossen) y *COP1 OX* de 2 días de edad, fueron transferidas a R continuo ($17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante el período de tiempo indicado en las absisas (B). Los datos corresponden a la media y ES de al menos 12 réplicas. Un detalle representativo de la apertura de los cotiledones se muestra en C.

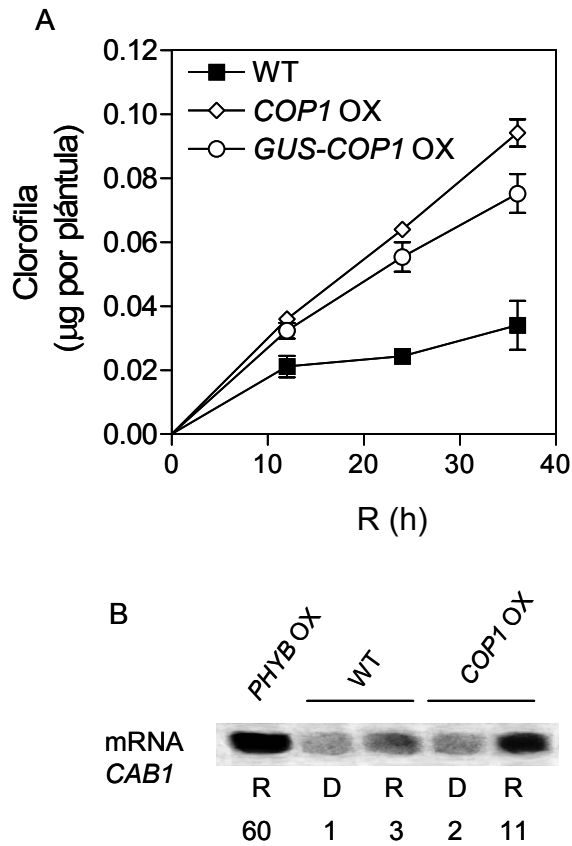


Figure 17. La sobreexpresión de *COP1* amplifica la expresión de *CAB1* y la acumulación de clorofila bajo luz R.

Se expusieron plántulas etioladas de 2 días de edad de WT (Nossen) y *COP1 OX* a R continua ($17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante el tiempo indicado en las abscisas para luego ser cosechadas para las determinaciones de clorofila (A). Los datos representan la media y EE de al menos 4 determinaciones usando 30 plántulas por réplica. Se expusieron plántulas etioladas de 2 días de edad de WT (Nossen) y *COP1 OX* a 6 hs de R ($17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o mantenidas en oscuridad antes de ser cosechadas para los análisis de la expresión *CAB1* (B). Se incluyó la línea sobreexpresante de *PHYB* ABO como control. Los números bajo las bandas corresponden a los niveles de transcritos de *CAB1* relativos al RNA total cuantificado para cada calle de la membrana.

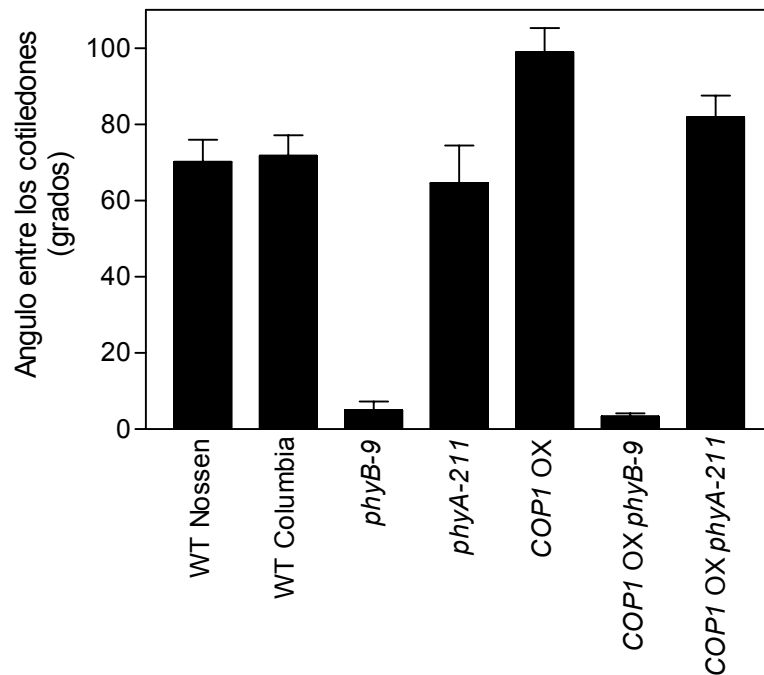


Figura 18. *phyB* es necesario para amplificar la fotomorfogénesis de plántulas transgénicas *COP1 OX* bajo R.

Plántulas de un día de edad WT (Nossen y Columbia), *phyB-9*, *phyA-211*, *COP1 OX*, *COP1 OX phyB-9*, *COP1 OX phyA-211* fueron cultivadas bajo pulsos horarios de R (3 min, $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los datos corresponden a la media y EE de al menos 10 réplicas. Todos los genotipos no presentaron apertura de los cotiledones en oscuridad.

2.2.3. MATERIALES Y METODOS

2.2.3.1. Material vegetal y tratamientos lumínicos

Se usaron dos mutantes débiles *cop1* (*cop1-4* y *cop1-6*). La estructura del gen *COP1* y de los genes mutados *cop1-4* y *cop1-6* se muestran en la Fig. 8. Ambos mutantes están en el acervo genético de la accesión Columbia (McNellis *et al.*, 1994a) y fueron comparados al WT Columbia de *Arabidopsis thaliana*. Se utilizaron dos líneas transgénicas sobreexpresantes de *COP1*. *COP1 OX*, que porta al gen *COP1* bajo el control del promotor fuerte 35S en la accesión Nossen (McNellis *et al.*, 1994b). La otra línea *GUS-COP1 OX* porta al transgen fusionado *GUS:COP1* bajo el control del promotor 35S (von Arnim y Deng, 1994). El transgen de fusión *GUS-COP1* fue totalmente funcional y capaz de complementar al alelo fuerte mutante *cop1-5* (von Arnim *et al.*, 1997).

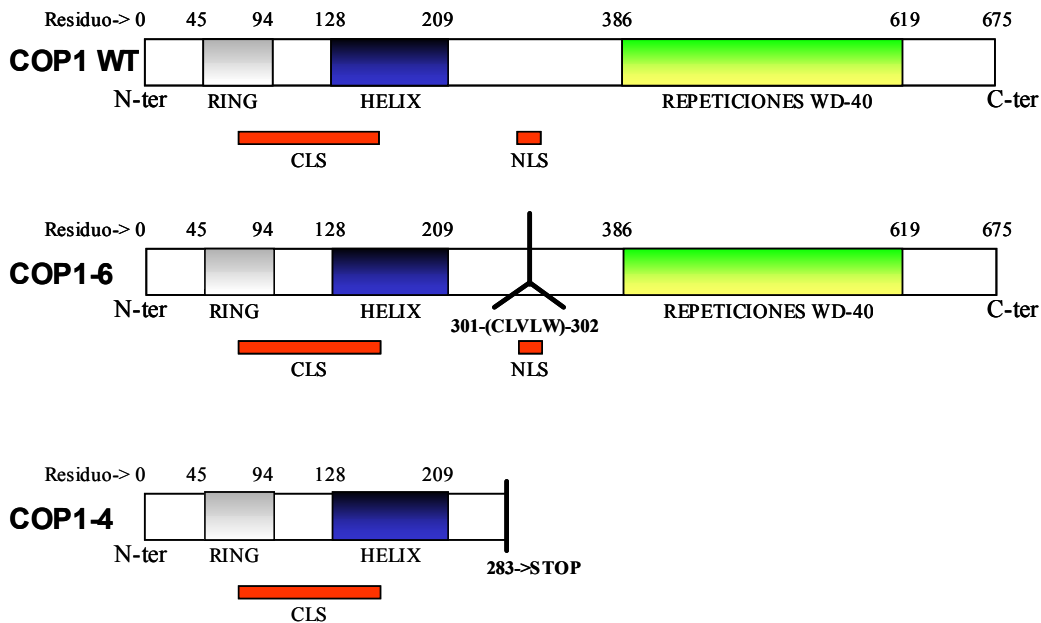


Figura 19. Estructura de la proteína *COP1* (WT) y las proteínas mutadas *COP1-6* y *COP1-4*. Adaptado de Mc Nellys et al., (1994).

También fueron incluidos en varios experimentos, los mutantes *phyA-211* (Nagatani *et al.*, 1993) y *phyB-9* (Reed *et al.*, 1993), ambos en el acervo genético de Columbia, . El doble mutante *phyA-211 cop1-6* fue obtenido aislando plántulas de la generación F2 que mostraban des-etiolación intermedia en RL continua. El genotipo *phyA-211* fue confirmado por PCR usando los iniciadores 5'-TTATCCACAGGGTTACAGGG-3' y 5'-GCATTCTCCTTGCATCATCC-3', que producen un fragmento de 1136 pb sólo en el genotipo WT. También se utilizaron un par de iniciadores control para chequear la presencia e integridad de ADN en las muestras. La mutación *cop1-6* fue confirmada por su fenotipo des-etiolado en oscuridad. Los dobles mutantes *phyB-9 cop1-4* y *phyB-9 cop1-6* fueron obtenidos chequeando la presencia de ambas mutaciones en generaciones sucesivas. La mutación *phyB-9* fue detectada usando *dCAPS* (Neff y Chory, 1998). El fenotipo des-etiolado en oscuridad indicó la presencia de la mutación *cop1-6* y *cop1-4*. Las líneas sobreexpresantes de *COPI* en los acervos genéticos de los mutantes *phyA-211* o *phyB-9* fueron obtenidos identificando las mutaciones de los fotorreceptores como se indicó anteriormente y el transgen por resistencia a kanamicina luego de 10 días de cultivo bajo B en medio MS suplementado con 1% de sacarosa y kanamicina (50 µg/ml).

Para los experimentos fisiológicos, se sembraron doce semillas de cada genotipo en cajitas plásticas transparentes de acrílico (40 x 33 mm x 15 mm de altura), conteniendo 3 ml de agar-agua 0.8 % (p/v). Estas cajitas fueron almacenadas durante 3 días en oscuridad a 5 °C, expuestas a un pulso saturante de R (30 min) e incubadas en oscuridad durante 24 h a 25 °C antes de ser transferidas a los distintos tratamientos de luz por 3 días. En los experimentos de cinética, las plántulas fueron cultivadas en oscuridad por 2 días antes de ser transferidas a la R.

La R fue provista por tubos fluorescentes rojos (40/15, Philips). La RL fue provista por lámparas incandescentes en combinación con filtros acrílicos azules (Paolini 2031), un acetato rojo y filtrada a través de una pecera de acrílico transparente, de 10 cm de ancho, conteniendo agua destilada. La luz azul fue provista por tubos fluorescentes en combinación con acetato azul.

2.2.3.2. Aislamiento de RNA y geles de RNA

Se aisló ARN total con el kit *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del prospecto de este producto. El ARN total fue fraccionado por tamaño en un gel de MOPS-formaldehído 1.5% agarosa y transferido a una membrana de *nylon* (Hybond, Amersham, USA) por capilaridad en 20x SSC (Carrari *et al.*, 2001). La membrana fue teñida de modo reversible, con azul de metileno 0.04% (p/v), se capturó su imagen y se cuantificó el ARN total de cada línea con un sistema *imager* (*Fluor-S Multimager*, Bio-Rad, Hercules, EEUU). El marcado radioactivo de la sonda *CABI* (pAB140, ABRC, Ohio) fue hecho con el kit *Prime-a-gene kit*, (Promega, Madison, EEUU) utilizando P^{32} dCTP. La hibridización fue llevada cabo a 42 °C durante 16 h en una solución que contenía 6 ml de *ULTRAhyb* (Ambion, Austin, EEUU) y la sonda marcada. El tratamiento de la placa fotográfica fue hecho como describió Carrari *et al.*, (2001). Para corregir pequeñas diferencias en la cantidad de ARN cargado por calle, se calcularon las intensidades de las bandas (correspondientes a los niveles de transcritos *CABI*) relativizadas a la cantidad total de ARN cuantificado para cada línea.

2.2.3.3. Análisis de Western blotting

El análisis de *western blotting* para determinar las cantidades de proteína COP1 en las líneas sobreexpresantes *COP1 OX* y *GUS-COP1 OX* fue realizado exactamente del mismo modo que lo realizado por Saijo *et al.* (2003). Las plántulas fueron cultivadas durante 5 días bajo R, RL o luz azul antes de ser cosechadas para la extracción proteica. Los tratamientos de luz, las extracciones proteicas y transferencias de los geles fueron realizadas en el laboratorio del Dr. Casal y la incubación con el anticuerpo en el laboratorio del Dr. Deng en New Haven (EEUU).

2.2.3.4. Observaciones en las plantas, determinación de clorofila y estadística

El largo del hipocotilo fue medido con la aproximación de 0.5 mm con una regla y el ángulo entre los cotiledones fue medido con un transportador. Se calcularon los valores promedios para cada cajita (es decir, una réplica) y fueron usados para análisis estadísticos (ANVA). Para las determinaciones de clorofila, se cosecharon 30 plantulitas y se colocaron en tubitos *ependorf* de 1,5 ml de capacidad, que contenían 1 ml de N-N'-dimetil formamida. Los mismos fueron mantenidos en oscuridad cubiertos con papel de aluminio.

Las muestras fueron almacenadas a 4°C en oscuridad durante 3 días antes de hacer las determinaciones de absorbancia en espectrofotómetro para calcular los niveles de clorofila de acuerdo a lo realizado por Inskeep y Bloom, (1985). Cada experimento fue realizado de 3 a 5 ocasiones independientes.

CAPITULO 2:

2.3. MODULACION DE LA SENSIBILIDAD A LAS SEÑALES LUMINICAS ASOCIADAS A LA DENSIDAD DE CULTIVO EN ARABIDOPSIS

2.3.1. INTRODUCCION

El entendimiento de los mecanismos involucrados en la modulación de la sensibilidad a la luz en plantas requiere abordar experimentos en condiciones controladas. De este modo, se establecieron los papeles de PKS1, PKS2 y COP1 en la modulación de la sensibilidad a la luz percibida por phyA y phyB (secciones 2.1. y 2.2.). Si bien este tipo de estudios es fundamental para resolver preguntas mecánicas, es importante tener en cuenta que bajo radiación natural las respuestas pueden ser diferentes (ver Capítulo 1).

La disminución de la sensibilidad a la R/RL sería una herramienta potencialmente útil para minimizar los efectos negativos de altas densidades sobre el rendimiento, A fin de evaluar el papel de los elementos de la cadena de transducción lumínica estudiados en esta tesis bajo radiación natural y analizar cuál/es de los elementos son más efectivos para aplacar las respuestas asociadas a altas densidades, se realizaron ensayos en invernáculo con plantas de Arabidopsis alteradas en los niveles de PKS1, PKS2, COP1 y phyB, cultivadas aisladas y a distintas densidades

Los **objetivos** de esta parte del Capítulo fueron (a) evaluar la respuesta a la luz natural de plántulas y plantas adultas de distintos genotipos con niveles alterados de elementos de la señalización lumínica estudiados en esta tesis y (b) evaluar la respuesta a la densidad de estas plantas a fin de determinar estrategias futuras para aplacar las respuestas a la densidad.

2.3.2. RESULTADOS

Se realizaron ensayos en invernáculo con plantas de *Arabidopsis* alteradas en los niveles de PKS1, PKS2, COP1 y phyB, cultivadas a distintas densidades. Gran parte de la información previa correspondiente a la funcionalidad de estos elementos corresponde a experimentos realizados en condiciones controladas de luz en el estadio de plántula. De la información previa que se contaba al inicio de estos experimentos (Fankhauser *et al.*, 1999), PKS1 sería un regulador negativo de la señalización del phyB. Por lo tanto se utilizó el mutante *pks1*, para evaluar si su ausencia produce insensibilidad a incrementos en la densidad o dicho de otro modo si produce mayor respuesta a la R del ambiente. PKS2 no había sido caracterizado previamente y se incluyó al mutante *pks2* con fines exploratorios de su respuesta a la densidad. Por lo expuesto previamente, COP1 bajo luz, promueve las respuestas inducidas por R, y reprime las respuestas a la RL y luz azul. Por lo tanto se incluyó a *COP1 OX* en este estudio. Dado que el papel de phyB, mediando las respuestas a la relación R/RL en *Arabidopsis* es bien conocida (Yanovsky *et al.*, 1995) y se sabe que la sobreexpresión de *PHYB* incrementa las respuestas a la R en condiciones controladas (Wagner *et al.*, 1991), la línea *PHYB OX* fue incluida en los estudios para evaluar el efecto que produce la sobreexpresión de *PHYB* bajo radiación natural y en distintas densidades de cultivo.

2.3.2.1. La sobreexpresión de *PHYB* produjo insensibilidad de las plántulas a la densidad

Para investigar la respuestas a la densidad bajo radiación natural de plántulas con niveles alterados de ciertos elementos de la señalización lumínica, se cultivaron los mutantes *pks1*, *pks2*, con su respectivo WT (Columbia) y líneas transgénicas *COP1 OX*, *PHYB OX*, con su respectivo WT (Nossen) en 5 densidades diferentes en un invernáculo durante 7 días. El patrón de RFA y el patrón de temperatura diario que recibieron las plantas se muestran en la Fig. 20 (A y B). Luego de inducir la germinación y permanecer 24 h en oscuridad, las plántulas fueron trasladadas a un invernáculo con temperatura parcialmente controlada, durante 7 días bajo radiación natural u oscuridad, luego de los cuales se les midieron parámetros morfológicos. Todos los genotipos presentaron apertura máxima de los cotiledones (datos no mostrados) en todas las densidades probadas. El WT (Columbia) y los mutantes *pks1* y *pks2* respondieron a la densidad del mismo modo.

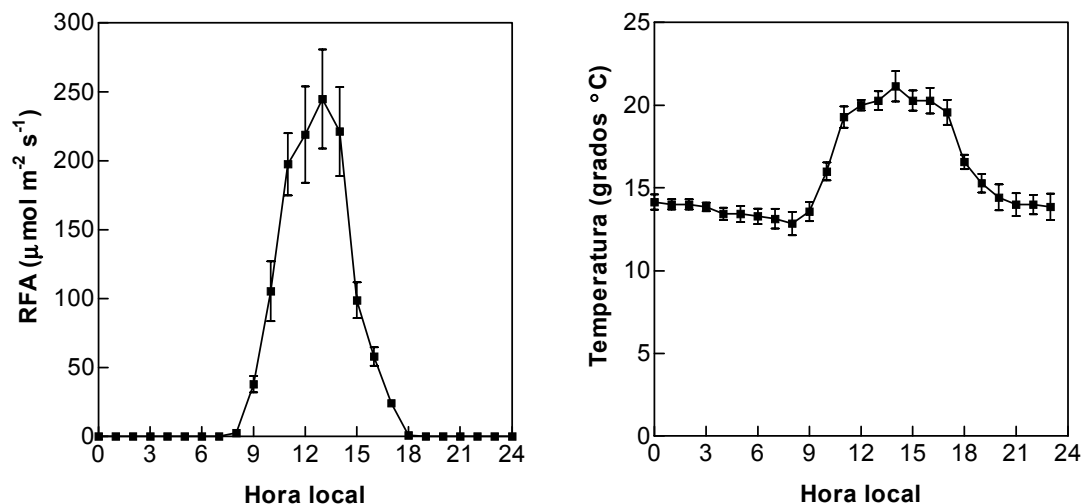


Figura 20. Marcha diaria promedio de radiación fotosintéticamente activa (RFA) y temperatura.

- (A) Promedio horario y EE del RFA que recibieron las cajitas durante los 7 días de tratamiento dentro del invernáculo.
 (B) Promedio horario y EE de la temperatura del invernáculo durante los 7 días de tratamiento.

Aumentos en la densidad resultaron en plántulas con hipocotilos más largos (pendiente distinta de cero para todos los genotipos; Fig. 21A). El ajuste de la regresión lineal mostró un $r^2 = 0.77$; 0.89 y 0.82 para el WT, *pks1* y *pks2*, respectivamente. Si bien los mutantes *pks1* parecieran poseer menor inhibición del hipocotilo en altas densidades, las diferencias no fueron significativas respecto del WT (Fig. 21A). Por otra parte, la línea *PHYB OX* fue completamente insensible a cambios en la densidad (su pendiente no difirió de cero, Fig. 2B). La línea *COPI OX* fue casi insensible a la densidad hasta una densidad de 4 plántulas cm^{-2} , pero a densidades mayores, respondió con pendiente similar a la del WT (Nossen) (Fig. 21B). En la densidad más baja (0.64 plántulas cm^{-2} o plántulas aisladas) sólo la línea *PHYB OX* presentó una mayor inhibición del alargamiento del hipocotilo respecto del WT. Todos los genotipos presentaron largo del hipocotilo similar a sus respectivos WT en oscuridad (datos no mostrados).

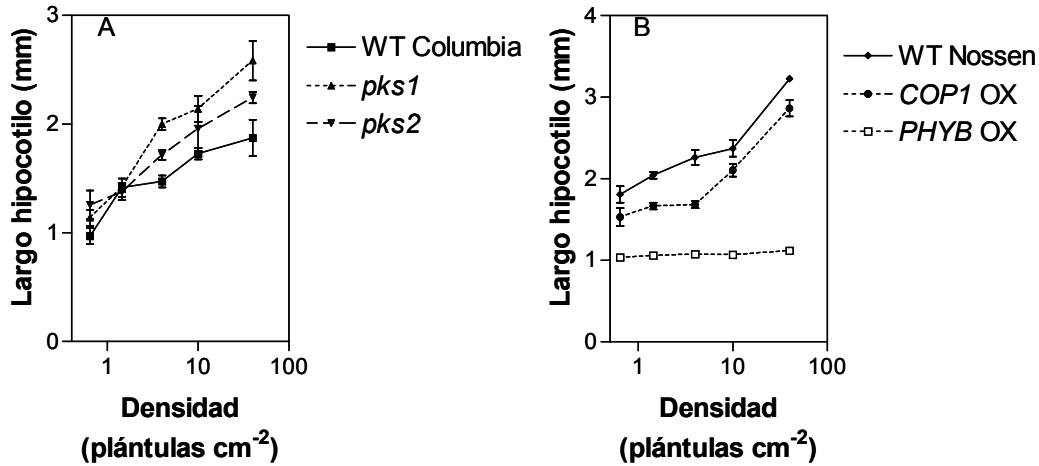


Figura 21. La sobreexpresión de *PHYB* produjo insensibilidad de las plántulas a la densidad.

(A) Plántulas de un día de los genotipos WT Columbia y los mutantes *pks1* y *pks2* fueron cultivadas en distintas densidades durante 7 días, bajo radiación natural. Cada punto del gráfico representa la media \pm EE de 4 réplicas.

(B) Idem (A) para los genotipos WT Nossen y las líneas transgénicas *COP1 OX* y *PHYB OX*.

2.3.2.2. La sobreexpresión de *PHYB* y *COP1* produjeron insensibilidad total y parcial de las plantas a la densidad

Para investigar las respuestas a la densidad en el estadio adulto, se cultivaron los genotipos evaluados anteriormente, en tres de densidades diferentes (0.4; 2.5 y 6.25 plantas dm⁻²). De los parámetros analizados, la plantas WT (Columbia) y los mutantes *pks1* y *pks2* sólo respondieron a incrementos en la densidad ubicando sus hojas en posición más erecta o con mayor ángulo de inserción foliar. Las mismas presentaron similar largo de la lámina foliar, del pecíolo, ancho de la roseta y ancho de la lámina foliar en todas las densidades probadas (datos no mostrados).

Las plantas del WT, accesión Nossen, presentaron mayor respuesta a la densidad que la accesión Columbia. En particular mostraron mayor largo del pecíolo (Fig. 22A), ángulo de inserción foliar (Fig. 22D) y menor largo de la lámina foliar (Fig. 22B) en respuesta a altas densidades.

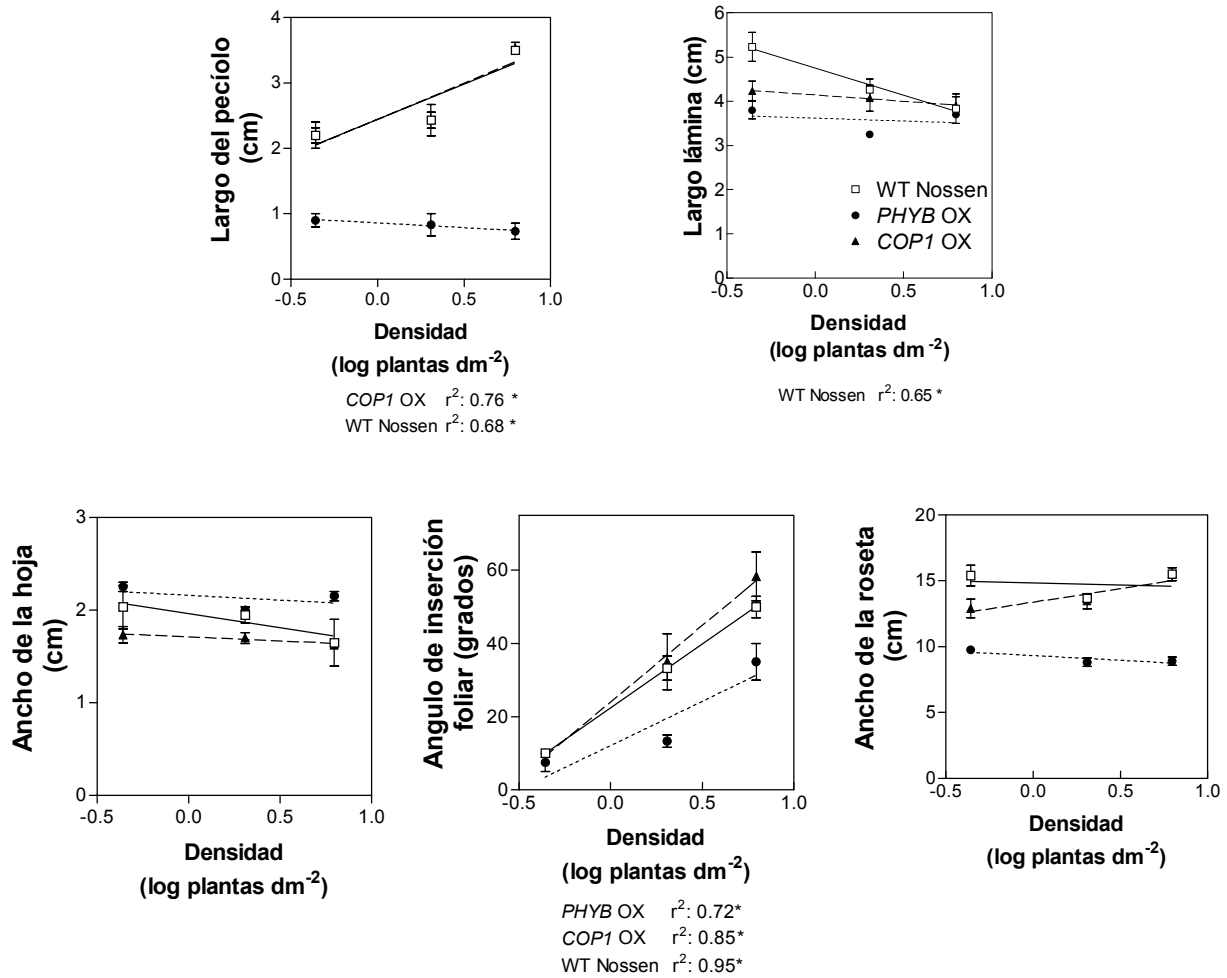


Figura 22. La sobreexpresión de *PHYB* y *COP1* produjeron insensibilidad total o parcial de las plantas adultas a la densidad

Se realizaron las siguientes mediciones morfológicas en plantas de 35 días cultivadas en el invernáculo: (A) largo del pecíolo, (B) largo de la lámina foliar, (C) ancho de la hoja, (D) ángulo de inserción foliar al mediodía, (E) ancho de la roseta. Los puntos en los gráficos representan la media \pm EE de 4 réplicas. Los asteriscos significan pendiente distinta de cero.

El ancho de la roseta y la lámina no cambiaron con la densidad (Fig. 22C y E respectivamente). La línea *COP1 OX* mostró respuestas similares al WT en función de la densidad para regular el largo del pecíolo (Fig. 22A), el ángulo de inserción foliar (Fig. 22D) y el ancho de la lámina y la roseta (Fig. 22C y E respectivamente). Sin embargo fue insensible a la densidad para regular el largo de la lámina foliar (Fig. 22B). Nuevamente la

sobreexpresión de *PHYB* aplacó los efectos de la densidad en el estadio de planta adulta. *PHYB OX* sólo presentó respuesta a la densidad para el ángulo de inserción foliar, pero difiriendo en magnitud de respuesta respecto del WT y *COPI OX* (Fig. 22D). La sobreexpresión de *PHYB* y *COPI* produjeron plantas aisladas (densidad más baja) con menor largo de la lámina foliar (Fig. 22B) y ancho de la roseta (Fig. 22E) respecto del WT Nossen. La línea *PHYB OX* también presentó menor largo del pecíolo respecto del WT (Fig. 22A).

Las plantas *PHYB OX* presentaron una morfología mucho más compacta y de menor tamaño que las WT y *COPI OX* en todas las densidades (Fig. 23). Esto repercutió negativamente sobre su capacidad para cubrir el suelo y capturar luz respecto del WT como se muestra la Fig. 4, tomada a los 28 días desde el transplante.

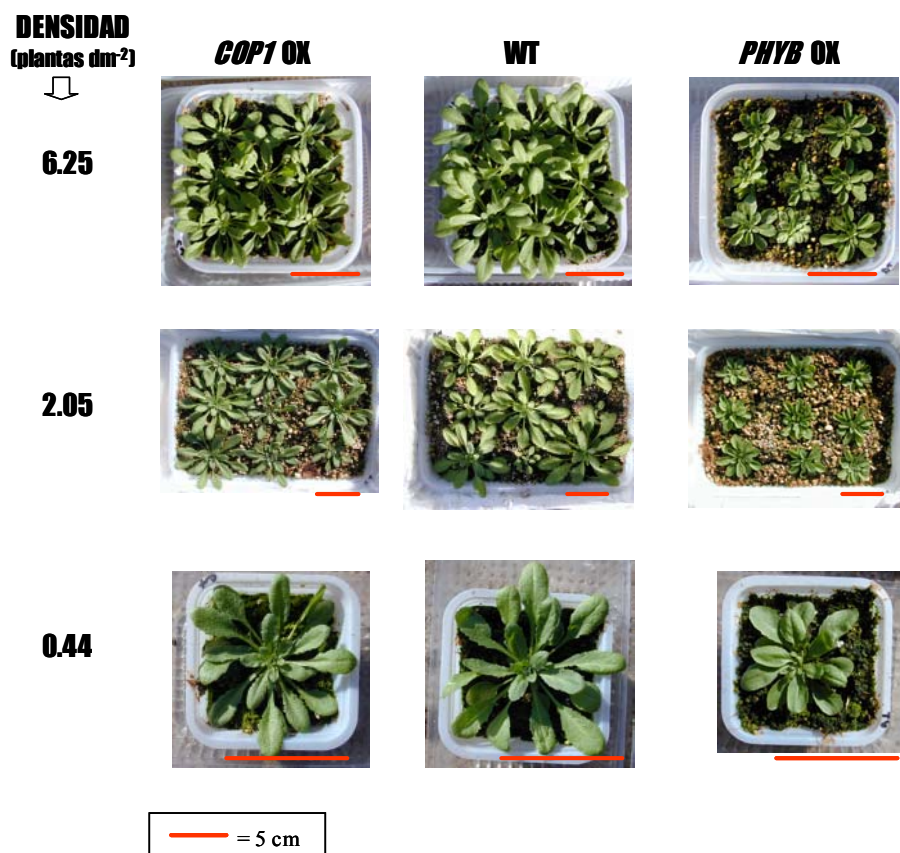


Figura 23. Fenotipo de *PHYB OX*, *COPI OX* y WT (Nossen) cultivados a distintas densidades a los 28 días luego del transplante.

2.3.3. MATERIALES Y METODOS

2.3.3.1. *Material Vegetal y condiciones de cultivo*

Se usaron los mutantes de *Arabidopsis pks1, pks2*, su respectivo WT (Columbia) y líneas transgénicas *COPI OX, PHYB OX*, con su respectivo WT (Nossen) descritos previamente en los Capítulos 2 y 3.

Semillas de los distintos genotipos fueron sembradas en cajitas transparentes conteniendo medio MS-agar (0.8% p/v) sin sacarosa. A fin de lograr las distintas densidades de plántulas, se sembraron las semillas a distintas distancias entre sí. Las densidades utilizadas fueron: 0,64; 1,44; 4; 10 y 40 plántulas cm^{-2} . Se realizaron 5 réplicas verdaderas para cada genotipo y densidad.

El invernáculo contaba con control de temperatura que logró equilibrar la temperatura nocturna a un promedio cercano a los 15 °C durante la noche y 20 °C durante el día. El fotoperíodo al inicio del ensayo (30 de junio) era de 12 h. Las mediciones de temperatura y radiación (RFA) fueron realizadas con frecuencia de un minuto de modo automática y guardadas en un *Data logger*.

Para los experimentos realizados con macetas se utilizaron bandejas conteniendo una mezcla de turba, perlita y vermiculita (1:1:1) y fueron regadas con solución nutritiva (Hakaphos Rojo, 18+18+18). El transplante se llevó a cabo el 12/7 (fotoperíodo: 12.3 h). Para lograr las distintas densidades las plántulas fueron ubicadas a distintas distancias entre sí en bandejas de diferentes tamaños según la densidad, hasta lograr densidades de 0.44; 2.05 y 6.25 plantas dm^{-2} . Las mediciones se realizaron sobre las plantas ubicadas en el centro de cada bandeja y el resto actuaron como bordura. Las mediciones morfológicas se realizaron 35 días luego del transplante (fotoperíodo: 13.2 h.).

2.3.3.2. *Observaciones morfológicas en plántulas y plantas adultas*

Las mediciones de los parámetros morfológicos en plántulas fueron realizadas a los 7 días desde el transplante del mismo modo que fue descrito en los capítulos anteriores. Las mismas se realizaron sobre las plántulas ubicadas en el centro de cada densidad utilizada.

Las mediciones en las plantas adultas (largo del pecíolo, largo y ancho de la lámina y ancho de la roseta) fueron realizadas en plantas de 35 días (desde el transplante), con una regla (aproximación 1 mm) en la hoja número 5, cuando la misma ya estaba totalmente

expandida. El ángulo de inserción foliar (respecto de la superficie del suelo) fue medido al mediodía con un transportador.

2.3.3.3. *Diseño experimental, análisis de datos y estadística*

El diseño experimental para los ensayos con distintas densidades fue en bloques asignados al azar (genotipos y densidades). Cada bloque estaba formado por 6 cajitas o bandejas correspondientes a los 6 genotipos utilizados. Se realizaron 5 bloques por densidad en el caso de los experimentos realizados en cajitas (plántulas) y 4 bloques para los ensayos realizados con bandejas (plantas adultas).

Para evaluar los efectos de la densidad se ajustaron los datos a través de regresiones lineales a rectas y se probó si su pendiente era significativamente distinta de cero, como criterio para determinar respuesta a la densidad.

Las comparaciones entre genotipos en los ensayos con plantas aisladas se realizó un análisis de ANVA de una vía (Dunnet) para comparar los distintos genotipos, respecto del WT. El programa usado para realizar las regresiones y ANVA fue el GraphPad de Prisma.

CAPITULO 2:

2.4. LA SOBREENPRESION DE PHYB DISMINUYE LOS EFECTOS DE LA DENSIDAD SOBRE EL RENDIMIENTO DE CULTIVOS DE PAPA REALIZADOS A CAMPO

2.4.1. INTRODUCCION

La población mundial alcanzará los 8000 millones de personas para 2025. Esto en combinación con las tendencias actuales en la composición dietaria, resultará en un incremento substancial en la demanda de calidad y cantidad de alimentos.

La habilidad para satisfacer esta demanda recaerá principalmente en el mejoramiento genético de los cultivos tanto a nivel de rendimiento potencial (el máximo rendimiento que puede alcanzar un cultivo bajo condiciones óptimas) y/o de mayor estabilidad (es decir menores fluctuaciones en el desempeño de los cultivos (Khush, 2001)). Aunque el rendimiento por unidad de superficie continúa incrementando para muchos cultivos, el rendimiento máximo no está mostrando esta misma tendencia obvia, y esto puede ser interpretado como que el rendimiento potencial está alcanzando su techo, mientras que la estabilidad del cultivo continúa creciendo (Mann, 1999). Algunos consideran que este techo representa el mayor rendimiento físicamente posible (Sinclair, 1993), pero otros confían que la incorporación de los nuevos avances en el conocimiento de la biología vegetal actual sorteará la tasa decreciente en aumentos del rendimiento potencial observada actualmente. Sin embargo, las modificaciones genéticas que parecen ser beneficiosas al ser analizadas a nivel celular o de planta no se traducen necesariamente en mayores rendimientos en el campo, tanto debido a efectos laterales negativos o simplemente porque no operan sobre los procesos limitantes del rendimiento en condiciones de campo.

El aplacado de las respuestas a bajas R/RL a través de manipulación genética de los genes de los fitocromos podría resultar en cultivos con mayor proporción de recursos localizados en el material a cosechar, en lugar de órganos no cosechables (Smith, 1992). Los resultados obtenidos en la Parte C de este Capítulo, mostraron claramente que la sobreexpresión de *PHYB* sería una estrategia efectiva para aplacar respuestas a la densidad

en Arabidopsis. Al inicio de esta tesis el grupo de la Dra Gatz de Alemania, había producido plantas de papa (*Solanum tuberosum*) transgénicas que sobreexpresan *PHYB* ectópico de *Arabidopsis thaliana* que incrementaron el rendimiento en tubérculos cuando fueron cultivadas en macetas en el invernáculo (Thiele *et al.*, 1999). Sin embargo, su comportamiento a nivel agronómico no fue probado en las bajas R/RL asociadas a cultivos densos en condiciones de campo (Moffat, 2000). Esto último no es un problema trivial, ya que se puede predecir que bajas relaciones R/RL reducirán las diferencias netas en la cantidad de Pfr entre las transgénicas y el genotipo salvaje. En Arabidopsis, plantas transgénicas que sobreexpresan phyB de avena responden en mayor o menor medida al R o RL con respecto al WT dependiendo del rango de R/RL en el cual se encuentren (McCormac *et al.*, 1993). La sobreexpresión de *PHYB* podría exagerar o desensibilizar la respuesta de cultivos de papa a la densidad del canopeo dependiendo del impacto actual de la densidad sobre la R/RL y la pendiente de las respuestas a dicha relación. A diferencia de phyB, phyA es más activo cuando se encuentra en condiciones con baja R/RL, es decir donde su labilidad es menor, su síntesis menos reprimida y su modo HIR inducido. Esto lleva a que su impacto sea incrementado en cultivos densos (Robson y Smith, 1996). Una razón extra para hacer un ensayo a campo, a través de la estrategia de reducir los efectos negativos de las señales lumínicas asociadas a un cultivo denso sobreexpresando el *PHYB*, es que estas plantas pueden sufrir simultáneamente la potencial desventaja que poseen las plantas con menor respuesta a la R/RL que no pueden optimizar la posición de los órganos que cosechan luz (Ballaré *et al.*, 1995; Ballaré *et al.*, 1997). Las respuestas de las plantas a señales relacionadas con la relación R/RL juegan un rol clave en minimizar la interferencia entre hojas en cultivos de maíz (*Zea mays*) (Maddonni *et al.*, 2002). Más aún, phyB puede alterar el tiempo de inicio de la tuberización (Jackson *et al.*, 1996), y esto podría modificar el impacto de la sobreexpresión de *PHYB* sobre el rendimiento a nivel de cultivo. Los objetivos de este Capítulo fueron (a) evaluar el efecto de la manipulación de los niveles de fitocromo B como estrategia de mejoramiento biotecnológico para incrementar el rendimiento de plantas cultivadas a campo en alta densidad y (b) analizar los cambios fisiológicos y ecofisiológicos que produce la sobreexpresión de fitocromo B en densidades de cultivo similares o mayores a las usadas comercialmente.

2.4.2. RESULTADOS

2.4.2.1. Efectos de la densidad sobre el largo del tallo de plantas transgénicas que sobreexpresan el transgen *PHYB*

En experimentos preliminares, se investigó el rango de densidades donde la manipulación de los niveles de phyB tuvo el mayor impacto sobre el crecimiento del tallo, un carácter típicamente bajo control del fitocromo. Para ello, plantas WT, cv Desireé, o sobreexpresantes de *PHYB* de *Arabidopsis*, llamadas Dara-5 y Dara-12 (cuyos niveles de expresión de *PHYB* fue aproximadamente 5 y 15 veces mayor que del WT respectivamente; Fig. 24A) fueron cultivadas al aire libre en macetas colocadas a diferentes densidades (usando para cada densidad la misma distancia entre y dentro de cada fila).

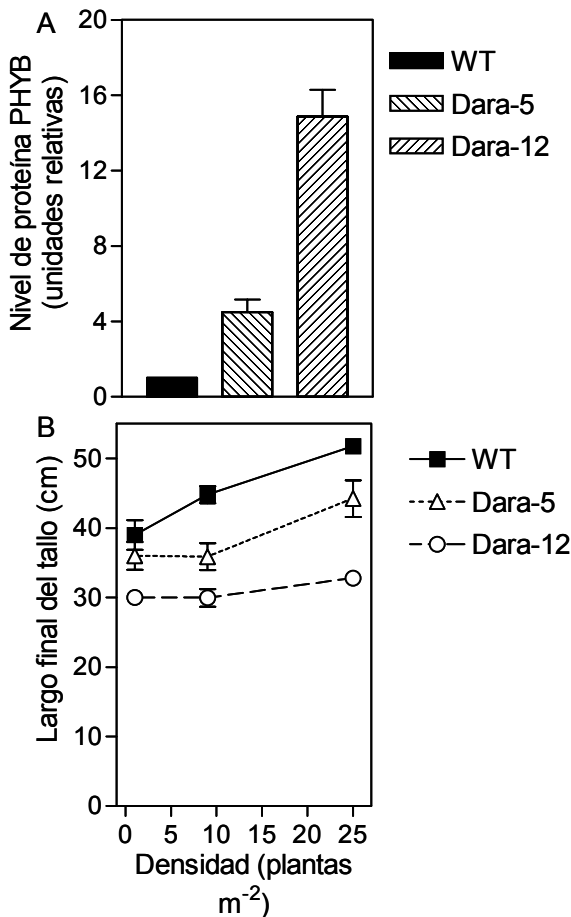


Figura 24. La expresión del transgen *PHYB* de *Arabidopsis* reduce la respuesta de alargamiento del tallo a la densidad.

(A) Niveles de proteína PHYB detectados en extractos de hojas de plantas cultivadas a campo. La división entre la intensidad de la banda correspondiente a la actividad de fosfatasa alcalina asociada a la detección inmunológica de PHYB sobre la cantidad de proteína total, detectada en la membrana por tinción reversible con Ponceau S, se expresó relativa a la misma división realizada para el WT.

(B) Largo del tallo vs densidad. Las plantas fueron cultivadas al aire libre en macetas en las densidades indicadas en la absisa. Los datos son la media y EE de cuatro bloques.

En el WT, el tallo incrementó su largo linealmente con la densidad (Fig. 24B).

Las dos líneas transgénicas sobreexpresantes de *PHYB* fallaron en responder a densidades de 1 y 9 plantas m^{-2} . La línea con mayor nivel de expresión de *PHYB*, Dara-12, retuvo una muy débil respuesta entre 9 y 25 plantas m^{-2} .

Sin embargo, la línea que expresa niveles intermedios de *PHYB*, Dara-5, mostró una respuesta similar a la del WT entre 9 y 25 plantas m^{-2} (Fig. 24B). Estas observaciones indican que a pesar de la reducción en la proporción de Pfr causada por bajas relaciones R/RL en las densidades más altas, las plantas transgénicas retuvieron altos niveles de phyB en su forma activa, Pfr. Como las diferencias entre las plantas WT y transgénicas fueron más evidentes entre 9 y 25 plantas m^{-2} , y dado que estos valores eran similares y de más del doble que las densidades utilizadas comercialmente, se usaron densidades dentro de este rango en los experimentos realizados a campo sobre el suelo.

2.4.2.2. Las plantas transgénicas sobreexpresantes de PHYB presentaron mayor ramificación, número de tubérculos y rendimiento en altas densidades de cultivo

Se cultivaron plantas WT y sobreexpresantes de *PHYB* en parcelas replicadas a campo en dos densidades de cultivo: 10 plantas m^{-2} (plantadas en filas separadas por 70 cm entre si) o 20 plantas m^{-2} (plantadas en filas separadas por 35 cm entre si). La distancia entre plantas dentro de cada fila fue de 15 cm en ambas densidades. Es decir que se reguló la densidad incorporando filas intermedias a la densidad más baja. La sobreexpresión de *PHYB* produjo un incremento en el número de ramas, número de tubérculos y rendimiento en peso fresco de tubérculos por planta, principalmente cuando se cultivaron en la mayor densidad, de 20 plantas m^{-2} (Fig. 25A). En esta densidad, el peso por tubérculo disminuyó en las transgénicas como consecuencia de que su número de tubérculos se incrementó más que su rendimiento por planta (en 20 plantas m^{-2} ; WT: 55.1 ± 2.6 g tubérculo $^{-1}$; Dara-5: 47.2 ± 7.7 g tubérculo $^{-1}$; Dara-12: 44.9 ± 4.7 g tubérculo $^{-1}$). En el WT, el número de tubérculos por planta decreció con la densidad, pero en las plantas transgénicas sobreexpresantes de *PHYB*, el número se incrementó. Esto sugiere que la respuesta a la densidad sobre el número de tubérculos podría ser la resultante de un balance entre efectos negativos (por ej. menor RFA; menor R/RL) y positivos (por ej. menores temperaturas; [Jackson, 1999]); siendo este balance positivo para las transgénicas. Por otra parte al

incrementar la densidad, las plantas WT presentaron menor rendimiento por planta, sin embargo las transgénicas no alteraron su rendimiento con la densidad (Fig. 25).

El tiempo a floración fue acelerado en las transgénicas, particularmente en altas densidades (en 20 plantas m^{-2} ; WT: 44.1 ± 1.4 días; Dara-5: 34.7 ± 1.5 días; Dara-12: 36.2 ± 2.1 días; $P < 0.01$).

Relación R/RL en canopeos de plantas WT y transgénicas

Es de esperar que incrementos en la densidad provoquen reducciones en la relación R/RL del cultivo, así como también una disminución del impacto de la sobreexpresión de *PHYB* ya que en términos absolutos bajan los niveles de Pfr. Sin embargo se encontraron que las mayores diferencias en el rendimiento entre el WT y las transgénicas no ocurrieron en la densidad de 10 plantas m^{-2} , sino en la de 20 plantas m^{-2} . Dado que las plantas Dara-5 y Dara-12 son más achaparradas que el WT, los canopeos transgénicos podrían experimentar reducciones más débiles de la relación R/RL al incrementar su densidad y en este sentido exacerbar su impacto sobre el rendimiento en altas densidades. Sin embargo, este no fue el caso. Se colocó un sensor de R y RL en la base de las plantas apuntando hacia su vecino más próximo dentro de la misma fila (es decir hacia el norte o el sur en un cultivo cuyas filas fueron orientadas en dirección norte-sur) y hacia las otras filas (es decir hacia el oeste o este). La relación R/RL registrada al colocar el sensor orientado hacia las vecinas de la misma fila, fue menor y no mayor para los dos cultivos transgénicos (Fig. 26). Cuando el sensor fue colocado apuntando hacia las filas adyacentes, la reducción en la distancia entre filas para las dos densidades se reflejó en menores relaciones R/RL, pero se observó poca diferencia entre el WT y los cultivos transgénicos (Fig. 26). También se encontraron menores relaciones R/RL en los cultivos transgénicos, al colocar el sensor apuntando hacia arriba en distintos estratos del canopeo (datos no mostrados).

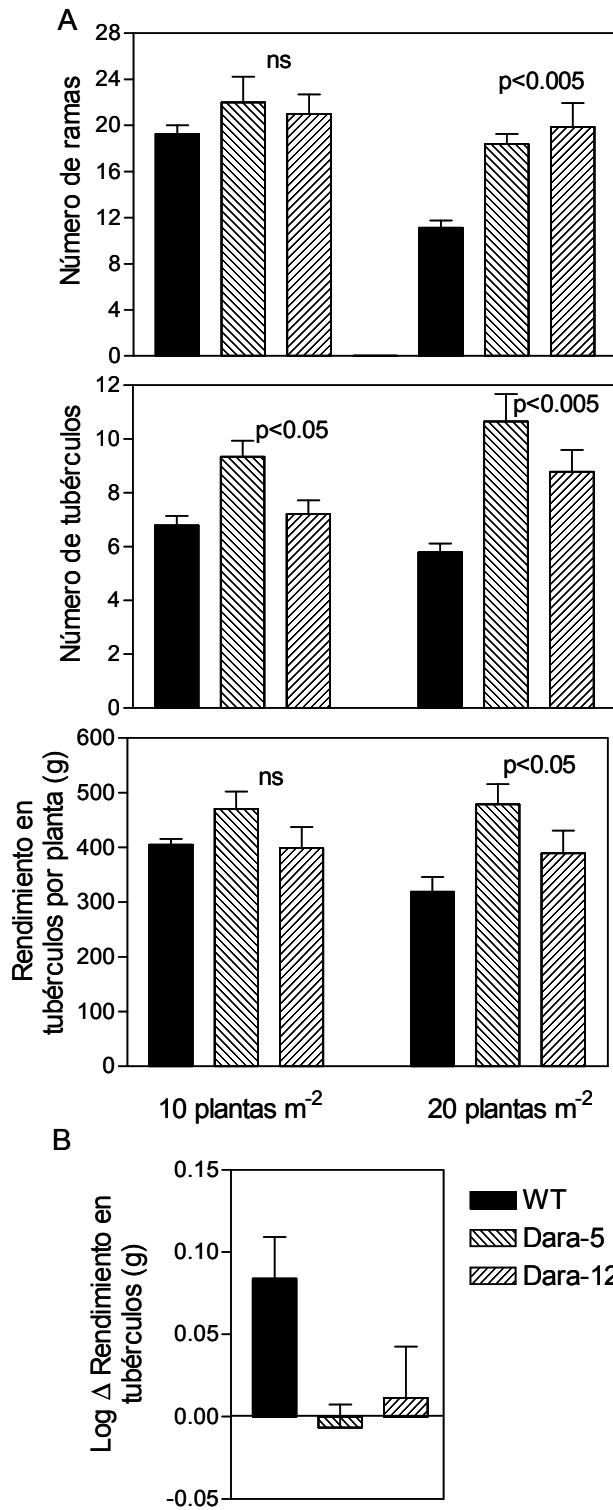


Figura 25. Comportamiento a campo de plantas de papa WT (*Desirée*) o de líneas expresando el transgen *PHYB* de *Arabidopsis* (*Dara-5* y *Dara-12*).

(A) Número de ramas, tubérculos, y rendimiento en tubérculos. La densidad utilizada fue de 10 o 20 plantas m⁻² (70 o 35 cm entre filas, respectivamente).

(B) Respuesta del rendimiento en tubérculos a la densidad de plantas. Notar que el EE sobreestima el error usado en el ANVA debido a que la utilización de bloques redujo el error.

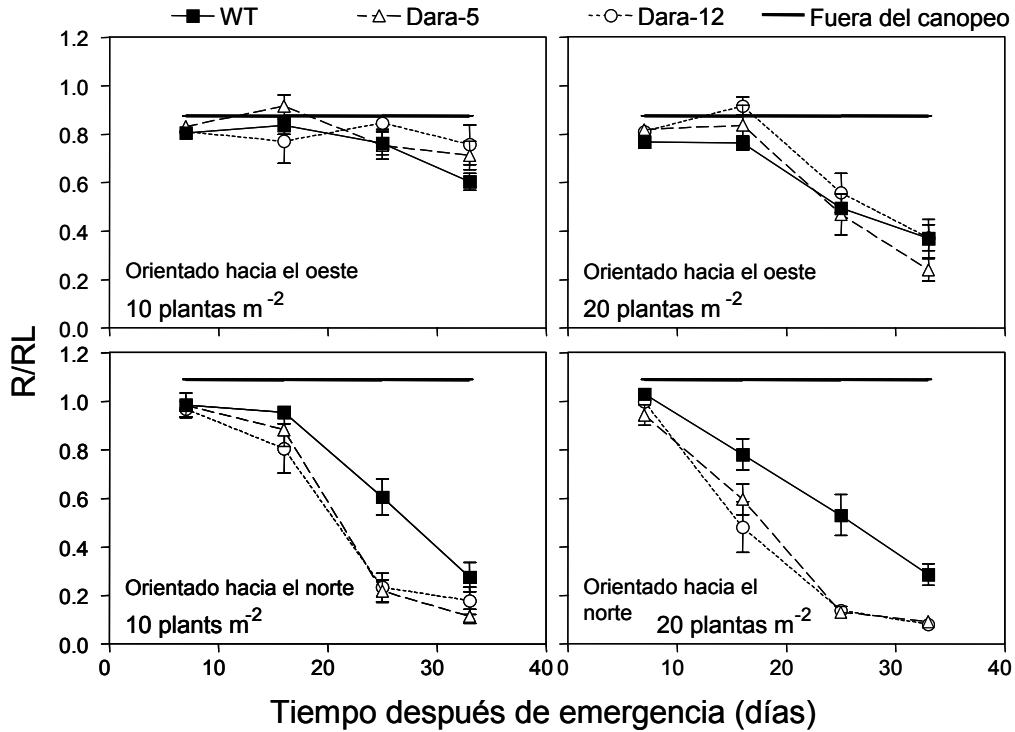


Figure 26. La expresión del transgen *PHYB* de *Arabidopsis* modifica las señales asociadas a la relación *R/RL* en cultivos de papa.

Se midió la relación *R/RL* propagada horizontalmente al mediodía. Se colocó el sensor en la base de las plantas orientado hacia las plantas vecinas ubicadas en diferentes filas (orientado hacia el oeste) o dentro de la misma fila (orientado hacia el norte). Los datos corresponden a la media y EE de cuatro mediciones independientes.

2.4.2.4. Intercepción de *RFA* por las plantas *WT* y transgénicas

En las dos densidades experimentadas, las líneas transgénicas mostraron una habilidad reducida para interceptar radiación en sus estadios tempranos de desarrollo del canopeo (Fig. 27A). Estas diferencias se estrecharon con el crecimiento del canopeo, alcanzando niveles similares a los del *WT* más rápidamente en la densidad de 20 plantas m^{-2} que en la de 10 plantas m^{-2} (Fig. 27B). La distribución vertical de luz en el canopeo también fue afectada por la sobreexpresión de *PHYB*, particularmente en la mayor densidad. El análisis del perfil de extinción de luz dentro del canopeo mostró que las *RFA* que alcanzaron los estratos medio e inferior del canopeo de *Dara-5* y *Dara-12* fue menor

que en el canopeo del WT (Fig. 27C). Esto indica que incrementos en los niveles de phyB aumentaron la proporción de radiación interceptada por el estrato superior comparado con los inferiores. Por lo tanto, se midió la capacidad fotosintética de hojas de diferentes estratos para investigar el impacto de este perfil de luz sobre la fotosíntesis del canopeo.

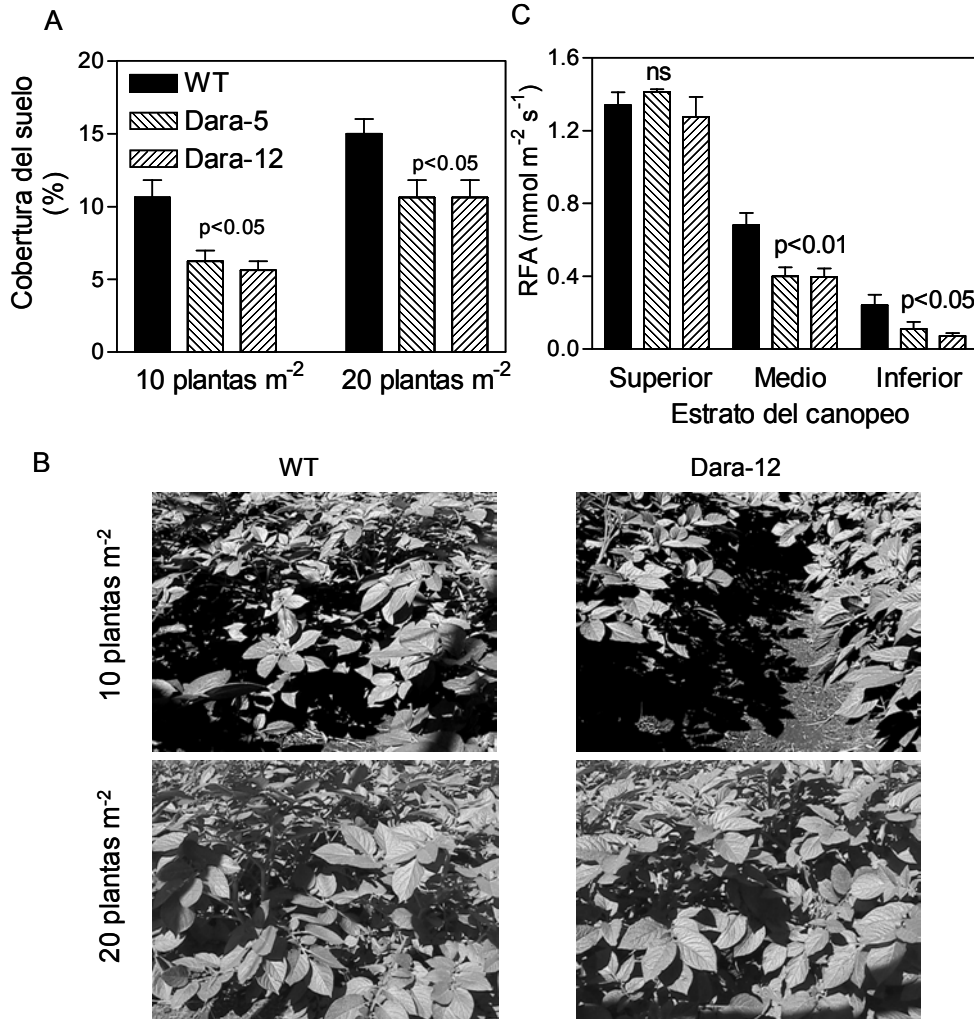


Figura 27. Intercepción de RFA por cultivos de papa WT o líneas expresando el transgen PHYB (Dara-5 y Dara-12).

(A) Intercepción de luz (10 d después del transplante).

(B) Los cultivos transgénicos fallan para cubrir todo el suelo cuando son cultivados a 10 plantas m⁻², pero este efecto se diluye en densidades de 20 plantas m⁻² (48 d después del transplante)

(C) Irradiancia alcanzando diferentes estratos del canopeo (20 plantas m⁻²; 48 d después del transplante). Los datos son las medias y EE de cuatro réplicas.

2.4.2.5. Fotosíntesis

Para investigar la capacidad fotosintética de cultivos de papa sobreexpresantes de *PHYB*, se midió la tasa neta de incorporación de CO₂ en distintos estratos del canopeo y con diferentes niveles suplementarios de luz. Suministrando RFA de 160 μmol m⁻² s⁻¹, la tasa de incorporación de CO₂ no fue significativamente diferente entre el WT y las líneas transgénicas. Para estos valores de RFA se observó poca respuesta a la posición de las hojas dentro del canopeo (Fig. 28A). A mayores RFA, particularmente 900 o 1300 μmol m⁻² s⁻¹, las hojas de las transgénicas mostraron una tasa de incorporación de CO₂ significativamente mayor en cualquier posición dentro del canopeo. Las hojas ubicadas en la parte superior del canopeo sólo alcanzaron saturación en el mayor RFA ensayado. Sin embargo, a pesar de que la capacidad fotosintética de las hojas del WT, ubicadas en posiciones intermedias e inferiores dentro del canopeo fueron virtualmente saturadas por el menor RFA (200 μmol m⁻² s⁻¹), las plantas transgénicas retuvieron una fuerte respuesta incrementos en la RFA (Fig. 28A). Lo último fue particularmente obvio para el estrato medio del canopeo donde el comportamiento de las hojas de las plantas transgénicas fue muy parecido al de las hojas ubicadas en la parte superior del canopeo.

Al menos al mediodía, la tasa actual de incorporación de CO₂ (es decir la tasa observada en cada posición dentro del canopeo medida con los niveles de radiación que alcanzaban a ese punto) fue incrementada por el transgen *PHYB* de Arabidopsis, al menos para los estratos superior e intermedio del canopeo (Fig. 28B). Resumiendo, el incremento en los niveles de phyB disminuyeron la intercepción de RFA, particularmente en el canopeo con filas distantes entre si, incrementaron la tasa fotosintética máxima en todos los estratos del canopeo y alteraron el perfil de distribución favoreciendo a las hojas ubicadas en el estrato superior (con mayor potencial fotosintético) comparados con las hojas ubicadas más abajo. Al realizar estimaciones de la tasa de fotosíntesis de todo el canopeo al mediodía, se puede predecir que los cultivos transgénicos incrementaron aproximadamente un 80% dicha tasa cuando fueron cultivados en filas separadas por 35cm entre si. Esta diferencia se diluiría significativamente a menores densidades debido a una menor intercepción de RFA de los cultivos transgénicos.

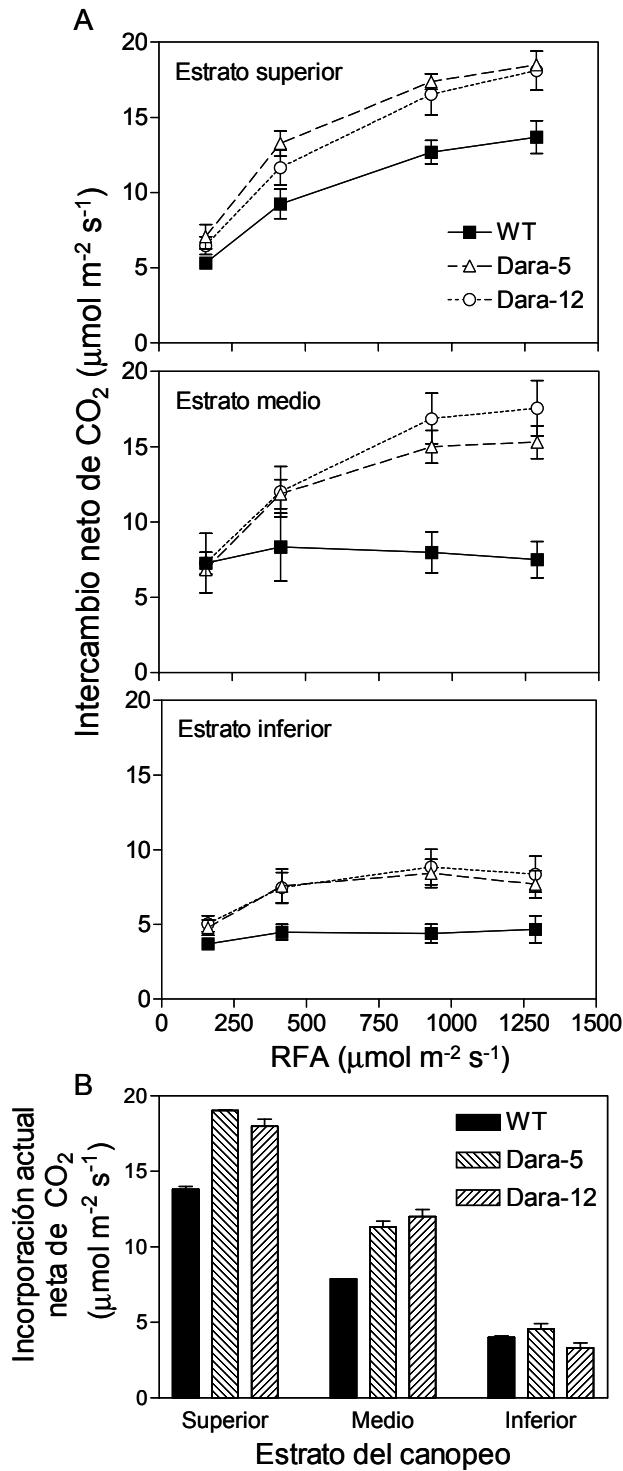


Figura 28. La sobreexpresión de *PHYB* incrementó el intercambio neto de CO₂ en todo el canopeo

(A) Respuesta de incorporación neta de CO₂ por unidad de área foliar al RFA para los distintos estratos del canopeo en función de la RFA.

(B) Intercambio neto actual de CO₂ por unidad de área en hojas de diferentes estratos de plantas WT o expresando el transgen *PHYB* de *Arabidopsis* (Dara-5 y Dara-12). La densidad de plantas fue de 10 (A) o 20 (B) plantas m⁻². Los datos son medias y EE de 4 réplicas.

2.4.2.6. Conductancia estomática

Con el fin de entender las bases fisiológicas de la mayor fotosíntesis máxima presente en las plantas transgénicas se realizó un análisis de diversos factores que afectan el proceso fotosintético. Ambas líneas transgénicas mostraron tasas fotosintéticas similares, pero los niveles de clorofila por unidad de área foliar fueron significativamente mayores en la línea Dara-12 ($17.5 \pm 0.6 \mu\text{g cm}^{-2}$) que en Dara-5 ($12.6 \pm 0.3 \mu\text{g cm}^{-2}$), el cual difirió marginalmente del WT ($10.8 \pm 0.3 \mu\text{g cm}^{-2}$). Las diferencias en área foliar específica también fueron menores que las diferencias observadas para las tasas fotosintéticas (Dara-12, $5.4 \pm 0.1 \text{ mg cm}^{-2}$; Dara-5, $5.0 \pm 0.2 \text{ mg cm}^{-2}$; $4.5 \pm 0.1 \text{ mg cm}^{-2}$). Estos datos indicarían que principalmente las diferentes tasas fotosintéticas por área foliar de las líneas sobreexpresantes de *PHYB* no fueron consecuencia directa de hojas más verdes o más gruesas. Al menos no parecen ser estos los factores determinantes de la magnitud de las diferencias observadas. En un análisis de marcha diaria de la incorporación máxima de CO_2 realizado en hojas del estrato superior (es decir en hojas no sombreadas) mostraron que las máximas diferencias entre el WT y las plantas transgénicas se presentaron en la porción central del fotoperíodo (Fig. 29A; estas mediciones fueron realizadas usando la fuente de luz del medidor de fotosíntesis fijado en un RFA de $1300 \mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Tampoco se observaron diferencias significativas cuando las mediciones de tasas de intercambio de CO_2 fueron realizadas de noche, indicando que la sobreexpresión de *PHYB* no afectó la tasa respiratoria (WT, $-1.4 \pm 0.1 \mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; Dara-5, $-1.6 \pm 0.2 \mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; Dara-12, $-1.7 \pm 0.3 \mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Estas observaciones indicaban que el factor limitante de la tasa fotosintética a altas irradiancias estaba bajo control diurno. El análisis del patrón diario de conductancia estomática (Fig. 29B) puso de manifiesto su papel central en el control de la tasa fotosintética máxima y la mayor respuesta observada para las transgénicas sobreexpresantes de *PHYB*.

La densidad estomática no fue significativamente afectada por el transgen *PHYB*, (WT, 134 ± 11 poros mm^{-2} ; Dara-5 129 ± 13 poros mm^{-2} ; Dara-12 142 ± 11 poros mm^{-2}), indicando que el incremento en incorporación de CO_2 en las transgénicas se debería principalmente a incrementos en la apertura del poro estomático. También se pudo observar que la tasa transpiratoria de las hojas acompañaron a los efectos de los niveles de *phyB* sobre la fotosíntesis (Fig. 29C).

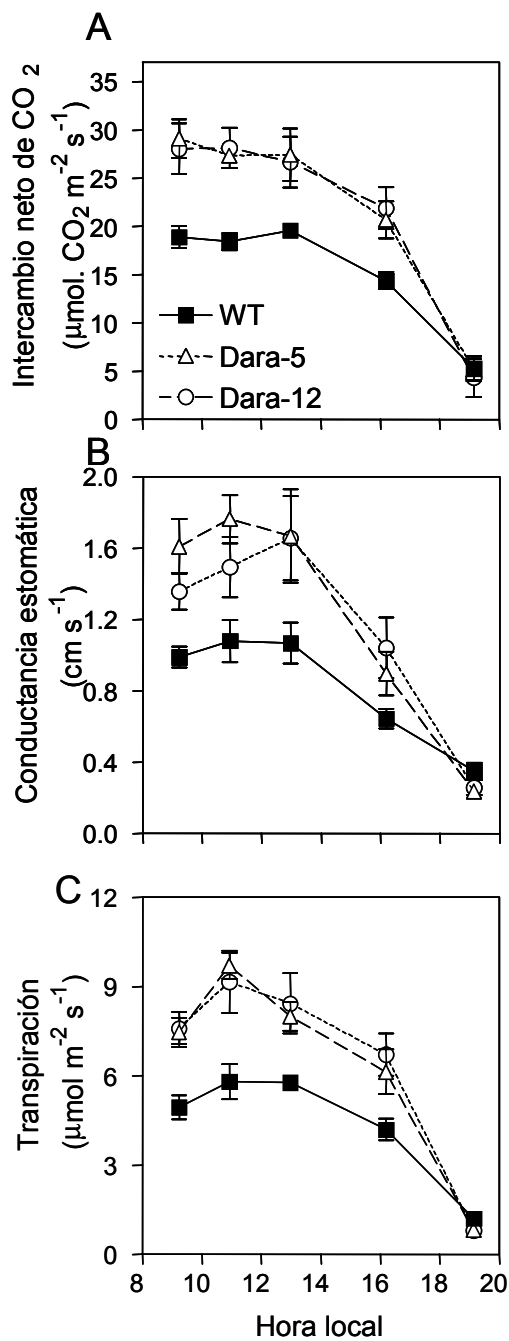


Figura 29. Marcha diaria de:
 (A) Intercambio máxima de CO₂ por unidad de área foliar, (B) conductancia de CO₂ (C) y transpiración en hojas del estrato superior de plantas WT, Dara-5 y Dara-12

2.4.3. MATERIALES Y METODOS

2.4.3.1. Material vegetal

Se utilizaron plantas de papa (*Solanum tuberosum*) cv Désirée como genotipo salvaje (WT). La producción y caracterización fisiológica de las dos líneas transgénicas (Dara-5 y Dara-12) portando el gen *PHYB* de Arabidopsis bajo el control del promotor 35S ya fue descrito previamente (Thiele *et al.*, 1999). Las líneas usadas en este trabajo fueron propagadas desde tubérculos cedidos por la Dra. Christiane Gatz del Institute für Pflanzenwissenschaften Allgemeine und Entwicklungsphysiologie der Pflanze, Alemania. Utilizamos papa-semilla de aproximadamente 6 cm de diámetro como material vegetal para iniciar las experiencias en macetas o sobre el suelo.

2.4.3.2. Condiciones experimentales

2.4.3.2.1. Experimento preliminar en macetas

Se realizó un primer experimento con plantas de papa cultivadas en macetas (65 litros) conteniendo una mezcla de suelo:arena (1:1 (v/v)). Las macetas fueron dispuestas en la parcela en 3 densidades diferentes (1, 9 y 25 plantas m⁻²) en un diseño cuadrado (es decir igual distancia entre filas y columnas para cada densidad). Se usó un diseño en bloques aleatorizado con 4 réplicas verdaderas. Cada bloque estuvo conformado por 9 plantas de cada genotipo (8 de bordura y una ubicada en el centro, a la cual se le efectuaron las mediciones). El suelo de la parcela utilizada para el ensayo fue cubierto con un plástico negro para evitar la emergencia de malezas que pudieran interferir con el ambiente lumínico. Las macetas fueron cubiertas por fuera con plásticos blancos a fin de disminuir diferencias en temperatura entre densidades. A lo largo del ciclo del cultivo se aplicó insecticida (Lorsban Plus 0.5 ml/l) y fungicida (Benomil 2 gr/l). El fotoperíodo al momento de la siembra fue de 14.17 h. Las plantas fueron regadas diariamente en forma automática a través de un sistema de riego por goteo y fertilizadas con 12-5-14 N-P-K y Mg (Nitrofoska, Basf, Bélgica) en 3 oportunidades (1 gr/maceta) a lo largo del ciclo.

2.4.3.2.2. Experimentos en el suelo

Se realizaron dos experimentos en el suelo de parcelas experimentales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (34° 35' S, 58° 29' W). Para

lograr un suelo óptimo para el desarrollo de los tubérculos, se adicionó y mezcló con los 10 primeros cm de suelo, aproximadamente $0.2 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2}$ de tierra negra y $0.2 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2}$ de arena. Se sembró papa-semilla en cajones plásticos (70 x 50 x 20 cm) que contenían una mezcla 1:1 (v/v) de tierra y arena. Los mismos fueron ubicados en un invernáculo hasta emergencia. De este modo se logró mayor uniformidad en las plantas transplantadas al inicio del ensayo escogiendo las que emergieron en fechas similares. Las plántulas fueron transplantadas al campo a una distancia de 15 cm entre plantas de la misma fila. La distancia entre filas fue de 0.7 o 0.35 m (es decir aproximadamente 10 o 20 plantas m^{-2}). Se utilizó un diseño en bloque aleatorizado para ambos experimentos con cuatro réplicas verdaderas. Cada parcela, constaba de 3 filas paralelas con 14 plantas cada una. Las 2 filas externas y las 2 plantas de los extremos de la fila del medio fueron consideradas como bordura. Ver esquema diseño experimental y foto del ensayo (Fig. 8). Todas las mediciones fueron hechas en la fila del medio de cada parcela, donde se podían realizar mediciones a un máximo de 12 plantas. De todos modos, a los fines estadísticos se utilizó sólo el promedio de las mediciones realizadas dentro de cada parcela como replica verdadera. El fotoperíodo al momento de la siembra a principios de Febrero fue de 13.3 (primer experimento) o 13.6 hs. (segundo experimento). Las plantas fueron regadas al atardecer inundando los surcos cada vez que fue necesario (cada 2 o 3 días aproximadamente dependiendo de las lluvias y la demanda ambiental del momento) y fertilizadas (a los 10, 22 y 35 días luego del transplante) con 10 g m^{-2} de 12-5-14 N-P-K y Mg (Nitrofoska, Basf, Bélgica).

2.4.3.3. Western Blotting

Los niveles de PHYB ya habían sido determinados por Thiele *et al.*, (2000); donde encontraron que las líneas Dara-5 y Dara-12 expresaban 4 y 20 veces los niveles del WT. Sin embargo a los fines de confirmar que las plantas utilizadas en estos ensayos unas generaciones después de su producción aún conservaban niveles similares de sobreexpresión en los ensayos realizados a campo. Se realizó una detección inmunológica (*western blotting*) para determinar los niveles de PHYB bajo nuestras condiciones experimentales. A tal fin se extrajeron 100 mg de hojas del estrato superior del canopeo de plantas crecidas a campo siguiendo el método de extracción de proteínas descrito por Martínez-García y col. (1999). El gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y la unión del

anticuerpo anti-phyB Mab B6-B3 (Hirschfeld *et al.*, 1998), fueron previamente descritos en Boccalandro *et al.* (2001). La intensidad de las bandas detectadas (tanto las debidas a la actividad de la fosfatasa alcalina asociada a phyB, así como la asociada a las proteínas de cada calle de la membrana luego de la transferencia proteica y tinción con Ponceau S) fueron cuantificadas con un sistema de detección y cuantificación de bandas (Fluor-S Multimager, Bio-Rad, Hercules, CA). Los niveles de PHYB se expresaron como valores relativos a los del WT (Fig. 1A). A tal fin se promediaron dos replicas verdaderas, donde las bandas correspondientes a PHYB se relativizaron a la intensidad de cada calle en las membranas teñidas con rojo Ponceau.

2.4.3.4. Descripción del ambiente lumínico

La radiación fotosintéticamente activa (RFA) fue medida con un radiómetro Li-188B (Lincoln, NE) con un sensor remoto lineal colocado a nivel del suelo tanto sobre la fila o entre filas orientado hacia arriba. Para las mediciones en la fila, el sensor remoto fue también colocado a diferentes alturas relativas a la altura máxima promedio del canopeo (0.8 [estrato superior], 0.5 [estrato intermedio] y 0.2 [estrato inferior]). La proporción del suelo cubierta por el canopeo fue medida usando un implemento descrito por Casal *et al.*, 1986. La relación R/RL fue medido con un espectralradiómetro (Skye Instruments Ltd, Llandrindod Wells Powys, Reino Unido) que sensa la porción del R y RL del espectro solar con picos en 660 nm (R) y 730 nm (RL). El sensor remoto fue colocado horizontalmente en la base de las plantas, a distintas alturas dentro del canopeo, orientado hacia las plantas vecinas dentro de cada fila (dirección norte y sur) o hacia las filas adyacentes (dirección este y oeste). El promedio de 2 mediciones por bloque fue utilizado para el análisis estadístico.

2.4.3.5. Medidas relacionadas con el crecimiento y desarrollo

Se utilizó una regla de 1 m de longitud para medir el largo del tallo desde la superficie del suelo hasta el ápice. El número final de ramas fue contado 45 días luego de la emergencia del vástago (una vez que ya no aparecieron más ramas).

El tiempo a antesis floral fue tomado diariamente para cada planta y fue expresado como la cantidad de días luego de la emergencia. Los tubérculos fueron cosechados 104 días luego la emergencia del vástago, (conservados a 5 °C durante 5 días como máximo) y pesados con un error de 0.1 g.

Todas las mediciones (largo de tallo, número de ramas y tiempo a floración) se realizaron en las 12 plantas ubicadas en la fila del medio de cada parcela y su promedio fue utilizado como una réplica verdadera en los análisis estadísticos.

Para determinar el área foliar específica se tomaron 5 discos de lámina foliar (de 0.5 cm de diámetro), provenientes de 5 plantas distintas dentro de cada parcela, de hojas ubicadas en el estrato superior del canopeo y se colocaron en tubos *eppendorf* abiertos en la estufa a 65 °C por 48 h. Luego de ese período se los pesó y se calculó el área foliar específica dividiendo el área total de los 5 discos de hojas por el peso seco de los mismos.

2.4.3.6. Medidas de fotosíntesis y conductancia estomática

Se utilizó un sistema analizador infrarrojo de gases de cámara cerrada (LI-COR 6200) para determinar intercambio de CO₂ y conductancia. Se realizaron mediciones en 2 plantas dentro de cada parcela (4 bloques), para cada estrato del canopeo (estrato superior, medio e inferior) y para cada genotipo (WT, Dara-5 y Dara-12). El intercambio de CO₂ bajo 160, 415, 930 y 1290 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de RFA fue medido para cada hoja muestreada, usando una cámara de 0.25 l unida a una fuente de luz roja regulable en su intensidad (QB1 205LI-670, Quantum Devices Inc., Barneveld, WI). Durante las mediciones en las hojas se marcó la porción de la hoja que entraba dentro de la cámara y luego de las mediciones las hojas fueron cosechadas y se determinó el área de dicho sector. Este dato fue fundamental para ajustar los datos de intercambio gaseoso por unidad de área foliar.

Para las mediciones de clorofila, discos (de 0.5 cm de diámetro) de las mismas hojas utilizadas para las determinaciones de fotosíntesis fueron cosechados y colocados en 1 ml de N-N-dimetil formamida dentro de un *eppendorf* que fue mantenido en oscuridad. Los mismos se almacenaron a 4 °C durante 3 días antes de las determinaciones de absorbancia en un espectrofotómetro y luego se calcularon los niveles de clorofila según lo descrito por Inskeep y Bloom (1985).

CAPITULO 3: DISCUSION

3.1 MODULACION DE LA SENSIBILIDAD A LA LUZ POR PKS1 Y PKS2

Muchas evidencias indican que PKS1 y PKS2 juegan un papel global en una rama discreta de la señalización de phyA. Primero, *pks1* y *pks2* mostraron mayor apertura de los cotiledones, inhibición del alargamiento del hipocotilo y bloqueo del desarrollo normal de la acumulación de clorofila en respuesta a pulsos breves horarios de RL, pero no hicieron lo mismo bajo RL continua o pulsos horarios de R. Estos resultados indican que PKS1 y PKS2 específicamente afectaron la vía de señalización del VLFR de phyA, pero no la HIR de phyA o la LFR de phyB (Fig. 10). Segundo, el mutante nulo de *phyA* fue completamente epistático sobre las mutaciones *pks1* y *pks2* bajo pulsos de RL (Fig. 10). Tercero, *pks1* y *pks2* retuvieron niveles normales de phyA en las condiciones donde mostraron fenotipos diferentes al WT (Lariguet *et al.*, 2003). Más aún la R sólo causó incrementos transientes de la expresión de *PKS1* en el hipocotilo y en los niveles proteicos del producto de este gen, mientras que el RL mantuvo niveles elevados sostenidos de la expresión de *PKS1* en el hipocotilo y de su proteína, PKS1 (Fig. 8 y 9). Este patrón de regulación por luz es consistente con un papel en la señalización de phyA.

Sorprendentemente, el doble mutante *pks1 pks2* abolió el efecto de las mutaciones simples, sugiriendo que PKS1 y PKS2 actúan de modo antagónico (Fig. 11). Más aún, la sobreexpresión de *PKS1* y *PKS2*, o la eliminación de la actividad de PKS1 y PKS2, dieron origen a fenotipos similares (Fig. 11A y B) sin causar cosupresión de estos genes (Lariguet *et al.*, 2003). Basados en estos datos, se propone un modelo genético en el cual PKS1 y PKS2 actúan como reguladores positivos del VLFR, mientras que inhiben mutuamente la actividad del otro (Fig. 12A). La inhibición mutua explica porque en el WT los roles de PKS1 y PKS2 están enmascarados, explicando de este modo la ausencia de un fenotipo distinto del WT, en el doble mutante *pks1 pks2* durante el VLFR de phyA. De acuerdo a este modelo, cuando el balance entre PKS1 y PKS2 es modificado, el VLFR debería ser perturbado aún más. Para probar esta idea, se sobreexpresaron *PKS1* en el acervo del mutante *pks2* y viceversa. De acuerdo con la propuesta, estas plántulas presentaron mayores respuestas a pulsos horarios de RL respecto de los mutantes simples o los sobreexpresantes

simples (Fig. 12B y C). A partir de estos datos genéticos, se concluyó que un balance entre PKS1 y PKS2 es necesario para un VLFR normal.

El modo de interacción entre PKS1 y PKS2 no ha sido bien entendido aún. Sin embargo, se encontró que PKS2 afecta específicamente la expresión de *PKS1* bajo las condiciones lumínicas donde se observaron fenotipos distintos al WT. El mutante *pkS2* cultivado bajo pulsos horarios de RL expresó más proteína PKS1 que el WT (Fig. 12D). Dentro de este contexto estudios realizados en el laboratorio del Dr. Fankhauser (Suiza) mostraron que PKS1 es capaz de interactuar *in vitro* con ella misma y con PKS2 (Lariguet *et al.*, 2003). El hecho de que los patrones de expresión de *PKS1* y *PKS2* se superponen en el hipocotilo sugiere que estas interacciones podrían ocurrir *in vivo* (Fig. 8). Es concebible que PKS1-PKS1 y PKS1-PKS2 tengan diferentes actividades. La acumulación de PKS1 en el acervo genético de *pkS2* está incrementada, indicando que PKS2 debería desestabilizar a la proteína PKS1 (Fig. 12D). Alternativamente, como los niveles de proteína PKS1 y su mensajero fueron inducidos por VLFR, los niveles proteicos incrementados de PKS1 en el mutante *pkS2* debería ser la resultante de un mayor VLFR en este mutante.

Bajo ciertas circunstancias, *phyA* y *phyB* desarrollan la misma relación genética que PKS1 y PKS2 en el VLFR de *phyA*. Ambos mutantes simples retrasan la floración bajo días largos a bajas temperaturas, pero el doble mutante *phyA phyB* no presenta fenotipo diferente al WT (Halliday *et al.*, 2003). Más aún se observa un fenotipo que florece más temprano tanto en plantas sobreexpresantes o mutantes de *PHYB* (Bagnall *et al.*, 1995). De modo similar, tanto la ausencia como la sobreexpresión de *PKS1* o *PKS2* llevaron a un VLFR aumentado (Fig. 11). Es interesante notar que las interacciones genéticas entre *phyA* y *phyB* son dependientes claramente del contexto. Por analogía, es posible que la interacción entre PKS1 y PKS2 podría ser diferente en otro contexto.

Las vías de señalización de fitocromo, VLFR, HIR y LFR están conectadas entre sí. En particular, las respuestas VLFR de *phyA* antagonizan algunas respuestas mediadas por *phyB* (Cerdán *et al.*, 1999). Varios loci que afectan el VLFR han sido posicionados cercanos al punto de conexión entre VLFR y LFR. Específicamente, CP3, VLF1, y VLF2 han sido propuestos como actores río abajo del punto de conexión entre VLFR y LFR; y DIM/DWARF1/EVE1 y SPA1 estarían río arriba de esta conexión en la vía de señalización del VLFR (Baumgardt *et al.*, 2002; Quinn *et al.*, 2002). Basados en el análisis

de la sobreexpresión de *PKS1* en R, se había propuesto anteriormente que *PKS1* podría ser un regulador negativo de la señalización de *phyB* (Fankhauser *et al.*, 1999). Considerando que un VLFR aumentado puede disminuir al LFR mediado por *phyB* y que la sobreexpresión de *PKS1* llevó a un mayor VLFR (Fig. 11), *PKS1* podría estar posicionado río arriba de la rama que conecta el VLFR con el LFR. Esto sugiere que en los datos reportados previamente (Fankhauser *et al.*, 1999), donde se dedujo a partir de los sobreexpresantes de *PKS1*, que *PKS1* estaría actuando negativamente sobre *phyB*, esto podría haberse debido a un efecto indirecto (vía incrementos del VLFR). A parte, la expresión ectópica de *PKS1* también podría llevar a efectos directos sobre la acción de *phyB*. Ambas posibilidades son consistentes con la interacción física observada entre *PKS1* con *phyA* y *phyB* (Fankhauser *et al.*, 1999). Sin embargo en el WT, los efectos de *PKS1* sobre *phyB* son presumiblemente limitados como resultado del patrón de expresión restringido de *PKS1* bajo estas condiciones (ver más abajo).

La regulación espacial de la expresión de *PKS1* correlaciona con algunas de las respuestas fisiológicas. El fenotipo del hipocotilo de *pks1* bajo pulsos horarios de RL es consistente con su sitio de expresión en el sitio de alargamiento del hipocotilo (Fig. 10). Más aún, la estructura de anillo para la expresión de *PKS1* en la base de los cotiledones debería ser importante para explicar el fenotipo con cotiledones más abiertos en el mutante *pks1* (Fig. 10). Sin embargo, no se observó un fenotipo obvio en el mutante *pks1* en sus raíces a pesar de su fuerte expresión inducida por luz en este órgano.

Por todo lo expuesto *PKS1* formaría parte de una retroalimentación positiva en la cual la señalización de *phyA* incrementa la abundancia de *PKS1* (Fig. 7 y 9). Un solo pulso de RL fue suficiente para aumentar fuertemente la expresión de *PKS1* (Fig. 7). Los niveles de mensajeros de *PKS1* son transientemente regulados por luz, de manera dependiente de *phyA*, en respuesta a RL continua o R (Fig. 7) (Tepperman *et al.*, 2001). Es típico de las respuestas adaptativas que se produzca una inducción aguda por luz seguida por un retorno despacioso al nivel basal (niveles de oscuridad). Tales patrones de respuesta son observados frecuentemente durante la quimiotaxis (Tyson *et al.*, 2003). Un cambio en el ambiente induce bastas respuestas seguidas por adaptación al nuevo ambiente. Este tipo de respuesta permite a los organismos responder a niveles cambiantes, en vez de cambios absolutos en los niveles de un cierto estímulo. A pesar de que los niveles totales de

mensajeros de *PKS1* son inducidos de forma transiente por R y RL, la expresión en el hipocotilo aparentemente es más estable bajo tratamientos prolongados de RL (Fig. 7 y 8). El *phyA*, a parte de fosforilar a *PKS1*, también modula su acumulación de modo post-transcripcional, ya sea a nivel traduccional o a través de degradación proteica. Esto último se revela en los incrementos transientes observados en los niveles totales de mensajeros de *PKS1* y el incremento sostenido en los niveles de proteína *PKS1* bajo pulsos de RL o RL continua (Fig. 7 y 9). Más aún, *PKS1* está negativamente regulado por *PKS2*. Por lo tanto, señales que se desprenden de *phyA* controlan a *PKS1* a distintos niveles, incluyendo vía *PKS2*; a su vez el balance entre *PKS1* y *PKS2* controla la señalización de *phyA*.

La ejecución de un plan óptimo para el desarrollo fotosintético es crítico para el establecimiento de las plántulas. Aquí presentamos datos de una compleja red en la cual *PKS1* y *PKS2* se regulan negativamente en forma mutua. Mas aún, *PKS1* y *PKS2* regulan positivamente el VLFR; a su vez, ambas proteínas (particularmente *PKS1*) son reguladas positivamente por la señalización de *phyA*. Esto puede ser descripto como una combinación de circuitos de *feedback* o retroalimentación positivos y negativos (Fig. 12A). En la vía de transducción del factor de crecimiento epidérmico, se crea un circuito de retroalimentación positiva por la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) que activa la fosfolipasa A2, que a través de la producción de ácido araquidónico activa la proteína quinasa C, un regulador positivo de la señalización del factor de crecimiento epidérmico, ubicada río arriba de MAPK. Esto resulta en una activación sostenida en respuesta a estímulos de corta duración (Bhalla y Iyengar, 1999). Sin embargo, en fibroblastos de ratones, es la combinación de un circuito de retroalimentación positivo y de otro negativo, formados por la transcripción activada por MAPK, de la fosfatasa MAPK, que permite al sistema montar varios tipos de patrones de respuesta (Bhalla *et al.*, 2002). Por analogía, los circuitos regulatorios de retroalimentación de *PKS1*-*PKS2*, parecen combinar una regulación flexible de VLFR en el contexto del desarrollo (Luccioni *et al.*, 2002), confiriendo mayor robustez contra las fluctuaciones de las señales lumínicas o variables no relacionadas en el ambiente.

3.2 MODULACION DE LA SENSIBILIDAD A LA LUZ POR COP1

Esta sección del Capítulo describe una inesperada correlación positiva entre los niveles de COP1 y las respuestas de *Arabidopsis* a la R. El papel de COP1 como represor de la fotomorfogénesis en oscuridad está sólidamente establecido sobre las bases de varias líneas de evidencia. Los mutantes *cop1* muestran fotomorfogénesis en oscuridad (Deng *et al.*, 1991) y bajo estas condiciones su transcrito es similar al de plántulas WT crecidas bajo luz (Ma *et al.*, 2002). Los mecanismos moleculares de su función como represor involucran la acción de COP1 como ligasa del tipo E3, etiquetando factores de transcripción involucrados en las respuestas fotomorfogénicas, para su degradación en el proteasoma 26-S (Osterlund *et al.*, 2000; Holm *et al.*, 2002; Saijo *et al.*, 2003). Las plántulas transgénicas *COP1 OX* y *GUS-COP1 OX* mostraron fotomorfogénesis reducida bajo luz azul o RL (McNellis *et al.*, 1994b; Osterlund y Deng, 1998; Fig. 15A y B). Dicho fenotipo podría resultar de una habilidad limitada de estos genotipos para traslocar la mayor cantidad de COP1 de su lugar de acción en el núcleo y/o la habilidad de COP1 para regular negativamente la señalización de la luz. Los descubrimientos recientes de la existencia de interacción entre COP1 y SPA1 (Saijo *et al.*, 2003), y de la caracterización del nuevo alelo *cop1^{eid6}*, el cual porta una transición aminoacídica en un residuo histidina altamente conservado en el dominio *RING* (Dieterle *et al.*, 2003), han revelado que COP1 es verdaderamente un regulador negativo de la señalización de phyA. Esta función de COP1 parece ser diferente de su acción como represor de la fotomorfogénesis en oscuridad, ya que *cop1^{eid6}* muestra mayor sensibilidad a la luz pero no presentó fotomorfogénesis en oscuridad, mientras que el alelo *cop1-4*, que perdió por completo el dominio de repeticiones WD-40 de la proteína, muestra fotomorfogénesis en oscuridad pero con un rango de sensibilidad a la luz aparentemente normal (Dieterle *et al.*, 2003).

La correlación positiva entre los niveles de COP1 y la respuesta a la R provienen del análisis de mutantes débiles y líneas sobreexpresantes de COP1. Los mutantes *cop1-4* y *cop1-6* mostraron cotiledones completamente abiertos en oscuridad. Inesperadamente, la R redujo la apertura de los mismos en estos mutantes (Fig. 13). Cao *et al.* (2000) también observaron una reducción en la expresión de genes que codifican para la maquinaria fotosintética en respuesta a la R en *cop1-4* y *cop1-6*. El efecto reportado aquí no es el

resultado inespecífico de “una señalización exagerada a la luz” en los mutantes *cop1* expuestos a la luz, ya que la RL, que es significativamente más efectiva que la R para promover la apertura de los cotiledones en el WT, tuvo un efecto negativo más débil que la R. Más aún, los dobles mutantes *cop1-4 phyB* y *cop1-6 phyB* no mostraron fotomorfogénesis inversa bajo R o aún bajo RL (Fig. 14), a pesar del hecho de que *phyB* no es requerido para inducir la fotomorfogénesis bajo RL en el WT. Además, para producir fotomorfogénesis inversa los mutantes *cop1* requirieron una tasa de flujo de R mínima similar a la necesaria para inducir fotomorfogénesis normal en el WT (Fig. 13D). Inclusive, la apertura de los cotiledones no fue reducida por altas irradiancias de R o B, ni aún en plántulas transgénicas sobreexpresantes de *PHYB*, que poseen mayor sensibilidad a los tratamientos lumínicos antes mencionados (Fig. 13D y datos no mostrados).

De acuerdo con resultados previos (McNellis *et al.*, 1994b; Osterlund y Deng, 1998), *COPI OX* y *GUS-COPI OX* mostraron un fenotipo similar al WT en oscuridad, y presentaron una reducción de su fotomorfogénesis bajo RL o A. Sin embargo, ocurrió lo opuesto bajo R. En este caso, las líneas transgénicas que sobreexpresan *COPI*, presentaron mayor inhibición del alargamiento del hipocotilo, apertura de los cotiledones, síntesis de clorofila y expresión del gen *CABI* (Fig. 15,16 y 17). Una vez más, este efecto fue totalmente dependiente de la presencia de *phyB* como revelaron los efectos epistáticos de la mutación de *phyB* (Fig. 18). Las líneas transgénicas sobreexpresantes de *COPI* mostraron niveles similares de *COPI* bajo A, R o RL, indicando que el efecto diferencial de estas líneas bajo R comparado a otras longitudes de onda, no pudo deberse a una co-supresión dependiente de calidad lumínica (Fig. 15C). Los efectos consistentes de la sobreexpresión de *COPI* y de su mutación, argumentan en contra de un papel predominante de la expresión ectópica en la generación de los fenotipos presentes en las líneas sobreexpresantes usadas en estos experimentos.

Existen dos observaciones que apoyan la idea de una correlación positiva entre las respuestas a la R y las moléculas de *COPI* ubicadas en el núcleo más que aquellas presentes en el citoplasma. Primero, los efectos son relativamente rápidos (menos de 6 h) comparados con el tiempo requerido para producir una migración detectable de *COPI* hacia el citosol (por lo menos 24h de luz, von Arnim *et al.*, 1997). Segundo, el alelo *cop1-6* está afectado específicamente en el sitio de localización nuclear (*NLS*), por lo tanto la proteína

COP1-6 sería incapaz de localizar en el núcleo. Sin embargo cuando las plántulas de *cop1-6* son cultivadas en temperaturas más permisivas (30 grados), localiza normalmente en el núcleo y reprime normalmente la fotomorfogénesis en oscuridad (Ma *et al.*, 2002). Por lo tanto la proteína, aparentemente funcional, COP1-6, no fue capaz de promover la fotomorfogénesis bajo R cuando se ubica en el citoplasma, ya que los alelos mutados *cop1-6* y *cop1-4* mostraron una respuesta inversa para la apertura de los cotiledones cuantitativamente similar bajo altos flujos de R.

El efecto positivo de mayores niveles de COP1 sobre la respuesta a la R podría reflejar un papel fisiológico de COP1 como promotor de la fotomorfogénesis bajo R, a parte de su conocida función como represor en oscuridad, RL y luz azul. Los efectos contrarios de COP1 sobre las respuestas mediadas por phyA y phyB sugieren que COP1 podría regular la corriente de señalización relativa de cada fotorreceptor y por lo tanto determinar la señal lumínica más efectiva.

Para explicar la regulación positiva de la fotomorfogénesis por COP1, se pueden proponer al menos dos modelos alternativos. Primero, dado que COP1 está involucrado en la degradación de reguladores positivos de la fotomorfogénesis, tales como HY5 y LAF1 (Osterlund *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2003), un modelo posible podría basarse en una degradación, mediada por COP1, de reguladores negativos de la señalización de phyB. De acuerdo a este modelo, cuando los mutantes *cop1* son cultivados en oscuridad, la apertura de los cotiledones es máxima; pero bajo R, phyB induciría un represor de su propia señalización (existen varios ejemplos de tales circuitos regulatorios para otros sistemas de señalización, Casal *et al.*, 2004), el cual en la ausencia de COP1 funcional regularía negativamente la respuesta fotomorfogénica (Fig. 30, Modelo 1). El segundo modelo está basado en observaciones recientes hechas en células de mamíferos. Se observó que dos factores que contienen *F box/WD-40*, que actúan como E3 ligasas, genéticamente vinculados a la degradación dependiente de ubiquitina, fueron requeridas inesperadamente para la activación genética producida por proteínas que se unen al ADN (Perissi *et al.*, 2004). Esta función involucró el reclutamiento de complejos ubiquitina/proteasoma 19S pero no necesariamente su acción vía su función proteolítica (Perissi *et al.*, 2004). Siguiendo la analogía, COP1, que también actúa como E3 ligasa, podría ser necesaria para activar la unión al ADN de factores que promueven la transcripción mediada por phyB.

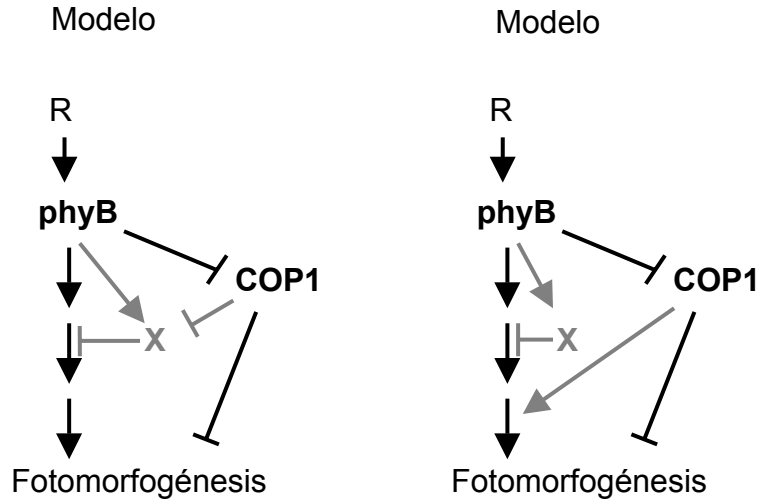


Figura 30. Modelos que explican la correlación positiva entre la actividad de COP1 y las respuestas al R.

La correlación positiva existente entre los niveles de COP1 y las respuestas a la luz roja no es fácil de explicar sobre las bases de una mayor estabilidad o actividad de phyB producida por COP1. De hecho, la respuesta negativa sobre la apertura de los cotiledones presente en los mutantes *cop1* muestra el mismo rango de sensibilidad que la respuesta positiva presente en el WT bajo R (Fig. 13D), y dicha respuesta fue eliminada, en vez de aumentada, en el acervo genético del mutante *phyB* (Fig. 14, datos de dobles mutantes *phyB cop1*).

Como se analizará a continuación, probablemente las proteínas bifuncionales (promotoras / represoras) sean más frecuentes en plantas que lo previamente predicho, debido a que una de las funciones queda enmascarada por la otra, haciendo difícil hallarlas hasta que se encuentran condiciones específicas donde son identificadas.

3.3. CONVERGENCIA FUNCIONAL DE COP1, PKS1 Y PKS2

De las secciones 3.1 y 3.2 emerge una propiedad común entre PKS1, PKS2 y COP1. Estas proteínas mostraron un comportamiento bifuncional en la regulación de las respuestas a la luz. PKS1 y PKS2 promovieron las VLFR, al mismo tiempo que reprimieron su acción entre si. COP1 bajo luz, reprimió las respuestas HIR y promovió las LFR. La existencia de moléculas bifuncionales (activador/represor) es común en la naturaleza. Por ejemplo, en *Drosophila* existe un factor de transcripción bifuncional (NC2) capaz de activar o reprimir la transcripción (Willy *et al.*, 2000). La proteína bifuncional PFK/FBPasa-2, es capaz tanto de sintetizar como degradar la fructosa-2,6-bisfosfato, un factor clave en el direccionamiento del flujo de carbohidratos en muchos eucariotas. La actividad kinasa o fosfatasa de estas enzima bifuncional varía según se encuentre fosforilado o no un residuo serina específico (Okar *et al.*, 2001). El factor TGF- β (del inglés *Transforming growth factor- β*) es una molécula (péptido) bifuncional, capaz de promover o reprimir la proliferación *in vitro* de células de músculo liso vascular, según la densidad de las mismas (Goodman y Majack, 1989). En el caso específico de la regulación por luz en plantas, *det1* también promueve la expresión de genes inducidos por luz en oscuridad e inhibe su expresión en la luz (Maxwell *et al.*, 2003). La gran cantidad de ejemplos que existen en la naturaleza de moléculas bifuncionales sugiere que poseer más de una función en la misma molécula sería potencialmente ventajoso. Cabe preguntarse ¿por qué motivo a lo largo de la evolución se seleccionaron este tipo de moléculas? Desde el punto de vista de la economía celular, se mantendrían dos funciones celulares con menor número de genes, mensajeros y proteínas. Quizá esta explicación sea demasiado simplista. Sin embargo desde el punto de vista funcional este tipo de moléculas aportarían otra ventaja. La presencia de dos funciones en la misma molécula podría ser una manera de coordinar más rápida y reversiblemente una respuesta. Por ej. en el caso de proteínas bifuncionales que poseen funciones opuestas (represor/activador) sería suficiente un cambio en el factor ambiental o interno que modifica alguna de sus actividades para que pase actuar la otra función sin necesidad de síntesis de *novo*, permitiendo una rápida respuesta a la nueva condición ambiental.

3.4. ESTRATEGIAS PARA APLACAR LOS EFECTOS NEGATIVOS DE LA DENSIDAD SOBRE EL RENDIMIENTO DE CULTIVOS

De las variantes genéticas evaluadas en la sección 2.3, la sobreexpresión de *PHYB* fue la más efectiva para producir insensibilidad a la densidad de cultivo, tanto a nivel de plántula como de planta adulta. En el estadio de plántula esta línea transgénica mostró el mismo largo del hipocotilo independientemente de la densidad (Fig. 21B). Las plantas adultas *PHYB OX* no respondieron a la densidad o bien lo hicieron con menor intensidad que el WT, para la regulación del largo del pecíolo (Fig. 22A), el largo de la lámina (Fig. 22B) y ángulo de inserción foliar (Fig. 22D). En estadios tempranos del cultivo se pudo observar que las plantas *PHYB OX* presentaron menor cobertura del suelo respecto del WT (Fig. 23). Este efecto negativo de la presente en plantas con menor capacidad de percibir a las vecinas fue precedido previamente (Ballaré, 1999; Ballaré y Casal, 2000). Cuando fueron cultivadas a bajas densidades (Fig. 22), las plantas *PHYB OX* presentaron menor largo del pecíolo (Fig. 22A), de la lámina (Fig. 22B) y ancho de la roseta respecto del WT. Esto demostraría que bajo radiación solar plena y en condiciones donde la R/RL es la solar (1.15 aproximadamente), tanto las plántulas (Fig. 21B) como las plantas adultas exageran las respuestas a la luz, probablemente debido a su mayor sensibilidad a la R ambiental (Wagner *et al.*, 1991).

Plántulas sobreexpresantes de *COPI OX*, que promovieron las respuestas a R y reprimieron las inducidas por RL y luz azul (sección 2.2), nunca fueron evaluadas bajo radiación natural donde todas estas longitudes de onda se encuentran en cantidades equitativas y por lo tanto es difícil predecir *a priori* la respuesta resultante. El análisis del alargamiento del hipocotilo en función de la densidad de plántulas puso de manifiesto que la sobreexpresión de *COPI* provocó insensibilidad a la densidad hasta 4 plantas cm^{-2} pero a densidades mayores su pendiente fue similar al WT (Fig. 21B). Este tipo de respuesta con dos pendientes contrastantes a bajas y altas densidades podría ser interpretado del siguiente modo. Cuando la relación R/RL del ambiente es alta, se pone de manifiesto el efecto positivo de la sobreexpresión de *COPI* sobre la señalización de phyB. Mientras que en densidades mayores, donde la componente de RL aumenta y la de R disminuye, el efecto negativo de la sobreexpresión de *COPI* sobre la vía de señalización HIR, se ve

incrementada. Esto conduciría a una menor inhibición del alargamiento del hipocotilo, lo que explicaría el cambio de pendiente en respuesta a la densidad. Por otra parte los niveles de PHYA en plantas sometidas a altas R/RL son menores que en bajas R/RL. Esto permitiría que el efecto positivo de COP1 sobre la señalización de phyB pueda ponerse de manifiesto más fácilmente. Las funciones contrastantes de COP1, como promotor o represor de la des-etiolación, permitiría una rápida desetiología en ausencia de plantas vecinas (alta R/RL) y pondría freno a la vía HIR de phyA, permitiendo de este modo un cambio de jerarquías de phyA hacia phyB bajo condiciones de sombreado. De este modo se daría lugar a que los bajos niveles de Pfr de phyB desencadenen posteriormente el síndrome de escape al sombreado bajo condiciones de baja R/RL.

Fankhauser *et al.*, (1999), postuló a PKS1 como regulador negativo en la señalización de phyB. En los ensayos descritos en la sección 2.3 tanto en los estadios de plántulas, como de adulto, los mutantes *pks1* y *pks2* presentaron respuestas morfológicas similares al WT, inclusive bajo las distintas densidades ensayadas. Por lo mencionado en 2.1, tanto PKS1 como PKS2 jugarían un papel importante regulando el VLFR mediado por phyA, pero no estarían implicados en las LFR o HIR mediadas por phyB y phyA, respectivamente. En los ensayos descritos aquí, las respuestas VLFR estaban completamente saturadas. Por lo tanto es difícil evaluar los resultados de la Sección 2.2 en estas condiciones. Para ello habría que haber estudiado las respuestas de estas plantas en los primeros estadios de la des-etilación (antes o durante la emergencia) donde reciben los primeros fotones o bien evaluando respuestas tales como la germinación inducida tras una labranza del suelo (donde las semillas perciben unos pocos fotones de luz por un breve instante y mayormente vuelven a la oscuridad). De todos modos como el objetivo de los ensayos antes descritos, fue evaluar componentes que modulen la sensibilidad a la luz asociada a la densidad del cultivo, no se abordaron experimentos para evaluar respuestas VLFR bajo radiación natural.

Por lo antes expuesto, la sobreexpresión de *PHYB* pareciera ser la estrategia más viable para aplacar respuestas potencialmente negativas sobre el rendimiento, asociadas a altas densidades, aunque se necesita validar esta estrategia a campo con plantas de interés comercial. En tal sentido en la sección 2.4 de esta tesis se evaluaron los efectos de la sobreexpresión de *PHYB* en papas cultivadas a campo.

Hasta el momento existen varios trabajos previos donde muestran que el rendimiento actual de un cultivo puede ser llevado cerca de su rendimiento potencial por expresión de transgenes que incrementan las defensas de las plantas. Sin embargo casi no existen trabajos donde muestren incrementos en el rendimiento a campo en plantas transgénicas que alteren su metabolismo (Taylor, 2001). Aquí, se demuestra que *PHYB*, es decir un gen que interrelaciona el desarrollo con el ambiente, puede incrementar el rendimiento potencial de tubérculos de papa en cultivos sembrados en alta densidad.

El análisis del ambiente lumínico de los cultivos transgénicos que sobreexpresan el gen *PHYB* de *Arabidopsis* reveló un nivel de complejidad que no fue vislumbrado a nivel de planta. El aumento en los niveles de phyB no solo modificó las respuestas de las plantas al ambiente lumínico, sino también modificó el ambiente lumínico en si mismo. Ambas líneas transgénicas mostraron reducciones en la relación R/RL de la radiación reflejada horizontalmente o transmitida por plantas vecinas de la misma fila de siembra (Fig. 26), incrementaron la atenuación vertical del RFA (Fig. 27C) y retrasaron la cobertura del suelo entre filas, así como también la intercepción de RFA (Fig. 27A y B). Para lograr un máximo rendimiento en tubérculos en los cultivos transgénicos, fue necesario aplicar densidades mayores que las densidades comerciales (Fig. 25). Esto es en cierto punto sorprendente ya que en altas densidades, la relación R/RL debería reducir la proporción de phyB en la forma Pfr, y por lo tanto, la diferencia absoluta entre el WT y las transgénicas sobreexpresantes de *PHYB* de *Arabidopsis*. Sin embargo, la dependencia de la densidad posiblemente refleje el reducido impacto del retraso en la intercepción de luz en las transgénicas cuando se redujo el espacio entre filas (Fig. 27B). Ballaré *et al*, (1995, 1997) habían predicho que la sobreexpresión de fitocromos podía ser desventajosa respecto de la capacidad de las plantas para “cosechar luz del ambiente”. Los resultados presentados aquí, indican que bajo ciertas condiciones los efectos negativos de la sobreexpresión pueden ser sorteados por otros efectos positivos de incrementar los niveles de fitocromo. Inclusive, teóricamente se podría alcanzar un balance aún más positivo si se modificaran genes que estén actuando río abajo en la cadena de transducción de phyB. Estos genes podrían controlar un subgrupo de las respuestas mediadas por phyB y eventualmente inducir respuestas fisiológicas y morfológicas con impacto positivo sobre el rendimiento mientras que evitarían aquellas respuestas con impacto negativo sobre el mismo. El reciente

descubrimiento del gen *PFTI* provee soporte a la existencia de genes que actúan específicamente río abajo de phyB y que controlan sólo parte de las respuestas inducidas por este fotorreceptor (Cerdán y Chory, 2003).

Uno de los caminos principales para lograr mayores rendimientos a través de transgénesis sería la manipulación de la fotosíntesis del canopeo (Horton, 2000). Sin embargo, existe poca información confiable relacionando modificaciones de genes específicos de la fotosíntesis con su impacto en el comportamiento del cultivo transgénico a escala agrícola (Dunwell, 2000). La fotosíntesis máxima normalmente decae en las hojas más viejas dentro del canopeo debido a factores ontogénicos y ambientales (Constable y Rawson, 1980). En este estudio observamos que altos niveles de phyB redujeron este decaimiento escalonado (Fig. 28A). Las mayores tasas de fotosíntesis máxima por unidad de área foliar observadas en las transgénicas sobreexpresantes de *PHYB*, pudieron deberse principalmente a incrementos en la conductancia estomática (Fig. 29B). Este aumento repercutió también en mayores tasas de transpiración (Fig. 29C) que acompañaron las mayores tasas fotosintéticas de las transgénicas. Las diferencias en grosor de la hoja, clorofila por unidad de área, o proteína por unidad de área fue relativamente pequeña (datos no mostrados) y al menos contribuyó débilmente a las diferencias observadas para la tasa fotosintética entre el WT y las líneas transgénicas. Aparentemente altos niveles de phyB reducirían la resistencia del poro estomático hacia el transporte de CO₂ ya que no encontramos diferencias significativas en el número de estomas por área. Un estudio reciente pudo detectar una densidad estomática 28% mayor para la línea Dara-5 comparado con el WT (Schittenhelm *et al.*, 2004). Aún estas diferencias son sustancialmente menores a las diferencias en conductancia descritas aquí y por lo tanto no pueden explicar la totalidad de las diferencias observadas en este parámetro. También se habían encontrado efectos del fitocromo sobre la conductancia foliar en experimentos fisiológicos realizados en *Phaseolus vulgaris* (Holmes *et al.*, 1986). Por lo tanto es probable que la sobreexpresión de *PHYB* pueda provocar incrementos en la conductancia estomática tanto por cambios en el grado de apertura como en la densidad estomática.

Los resultados no concuerdan con la idea tradicional que sostiene que la reducción de las respuestas fotomorfogénicas podrían incrementar el rendimiento a nivel de cultivo cambiando la partición de fotoasimilados desde el tallo hacia órganos cosechables. La línea

con expresión moderada de *PHYB*, Dara-5, mostró poco efecto sobre el crecimiento del tallo principal (alcanzó los niveles del WT en el campo hacia el final del ciclo, datos no mostrados) y efectos mayores en el rendimiento (Fig. 25). Por otra parte el número de ramas fue mayor en las transgénicas, compensando o quizá superando de este modo la cantidad de asimilados invertidos en tallos en las transgénicas respecto del WT. El efecto primario podría radicar sobre la formación de tubérculos y la demanda creciente de fotoasimilados debido al mayor número de tubérculos de las transgénicas. El control de la fotosíntesis máxima por la disponibilidad de destinos ha sido bien caracterizado (Paul y Foyer, 2001) y, en muchos casos, ha sido relacionado con la conductancia estomática (Setter y Brun, 1980). A favor de esta interpretación, la cantidad de tubérculos aumentó más que el rendimiento en peso de tubérculos, con la consecuente reducción en el peso promedio de cada tubérculo. Por lo tanto, al menos parte de los incrementos en la fotosíntesis máxima serían necesarios para satisfacer estos incrementos en el número de destinos.

Actualmente, una de las aproximaciones frecuentes abordadas para mejorar el rendimiento del cultivo es incrementando el número de plantas por unidad de área de suelo. Sin embargo, a pesar que en bajas densidades, incrementos en el número de plantas por unidad de área resulta en aumentos proporcionales en el rendimiento del cultivo, por arriba de ciertas densidades el aumento marginal del rendimiento con incrementos en la densidad decrece, aproximándose a cero, y hasta podría eventualmente transformarse en negativo (Sangoi *et al.*, 2002; Tetio-Kagho, 1988). Los resultados presentados aquí sugieren que aumentar los niveles de *phyB* podrían ser usados en programas de mejoramiento para llevar la densidad óptima del cultivo a niveles mayores. La extensión de esta estrategia a otras especies parece ser muy promisoría. De todos modos, antes de predecir el comportamiento final de los cultivos sobreexpresantes de *PHYB* en producciones comerciales es conveniente discutir algunos puntos pendientes a ser evaluados. Estas consideraciones comprenden el estudio de la interacción de la sobreexpresión de *PHYB* con ciertos factores bióticos y abióticos de importancia en el comportamiento final del cultivo. Entre los factores bióticos es muy interesante analizar la interacción del cultivo sobreexpresante de *PHYB* con patógenos y malezas. Entre los factores abióticos que pueden interactuar diferencialmente con el cultivo transgénico, respecto del WT, la utilización de agua y el

volcado por el viento son puntos pendientes a ser estudiados. Particularmente en los ensayos realizados a campo para esta tesis se efectuó un control exhaustivo de malezas e insectos, así como también se mantuvo el cultivo con buena disponibilidad hídrica durante todo el ciclo del cultivo. De todos modos, el hecho de haber realizado una detallada caracterización fisiológica de las plantas y del ambiente físico del cultivo, permite especular acerca de lo que sucedería con estas interacciones bióticas y abióticas a escala de campo. Respecto de la interacción con patógenos, un estudio realizado en plantas mutantes *phyB* de *Arabidopsis* reveló que este fotorreceptor promueve mecanismos de defensa, tales como la inducción de la síntesis de PR1 (*pathogenesis-related protein 1*). Las plantas mutantes presentaron mayor infección por *Pseudomonas syringae*, lo que pone de manifiesto la importancia de *phyB* en la protección contra patógenos (Genoud *et al.*, 2002). Por lo tanto es predecible que las plantas sobreexpresantes de *PHYB* puedan presentar mayor resistencia a la infección por ciertos patógenos. Acerca del establecimiento de malezas en cultivos de plantas transgénicas sobreexpresantes de *PHYB* se puede predecir que las mismas serían más susceptibles a la colonización por malezas al inicio del ciclo del cultivo. Luego de la labranza, es común que ocurra una considerable germinación de malezas (Scopel *et al.*, 1991) que acompañan en edad al cultivo. La estrategia de utilizar plantas transgénicas “ciegas o al menos miopes” para percibir la presencia de vecinas sufrirían la desventaja de poseer una capacidad reducida para explorar y cosechar luz (Ballaré, 1999; Ballaré *et al.*, 1997), un retraso en la cobertura del suelo (Ballaré *et al.*, 1995 y secciones 2.3 y 2.4) y por ende una menor interceptación lumínica. Al mismo tiempo las malezas si podrían percibir a las vecinas y anticiparse a la futura competencia por luz, promoviendo el crecimiento de sus tallos y sombreando a las transgénicas. Sin embargo si se ejerce un debido control de las malezas al inicio del cultivo (por ej. aplicando herbicida un tiempo después de las labranzas que promovieron la germinación de malezas) y recién en ese momento se siembra o mejor aún si se transplanta el cultivo en alta densidad debería aplacarse el establecimiento de malezas. Una vez desarrollado el canopeo transgénico, debido a su morfología compacta y sus características ópticas que disminuyen el PAR y R/RL en el estrato inferior del cultivo, presentaría mayor habilidad que el cultivo salvaje para inhibir la aparición de malezas. Más aún, avanzado el ciclo, el cultivo WT presenta mayor senescencia de las hojas basales respecto de las transgénicas, lo que favorecería el

establecimiento de nuevas malezas, debido a la mayor cantidad de RFA y R/RL que alcanzan los estratos inferiores del canopy.

El incremento de la densidad de cultivo implica mayor demanda de recursos (agua, nutrientes, etc.). Los cultivos transgénicos sobreexpresantes de *PHYB* necesitarán mayor cantidad de agua por superficie debido a su mayor tasa transpiratoria por unidad de IAF.

Dado que durante todo o casi todo el ciclo, los cultivos sobreexpresantes de *PHYB* presentaron menor tamaño, estas plantas poseerían menor probabilidad de volcado por viento.

El balance de los efectos positivos y negativos que produce la sobreexpresión de *PHYB* muestra que sería una estrategia conveniente para obtener mejores rendimientos a altas densidades de cultivo.

CAPITULO 4: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El objetivo de esta tesis fue estudiar mecanismos mediante los cuales las plantas modulan la sensibilidad a la luz y de que modo su alteración es útil para aplacar el impacto negativo de señales lumínicas asociadas a altas densidades de cultivo sobre el rendimiento.

En primer lugar se estudiaron los papeles que cumplen ciertos actores de la señalización lumínica (PKS1, PKS2 y COP1) bajo condiciones controladas en la planta modelo, *Arabidopsis thaliana*. Al inicio de esta tesis la función de PKS2 y PKS1 era total y parcialmente desconocida. En el Capítulo 2 se develaron las funciones de estos dos elementos y funciones de COP1 no conocidas previamente.

Los experimentos fisiológicos realizados con diversos genotipos alterados en los niveles de *PKS1* y *PKS2* sometidos a tratamientos lumínicos que estimulan específicamente los modos de acción de phyA y phyB, permitieron elaborar un modelo genético en el cual *PKS1* y *PKS2* actúan como reguladores positivos de una rama discreta de la señalización del phyA (VLFR), mientras que se inhiben mutuamente (sección 2.1). Por lo tanto un balance entre *PKS1* y *PKS2* sería necesario para un VLFR normal. Los experimentos de expresión revelaron que ambas proteínas (particularmente PKS1) son reguladas positivamente por la señalización de phyA. Experimentos de interacción (Lariguet *et al.*, 2003) y localización tisular de PKS1 y PKS2 (sección 2.1), mostraron que existe interacción *in vitro* de PKS1 con ella misma y con PKS2 y que la expresión de *PKS1* y *PKS2* se superponen en el hipocotilo sugiriendo que estas interacciones podrían ocurrir *in vivo*. Es decir que PKS1 y PKS2 formarían parte de una compleja red en la cual PKS1 y PKS2 se regulan negativamente entre sí. Ambos regulan positivamente el VLFR de phyA y a su vez el VLFR regula positivamente la aparición de PKS1 bajo luz. Esta red puede ser descrita como una combinación de circuitos de retroalimentación positivos y negativos.

El estudio de la función de COP1 como modulador de la sensibilidad a la luz, reveló una nueva función para esta proteína, conocida por ser represor de la fotomorfogénesis en oscuridad. En esta tesis se encontró una correlación positiva entre los niveles de COP1 y la promoción de la des-etiolación inducida por R. Esto podría reflejar un papel fisiológico de COP1 como promotor de la fotomorfogénesis bajo R (Sección 2.2), a parte de su conocida función como represor en oscuridad, RL y luz azul (Deng *et al.*, 1991; McNellis *et al.*,

1994). Los efectos contrarios de COP1 sobre las respuestas mediadas por phyA y phyB sugieren que COP1 regularía negativamente la corriente de señalización HIR cuando la planta emergió bajo otras plantas y haría lo contrario bajo suelo desnudo (Sección 2.2).

Si bien la información obtenida de los experimentos bajo condiciones controladas constituye la base para la comprensión mecanística de cómo ocurre la fotomorfogénesis, es difícil predecir la función y jerarquía de los componentes de la señalización lumínica bajo radiación natural y de qué modo modulan las respuestas a la densidad de cultivo.

El análisis de las respuestas de las plántulas y plantas adultas, con niveles alterados de *COP1*, *PKS1*, *PKS2* y *PHYB* cultivados a distintas densidades bajo radiación natural, revelaron que de las variantes genéticas evaluadas, la sobreexpresión de *PHYB* fue la más efectiva para aplacar las respuestas a la densidad de cultivo (sección 2.3).

En la sección 2.4 se muestra que la expresión ectópica de *PHYB* de *Arabidopsis* en papa, es decir de un gen involucrado en la detección de la R/RL asociada a la densidad del cultivo, puede incrementar el rendimiento en tubérculos de cultivos transgénicos de papa realizados a campo. La sobreexpresión de *PHYB*, no solo alteró las respuestas asociadas a la presencia de otras plantas sino que también modificó al ambiente lumínico en sí mismo. Bajo las condiciones experimentales utilizadas, la sobreexpresión de *PHYB* fue una estrategia ventajosa para incrementar el rendimiento en altas densidades (Sección 2.4) demostrando ser una buena estrategia a implementar en otros cultivos para lograr tolerancia a altas densidades, incrementando el rendimiento por área. La sobreexpresión de *PHYB* incrementó el número de tubérculos y la fotosíntesis máxima en todos los estratos del canopeo, principalmente debido a su mayor conductancia estomática.

La sobreexpresión constitutiva de *PHYB* presentó aspectos positivos y negativos respecto de su comportamiento a campo, aunque los aspectos positivos pesaron más que los negativos en el establecimiento del rendimiento a altas densidades.

La expresión diferencial de *PHYB* sólo en algunos órganos de la planta o bien en ciertos momentos del desarrollo podrían ser una manera útil de hacer prevalecer los efectos positivos de la sobreexpresión. La identificación de elementos de la señalización de phyB pueden ser un atajo para lograr seleccionar sólo los efectos positivos de esta vía y modificar su expresión en plantas cultivadas. En este sentido tanto *COP1*, *PKS1* o *PKS2* no resultaron ser buenos candidatos para cumplir esta función. Actualmente fueron

encontrados otros nuevos elementos específicos de la señalización de phyB cuya función a campo puede ser evaluada a fin de tamizar los efectos positivos de esta vía de transducción sobre el rendimiento.

Desde el punto de vista ambiental, y al margen de toda discusión ética acerca de la manipulación genética en organismos vivos, estas transgénicas permitirían la obtención de mayores rendimientos por unidad de superficie. La creciente demanda de alimentos a nivel mundial prevé un incremento en la demanda de cereales de aproximadamente un 50% en 30 años (Cassman, 1999) y valores similares para otros cultivos. La satisfacción de tal demanda provendrá de incrementos en la producción por área o en el área de cultivo. El corrimiento de las fronteras agrícolas en el tercer mundo es un importante problema actual. Las mayores pérdidas en biodiversidad en ecosistemas tropicales y templados son debido a cambios en el uso de la tierra, puntualmente la transformación de ecosistemas naturales en agropecuarios (Tilman *et al.*, 2002). La producción de plantas transgénicas que produzcan más en menor espacio de tierra puede ser una estrategia ventajosa para compensar parte de la mayor demanda alimentaria, sin la necesidad imperiosa de perder ecosistemas naturales.

CAPITULO 5: BIBLIOGRAFIA

- Ahmad M, Cashmore AR** (1993) *HY4* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**:162-166.
- Ahmad M, Cashmore AR** (1996) The *pef* mutants of *Arabidopsis thaliana* define lesions early in the phytochrome signaling pathway. *Plant Journal* **10**:1103-1110.
- Ahmad M, Jarrillo JA, Cashmore AR** (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, Jarrillo JA, Smirnova O, Cashmore AA** (1998b) The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A In Vitro. *Molecular Cell* **1**:939-948.
- Ang L-H, Deng X-W** (1994) Regulatory hierarchy of photomorphogenic loci: allele-specific and light-dependent interaction between the *HY5* and *COPI* loci. *Plant Cell* **6**:613-628.
- Armstrong GA, Runge S, Frick G, Sperling U, Apel K** (1995) Identification of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A and B: a branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **108**:1505-1517.
- Aukerman MJ, Hirschfeld M, Wester L, Weaver M, Clack T, Amasino RM, Sharrock RA** (1997) A deletion in the *PHYD* gene of the *Arabidopsis* Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/far-red light sensing. *Plant Cell* **9**:1317-1326.
- Bagnall DJ, King RW, Whitelam GC, Boylan MT, Wagner D, Quail PH** (1995) Flowering responses to altered expression of phytochrome in mutants and transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* **108**:1495-1503.
- Ballaré CL, Sánchez RA, Scopel AL, Casal JJ, Ghera CM** (1987) Early detection of neighbour plants by phytochrome perception of spectral changes in reflected sunlight. *Plant, Cell and Environment* **10**:551-557.

- Ballaré CL, Scopel AL, Sánchez RA** (1989) Photomodulation of axis extension in sparse canopies. *Plant Physiology* **89**:1324-1330.
- Ballaré CL, Scopel AL, Sánchez RA** (1990) Far-red radiation reflected from adjacent leaves: an early signal of competition in plant canopies. *Science* **247**:329-332.
- Ballaré CL, Scopel AL, Sánchez RA** (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 CL, Scopel AL, Radosevich SR, Kendrick RE** (1992) Phytochrome-mediated phototropism in de-etiolated seedlings. *Plant Physiology* **100**:170-177.
- Ballaré CL** (1994) Light gaps: sensing the light opportunities in highly dynamic canopy environments. En: Caldwell M, Pearcy R (eds) *Exploitation of environmental heterogeneity by plants. Ecophysiological processes above and belowground*, pp 73-110. Academic Press, San Diego, CA.
- Ballaré CL, Scopel AL, Jordan ET, Vierstra RD** (1994b) Signalling among neighbouring plants and the development of size inequalities in plant populations. *Proceedings of the National Academy of Science* **91**:10094-10098.
- Ballaré CL, Barnes PW, Flint SD** (1995a) Inhibition of hypocotyl elongation by ultraviolet-B radiation in de-etiolating tomato seedlings .1. The photoreceptor. *Physiol Plant* **93**:584-592.
- Ballaré CL, Scopel A, Sánchez RA** (1995b) Plant photomorphogenesis in canopies, crop growth and yield. *Hort Science* **30**:1172-1181.
- Ballaré CL, Scopel AL, Roush ML, Radosevich SR** (1995c) How plants find light in patchy canopies. A comparison between wild-type and phytochrome-B-deficient mutant plants of cucumber. *Funct Ecol* **9**:859-868.
- Ballaré CL, Scopel AL, Sánchez RA** (1997) Foraging for light: photosensory ecology and agricultural implications. *Plant, Cell and Environment* **20**:820-825.
- Ballaré CL** (1999) Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signalling mechanisms. *Trends in Plant Science*.
- Ballaré CL, Casal, J.J.** (2000) Light signals perceived by crop and weed plants. *Field Crops Research* **67**:149-160.

- Ballesteros M, Bolle C, Lois L, Moore J, Vielle-Calzada JP, Grossniklaus U, Chua NH** (2001) LAF1, a MYB transcription activator for phytochrome A signaling. *Genes & Development*. **15**:2613-2625.
- Barnes SA, Nishizawa NK, Quaggio RB, Whitelam GC, Chua N-H** (1996) Far-red light blocks greening of Arabidopsis seedlings via a phytochrome A-mediated change in plastid development. *Plant Cell* **8**:601-615.
- Baumgardt R-L, Oliverio KA, Casal JJ, Hoecker U** (2002) SPA1, a component of phytochrome A signal transduction, regulates the light signaling current. *Planta* **215**:745-753.
- Bhalla US, Iyengar, R.** (1999) Emergent properties of networks of biological signaling pathways. *Science* **283**:381-387.
- Bhalla US, Ram PT, Iyengar R** (2002) MAP kinase phosphatase as a locus of flexibility in a mitogen-activated protein kinase signaling network. *Science* **297**:1018-1023.
- Blázquez MA, Soowal, L.N., Lee, I., and Weigel, D.** (1997) LEAFY expression and flower initiation in Arabidopsis. *Development* **124**:3835-3844.
- Boccalandro HE, Mazza CA, Mazzella MA, Casal JJ, Ballare CL** (2001) Ultraviolet B radiation enhances a phytochrome-B-mediated photomorphogenic response in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **126**:780-788.
- Bolle C, Konkz C, Chua N-H** (2000) PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Genes and Development* **14**:1269-1278.
- Botto JF, Sánchez RA, Casal JJ** (1995) Role of phytochrome B in the induction of seed germination by light in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* **146**:307-312.
- Botto JF, Sánchez RA, Whitelam GC, Casal JJ** (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, Neuhaus N, Yamagata H, Chua N-H** (1994) Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* **77**:73-81.

- Boylan MT, Quail PH** (1991) Phytochrome A overexpression inhibits hypocotyl elongation in transgenic *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **88**:10806-10810.
- Briggs WR, Beck CF, Cashmore AR, Christie JM, Hughes J, Jarillo JA, Kagawa T, Kanegae H, Liscum E, Nagatani A, Okada K, Salomon M, Rüdiger W, Sakai T, Takano M, Wada M, Watson JC** (2001) The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* **13**:993-997.
- Butler W, Norris K, Siegelman H, Hendricks S** (1959) Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Biochemistry* **45**:1703-1708.
- Carrari F, Perez-Flores L, Lijavetzky D, Enciso S, Sanchez R, Benech-Arnold R, Iusem N** (2001) Cloning and expression of a sorghum gene with homology to maize *vp1*. Its potential involvement in pre-harvest sprouting resistance. *Plant Molecular Biology* **45**:631–640.
- Casal JJ, Sánchez RA, Deregibus VA** (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 JJ, Sánchez RA, Deregibus VA** (1987.) Tillering responses of *Lolium multiflorum* plants to changes of red/far-red ratio typical of sparse canopies. *Journal of Experimental Botany* **38**:1432-1439.
- Casal JJ, Sánchez RA** (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 JJ, Sánchez RA, Vierstra RD** (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 JJ** (1995a) Coupling of phytochrome B to the control of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *Planta* **196**:23-29.
- Casal JJ, Boccalandro H** (1995b) Co-action between phytochrome B and HY4 in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **197**:213-218.

- Casal JJ** (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 JJ, Mazzella MA** (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 JJ** (2000a) Fotomorfogénesis: La luz como factor regulador del crecimiento. En: Azcón-Bieto J, Telón M (eds) *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, pp 377-388. McGraw-Hill/Interamericana, Edicions Universitat de Barcelona, Madrid.
- Casal JJ** (2002b) Environmental cues affecting development. *Current Opinion in Plant Biology* **5**:(in press).
- Casal JJ** (2000c) Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants. *Photochemistry and photobiology* **71**:1-11.
- Casal JJ, 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.** (2002) 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, Luccioni L, Oliverio K, Boccalandro H** (2003) Light, phytochrome signalling and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Photochem Photobiol Sci* **2**:625-36.
- Casal JJ, Fankhauser, C., Coupland, G., Blázquez, M.A.** (2004) Signalling for developmental plasticity. *Trends in Plant Science* **9**:309-314.
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu Y-J, Liu, D.** (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**:760-765.
- Cassman K** (1999) Ecological intensification of cereal production systems: yield potential, soil quality and precision agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **96**:5952-5959.
- Cerdán PD, 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 PD, Staneloni RJ, Ortega J, Bunge MM, Rodriguez-Batiller J, Sánchez RA, Casal JJ** (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.
- Cerdán P, Chory J** (2003) Regulation of flowering time by light quality. *Nature* **423**:881-885.
- Chamovitz DA, Wei N, Osterlund MT, von Arnim AG, Staub JM, Matsui M, Deng X-W** (1996) The novel components of the *Arabidopsis* light-signaling pathway may define a group of general developmental regulators shared by both animal and plant kingdoms. *Cell* **82**:353-354.
- Cherry JR, Hershey HP, Vierstra RD** (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, Peto C, Feinbaum R, Pratt L, Ausubel F** (1989) *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell* **58**:991-999.
- Christie JM, Reymond P, Powell GK, Bernasconi P, Raibekas AA, Liscum E, Briggs WR** (1998) *Arabidopsis* NPH1: A flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* **282**:1698-1701.
- Clack T, Mathews S, Sharrock RA** (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 RC, Vierstra RD** (1997) Phytochrome degradation. *Plant, Cell and Environment* **20**:713-721.
- Colón-Carmona A, Chen DL, Yeh K-C, Abel S** (2000) Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome in vitro. *Plant Physiology* **124**:1728-1738.
- Constable GA, Rawson HM** (1980) Effect of leaf position, expansion and age on photosynthesis, transpiration and water use efficiency of cotton. *Australian Journal of Plant Physiol* **7**:89-100.

- Davis SJ, Alexander VV, Vierstra RD** (1999) Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* **286**:2517-2520.
- De Miguel L, Burgin MJ, Casal JJ, R.A. S** (2000) Antagonistic action of low-fluence and high-irradiance modes of response of phytochrome on germination and B-mannanase activity in *Datura ferox* seeds. *Journal of Experimental Botany* **51**:1127-1133.
- Dehesh K, Franci C, Parks BM, Seeley KA, Short TW, Tepperman JM, Quail PH** (1993) Arabidopsis hy8 locus encodes phytochrome A. *Plant Cell* **5**:1081-1088.
- Deng XW, Caspar T, Quail PH** (1991) *cop1*: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **5**:1172-1182.
- Deng XW, Dubiel W, Wei N, Hofmann K, Mundt K** (2000) Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunits: an essential regulator of development. *Trends Genet* **16**:289.
- Deng X-W, Matsui M, Wei N, Wagner D, Chu AM, Feldmann KA, Quail PH** (1992) *COP1*, an *Arabidopsis* regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G β homologous domain. *Cell* **71**:791-801.
- Deregibus VA, Sanchez RA, Casal JJ** (1983) Effects of light quality on tiller production in *Lolium* sp. *Plant Physiology* **72**:900-902.
- Devlin P, Patel SR, Whitelam GC** (1998) Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**:1479-1488.
- Devlin PF, Robson PRH, Patel SR, Goosey L, Sharrock RA, Whitelam GC** (1999) Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time. *Plant Physiology* **119**:909-915.
- Dieterle M, Büche C, Schäfer E, Kretsch T** (2003) Characterization of a novel non-constitutive photomorphogenic *cop1* allele. *Plant Physiology* **133**:1557 - 1564.
- Dieterle M, Zhou, Y.-C., Schäfer, E., Funk, M., Kretsch, T.** (2001) EID1, an F-box protein involved in phytochrome A-specific light signaling. *Genes and Development* **15**:939-944.
- Dunwell JM** (2000) Transgenic approaches to crop improvement. *Journal of Experimental Botany* **51**:487-496.

- Elich TD, Chory J** (1997) Biochemical characterization of *Arabidopsis* wild-type and mutant phytochrome B holoproteins. *Plant Cell* **9**:2271-2280.
- Fairchild CD, 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, Yeh KC, Lagarias JC, Zhang H, Elich TD, Chory J** (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.
- Folta KM, Spalding, E. P.** (2001a) Opposing roles of phytochrome A and phytochrome B in early cryptochrome-mediated growth inhibition. *Plant Journal* **28**:333-340.
- Folta KM, Spalding, E. P.** (2001b) Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition. *Plant Journal* **26**:471-478.
- Franklin KA, Praekelt U, Stoddart WM, Billingham OE, Halliday KJ, Whitlam GC** (2003) Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **131**:1340-1346.
- Furuya M, Song P-S** (1994) Assembly and properties of holophytochrome. En: Kendrick RE, Kronenberg GHM (eds) *Photomorphogenesis in plants*, 2nd edn, pp 105-140. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Genoud T, Buchala A, Chua N-H, Métraux J-P** (2002) Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **31**:87-95.
- Goodman L, Majack R** (1989) Vascular smooth muscle cells express distinct transforming growth factor-beta receptor phenotypes as a function of cell density in culture. *J. Biol. Chem.* **264**:5241-5244.
- Goto N, Kumagai T, Koornneef M** (1991) Flowering responses to light-breaks in photomorphogenic mutants of *Arabidopsis thaliana*, a long-day plant. *Physiologia Plantarum* **83**:209-215.
- Guo H, Yang H, Mockler TC, Lin C** (1998) Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* **279**:1360-1363.

- Guo H, Mockler, T., Duong, H., Lin, C.** (2001) SUB1, an *Arabidopsis* Ca²⁺-binding protein involved in cryptochrome and phytochrome coaction. *Science* **19**:487-490.
- Halliday KJ, Koornneef M, Whitelam GC** (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.
- Halliday KJ, Salter, M. G., Thingnaes, E., Whitelam, G. C.** (2003) Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator *FT*. *Plant Journal* **33**:875-885.
- Hanelt S, Braun B, Marx S, Scheneider** (1992) Phytochrome evolution a phylogenetic tree with the first complete sequence of phytochrome from *Selaginella martessii* (spring). *Photochem Photobiol* **56**:751-758.
- Hardtke CS, Deng, X.W.** (2000) The cell biology of COP/DET/FUS proteins. Regulating proteolysis in photomorphogenesis and beyond? *Plant Physiology* **124**:1548-1557.
- Heyer AG, Mozley D, Landschütze V, Thomas B, Gatz C** (1995) Function of phytochrome A in *Solanum tuberosum* as revealed through the study of transgenic plants. *Plant Physiology* **109**:53-61.
- Hirschfeld M, Tepperman JM, Clack T, Quail PH, Sharrock AR** (1998) Coordination of phytochrome levels in *phyB* mutants of *Arabidopsis* as revealed by apoprotein-specific monoclonal antibodies. *Genetics* **149**:523-535.
- Hoecker U, Quail PH** (2001) The phytochrome A-specific signaling intermediate SPA1 interacts directly with COP1, a constitutive repressor of light signaling in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*:in press.
- Hoecker U, Xu Y, Quail PH** (1998) *SPA1*: a new genetic locus involved in phytochrome A-specific signal transduction. *Plant Cell* **10**:19-33.
- Holm M, Li-Geng M, Li-Jia Q, Deng XW** (2002) Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes&Dev.* **16**:1247-1259.
- Holmes MG, Smith H** (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.

- Holmes MG, Sager JC, Klein WH** (1986) Sensivity to far-red radiation in stomata of *Phaseolus vulgaris* L.: rhythmic effects on conductance and photosynthesis. *Planta* **168**:516-522.
- Horton P** (2000) Prospects for crop improvement through the genetic manipulation of photosynthesis: morphological and biochemical aspects of light capture. *Journal of Experimental Botany* **51**:475-485.
- Hsieh H-L, Okamoto H, Wang M, Ang L-H, Matsui M, Goodman H, Deng XW** (2000) *FIN219*, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of *Arabidopsis* development. *Genes & 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 ZJ, Edery I, Rosbash M** (1993) PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature* **364**:259 - 262.
- Hudson M, Ringli C, Boylan MT, Quail PH** (1999) The FAR1 locus encodes a novel nuclear protein specific to phytochrome A signaling. *Genes and Development* **13**:2017-2027.
- Inskeep WP, Bloom PR** (1985) Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide. *Plant Physiology* **77**:483-485.
- Jackson SD, Heyer A, Dietze J, Prat S** (1996) Phytochrome B mediates the photoperiodic control of tuber formation in potato. *Plant Journal* **9**:159-166.
- Jackson S** (1999) multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiology* **119**:1-8.
- Jarillo JA, Gabrys H, Capel J, Alonso JM, Ecker JR, Cashmore AR** (2001) Phototropin-related NPL1 controls chloroplasts relocation induced by blue light. *Nature* **410**:952-954.
- Johnson E, Bradley M, Harberd P, Whitelam GC** (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 AM, Ecker JR, Chen J-G** (2003) A reevaluation of role of the heterotrimeric G protein in coupling light responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **131**:1623-1627.
- Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, Ishiguro S, Kato T, Tabata S, Okada K, Wada M** (2001) *Arabidopsis NPL1*: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* **291**:2138-2141.
- Kasperbauer MJ** (1971) Spectral distribution of light in a tobacco canopy and effects of end-of-day light quality on growth and development. *Plant Physiol.* **47**:775-778.
- Khush GS** (2001) Green revolution: the way forward. *Nature Reviews Genetics* **2**:815-822.
- Kim J, Yi, H., Choi, G., Shin, B., Song, P.-S. and Choi, G.** (2003) Functional characterization of Phytochrome Interacting Factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction. *Plant Cell* **15**:2399-2407.
- Kim L, Kiercher S, Toth R, Adam E, Schaefer E, Nagy F** (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 RW, Bagnall DJ** (1996) Phytochromes 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, Rolf E, Spruit CJP** (1980) Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie* **100**:147-160.
- Lagarias JC, Lagarias DM** (1989) Self-assembly of synthetic phytochrome holoprotein *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **86**:5778-5780.
- Lagarias D, Wu S-H, Lagarias C** (1995) Atypical phytochrome gene structure in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *Plant Molecular Biology* **29**:1127-1142.
- Lariguet P, Boccalandro, H.E., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Chory, J., Casal, J.J, Fankhauser, C.** (2003) A growth regulatory loop that provides homeostasis to phytochrome A signaling. *Plant Cell* **15**:2966-2978.

- Libenson S, Rodriguez V, Sánchez RA, Casal JJ** (2002) Low red to far-red ratios reaching the stem reduce grain yield in sunflower. *Crop Science* **42**:1180-1185.
- Lissemore JL, Quail PH** (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, Nagatani A, Tomizawa K-I, Deak M, Kern R, Kendrick RE, Furuya M** (1992) The cucumber long hypocotyl mutant lacks a light-stable PHYB-like phytochrome. *Plant Cell* **4**:241-251.
- Luccioni LG, Oliverio, K.A., Yanovsky, M.J., Boccalandro, H., Casal, J.J.** (2002) Brassinosteroid mutants uncover fine tuning of phytochrome signaling. *Plant Physiology* **178**:173-181.
- Ma L, Gao Y, Qu L, Chen Z, Li J, Zhao H, W. DX** (2002) Genomic evidence for COP1 as a repressor of light-regulated gene expression and development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14**:2383-2398.
- Maddoni GA, Otegui ME, Andrieu B, Chelle M, Casal JJ** (2002) Maize leaves turn away from neighbors. *Plant Physiol.* **130**:1181-1189.
- Mancinelli AL** (1994) The physiology of phytochrome action. En: Kendrick RE, Kronenberg GHM (eds) *Photomorphogenesis in plants*, 2 edn, pp 211-269. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Mann CC** (1999) Crop scientists seek a new revolution. *Science* **283**:310-314.
- Martinez-Garcia JF, Huq E, Quail PH** (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* **288**:859-863.
- Maxwell BB, Andersson CR, Poole DS, Kay SA, Chory J** (2003) HY5, circadian clock-associated 1, and a cis-element, det1 dark response element, mediate det1 regulation of *chlorophyll a/b-binding protein 2* expression. *Plant Physiology* **133**:1565 -1577.
- Mazzella MA** (1995) Control de los mecanismos de la partición del carbono por el fitocromo. Seminario de Licenciatura FCEyN.
- Mazzella MA, Alconada Magliano TM, Casal JJ** (1997) Dual effect of phytochrome A on hypocotyl growth under continuous red light. *Plant, Cell and Environment* **20**:261-267.

- Mazzella MA, Casal JJ** (2001a) Interactive signalling by phytochromes and cryptochromes generates de-etiolation homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **24**:155-162.
- Mazzella MA, Cerdán, P.D., Staneloni, R., Casal, J.J.** (2001b) Hierarchical coupling of phytochromes and cryptochromes reconciles stability and light modulation of *Arabidopsis* development. *Development* **128**:2291-2299.
- McCormac AC, Wagner D, Boylan MT, Quail PH, Smith H, Whitelam GC** (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 TW, von Arnim AG, Araki T, Komeda Y, Misera S, Deng X-W** (1994a) Genetic and molecular analysis of an allelic series of *cop1* mutants suggests functional roles for the multiple protein domains. *Plant Cell* **6**:487-500.
- McNellis TW, von Arnim AG, Deng X-W** (1994b) Overexpression of *Arabidopsis* COP1 results in partial suppression of light-mediated development: evidence for a light-inactivable repressor of photomorphogenesis. *Plant Cell* **6**:1391-1400.
- Misera S, Muller AJ, U. W-H, G. J** (1994) The FUSCA genes of *Arabidopsis*: negative regulators of light responses. *Mol Gen Genet* **244**:242-52.
- Moffat AS** (2000) Can genetically modified crops go "greener". *Science* **290**:253-254.
- Mohr H** (1986) Coaction between pigment systems. En: Kendrick R, Kronenberg, GHM (ed) *Photomorphogenesis in plants*, 1 edn, pp 547- 564. Marthinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands.
- Møller S, Kunkel T, Chua NH** (2001) A plastidic ABC protein involved in intercompartmental communication of light signaling. *Genes&Dev.* **15**:90-103.
- Monte E, Alonso, J. M., Ecker, J. R., Zhang, Y., Li, X., Young, J., Austin-Philips, S., Quail, P. H.** (2003) Isolation and characterization of *phyc* mutantants in *Arabidopsis* reveals complex crosstalk between phytochrome signaling pathways. *The Plant Cell* **15**:1962-1980.
- Moon J, Parry G, Estelle M** (2004) The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *The Plant Cell* **16**:3181-3195.

- Morgan DC, Smith H** (1976) Linear relationship between phytochrome photoequilibrium and growth in plants under natural radiation. *Nature* **262**:210-212.
- Nagatani A, Chory J, Furuya M** (1991) Phytochrome B is not detectable in the hy3 mutant of *Arabidopsis*, which is deficient in responding to end-of-day far-red light treatments. *Plant Cell Physiol.* **32**:1119-1122.
- Nagatani A, Nishizawa NK, Mori S, Kay SA, Chua N-H, Furuya M** (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, Reed JW, Chory J** (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, Chory J** (1998) Genetic interactions between phytochrome a, phytochrome b and cryptochrome 1 during *Arabidopsis* development. *Plant Physiology* **118**:27-36.
- Neuhaus G, Bowler C, Kern R, Chua N-H** (1993) Calcium/Calmodulin-dependent and independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell* **73**:937-952.
- Ni M, Tepperman JM, Quail PH** (1999) Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* **400**:781-4.
- 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.
- Okamoto H, Matsui M, Deng XW** (2001) Overexpression of the heterotrimeric G-protein alpha-subunit enhances phytochrome-mediated inhibition of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**:1639-1651.
- Okar D, Manzano A, Navarro-Sabaté A, Riera L, Bartrons R, Lange A** (2001) PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-biphosphate. *Trends Biochemical Sciences* **26**:30-35.
- Osterlund MK, Deng X-W** (1998) Multiple photoreceptors mediate the light induced reduction of GUS-COP1 from *Arabidopsis* hypocotyl nuclei. *Plant Journal* **16**:201-208.

- Osterlund MT, Hardtke, N.W., Deng, X.W.** (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* **405**:462-466.
- Parks BM, Quail PH** (1993) hy8, a new class of *Arabidopsis* long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *The Plant Cell* **5**:39-48.
- Parks BM, Quail PH, Hangarter RP** (1996) Phytochrome A regulates red-light induction of phototropic enhancement in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **110**:155-162.
- Paul MJ, Foyer CH** (2001) Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **52**:1383-1400.
- Perissi V, Aggarwal A, Glass CK, Rose DW, M.G. R** (2004) A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell* **116**:511-526.
- Quail P** (1998) The phytochrome family: dissection of functional roles and signalling pathways among family members. *Phil. Trans. R. Soc. London. B.* **333**:1399-1403.
- Quail PH** (1991) Phytochrome: a light-activated molecular switch that regulates plant gene expression. *Annu. Rev. Genet.* **25**:389-409.
- Quail PH** (1997) An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant, Cell and Environment* **20**:657-665.
- Quail PH** (2002) Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature Reviews Molecular and Cell Biology* **3**:85-93.
- Quinn MHO, K., Yanovsky, M.J., Casal, J.J.** (2002) CP3 is involved in negative regulation of phytochrome A signalling in *Arabidopsis*. *Planta* **215**:557-564.
- Reed JW, Nagpal P, Poole DS, Furuya M, Chory J** (1993) Mutations in the gene for the Red/Far-Red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **5**:147-157.
- Robson PRH, Whitelam GC, Smith H** (1993) Selected components of the shade-avoidance syndrome are displayed in a normal manner in mutants of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica rapa* deficient in phytochrome B. *Plant Physiology* **102**:1179-1184.
- Robson PRH, Smith H** (1996) Genetic and transgenic evidence that phytochromes A and B act to modulate the gravitropic orientation of *Arabidopsis thaliana* hypocotyls. *Plant Physiology* **110**:211-216.

- Rousseaux MCH, A.J. Sanchez, R.A.** (1999) Light environment, nitrogen content, and carbon balance of basal leaves of sunflower canopies. *Crop Science* **39**:1093-1100.
- Saijo Y, Sullivan, J.A., Wang, H., Yang, J., Shen, Y., Rubio, V., Ma, L.,Hoecker, U. and Deng, X.-W.** (2003) The COP1–SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes & Dev.* **17**:2642 - 2647.
- Sangoi L, Gracietti M, Rampazzo C, Bianchetti P** (2002) Response of brazilian maize hybrids from different eras to changes in plant density. *Field Crop Research* **79**:39-51.
- Schafer E, Bowle C** (2002) Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO Reports* **3**:1042-1048.
- Schmitt J** (1997) Is photomorphogenic shade avoidance adaptive? Perspectives from population biology. *Plant, Cell and Environment* **20**:826-830.
- Schneider-Poetsch H** (1992) Signal transduction by phytochrome have a modulate related to the transmitter modules of bacterial sensor protein. *Photochemistry and Photobiology* **56**:839-846.
- Scopel AL, Ballaré, CL, Sanchez RA** (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.
- Seo HS, Watanabe E, Tokutomi S, Nagatani A, Chua N-H** (2004) Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes and Development*, **in press**.
- Seo HS, Yang J-Y, Ishikawa M, Bolle C, Ballesteros ML, Chua N-H** (2003) LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature* **2003**:995-999.
- Setter TL, Brun WA** (1980) Stomatal closure and photosynthetic inhibition in soybean leaves induced by petiole girdling and pod removal. *Plant Physiology* **65**:884-887.
- Shinomura T, Nagatani A, Chory J, Furuya M** (1994) The induction of seed germination in *Arabidopsis thaliana* is regulated principally by phytochrome B and secondarily by phytochrome A (vol 104, pg 363, 1994). *Plant Physiol* **105**:773.
- Shinomura T, Nagatani A, Hanzawa H, Kubota M, Watanabe M, Furuya M** (1996) 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.
- Simpson GG, Dean C** (2002) *Arabidopsis*, the rosetta stone of flowering time? *Science* **296**:285-289.
- Sinclair T** (1993) Crop Yield Potential and Fairy Tales. En: Buxton D (ed) *International Crop Science I*, pp 707-712. Crop Science Society of America, Inc, Madison, Wi.
- Smith H** (1982) Light quality, photoperception and plant strategy. *Annual Review of Plant Physiology* **33**:481-518.
- Smith H** (1992) The ecological functions of the phytochrome family. Clues to a transgenic programme of crop improvement. *Photochemistry and Photobiology* **56**:815-822.
- Smith H, Whitelam GC** (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.
- Somers DE, Sharrock RA, Tepperman JM, Quail PH** (1991) The *hy3* long hypocotyl mutant of *Arabidopsis* is deficient in phytochrome B. *Plant Cell* **3**:1263-1274.
- Somers DE, Quail PH** (1995) Temporal and spatial expression patterns of PHYA and PHYB genes in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **7**:413-427.
- Stacey MG, von Arnim, A.G.** (1999) A novel motif mediates the targeting of the *Arabidopsis* COP1 protein to subnuclear foci. *J. Biol. Chem.* **274**: 27231-27236.
- Suzuki G, Yanagawa Y, Kwok SF, Matsui M, Deng X-W** (2002) *Arabidopsis* COP10 is a ubiquitin-conjugating enzyme variant that acts together with COP1 and the COP9 signalosome in repressing photomorphogenesis. *Genes & Dev.* **16**:554 - 559.
- Sweere U, Eichhenberg K, Lohrmann J, Mira-Rodado V, Baurle I, Kudla J, Nagy F, Schafer E, Harter K** (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signalling. *Science* **294**:1108-1111.
- Takagi S, Kong S-G, Mineyuki Y, Furuya M** (2003) Regulation of actin-dependent cytoplasmic motility by type II phytochrome occurs within seconds in *Vallisneria gigantea* epidermal cells. *Plant Cell* **15**:331-345.
- Taylor BL, Zhulin IB** (1999) PAS Domains: internal sensors of oxygen, redox potential and light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**:479-506.

- Taylor DC** (2001) Field testing transgenic rapeseed cv. hero transformed with a yeast sn-2 acyltransferase results in increased oil content, erucic acid content and seed yield. *PNAS* **8**:317-322.
- Tepperman JM, Zhu, T., Chang, H.-S., Wang, X., Quail, P.H.** (2001) Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**:9437-9442.
- Terry MJ** (1997) Phytochrome chromophore-deficient mutants. *Plant, Cell and Environment* **20**:740-745.
- Tetio-Kagho F** (1988) Responses of maize to plant population density. II. Reproductive development, yield, and yield adjustments. *Agronomy journal* **80**:935-940.
- Thiele A, Herold, M., Lenk, I., Quail, P.H., Gatz, C.** (1999) Heterologous expression of Arabidopsis phytochrome B in transgenic potato influences photosynthetic performance and tuber development. *Plant Physiology* **120**:73-82.
- Thummler F, Dufner M, Kreisl P, Dittrich P** (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.
- Tilman D, Cassman K, Matson P, Naylor R, Polasky S** (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* **418**.
- Tomato M, Mochizuki N, Nagatani A** (2003) Dimers of N-terminal domain of phytochrome B are functional in nucleus. *Science* **424**:571-574.
- Tyson JJ, Chen KC, Novak B** (2003) Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Current Opinion in Cell Biology* **15**:221-231.
- van Tuinen A, Kerckhoffs LHJ, Nagatani A, Kendrick RE, Koornneef M** (1995) Far-red light insensitive, phytochrome A deficient mutants of tomato. *Molecular and General Genetics* **246**:133-141.
- Vierstra RD** (1994) Phytochrome degradation. En: Kendrick RE, Kronenberg, G. H. M. (ed) *Photomorphogenesis in plants*, 2nd edn, pp 141-162. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- von Arnim AG, Deng X-W** (1994) Light inactivation of *Arabidopsis* photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. *Cell* **79**:1035-1045.
- von Arnim AG, Osterlund MT, Kwok SF, W. DX** (1997) Genetic and developmental control of nuclear accumulation of COP1, a repressor of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **114**:779 - 788.
- Wagner D, Fairchild CD, Kuhn RM, Quail PH** (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.
- Wagner D, Tepperman JM, Quail PH** (1991) Overexpression of phytochrome B induces a short hypocotyl phenotype in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell* **3**:1275-1288.
- Whitelam GC, Johnson E, Peng J, Carol P, Anderson ML, Cowl JS, Harberd NP** (1993) Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell* **5**:757-768.
- Whitelam GC, Smith H** (1991) Retention of phytochrome-mediated shade avoidance responses in phytochrome-deficient mutants of *Arabidopsis*, cucumber and tomato. . *Journal of Plant Physiology* **139**:119-125.
- Willy PJ, Kobayashi R, Kadonaga JT** (2000) A basal transcription factor that activates or represses transcription. *Science* **290**:982 - 984.
- Yang HQ, 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.
- Yang H-Q, Tang R-H, Cashmore AR** (2001) the signaling mechanism of *Arabidopsis* CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell* **13**:2573 - 2587.
- Yang J, Lin R, Sullivan J, Hoecker U, Liu B, Xu L, Deng X-W, Wang H** (2005) Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **in press**.
- Yanovsky MJ, Casal JJ, Whitelam GC** (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 MJ, Casal JJ, Luppi JP** (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 MJ, Izaguirre M, Wagmaister JA, Gatz C, Jackson SD, Thomas B, Casal JJ** (2000a) Phytochrome A resets the circadian clock and delays tuber formation under long days in potato. *Plant Journal* **23**:223-232.
- Yanovsky MJ, Whitelam GC, Casal JJ** (2000b) *fhy3-1* retains inductive responses of phytochrome A. *Plant Physiology* **123**:235-242.
- Yanovsky MJ, Kay, S.A.** (2002a) Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* **419**:308-312.
- Yanovsky MJ, Luppi, J. P., Kirchbauer, D., Ogorodnikova, O. B., Sineshchekov, V. A., Adam, E., Kircher, S., Staneloni, R. J., Schafer, E., Nagy, F., Casal, J. J.** (2002b) Missense mutation in the PAS2 domain of phytochrome a impairs subnuclear localization and a subset of responses. *The Plant Cell* **14**:1591-1603.
- Yanovsky MJ, Kay SA** (2003) Living by the calendar: How plants know when to flower. *Nature Reviews* **4**:265-275.
- Yeh K-C, Wu S-H, Murphy JT, Lagarias JC** (1997) A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* **277**:1505-1508.
- Yeh K-C, Lagarias C** (1998) Eukariotic phytochromes: Light-regulated serine / threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **95**:13976-13981.