

Tesis Doctoral

Los patrones de temperatura preparan a las plántulas para responder a la luz

Karayekov, Elizabeth Irene

2009

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

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

Cita tipo APA:

Karayekov, Elizabeth Irene. (2009). Los patrones de temperatura preparan a las plántulas para responder a la luz. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Karayekov, Elizabeth Irene. "Los patrones de temperatura preparan a las plántulas para responder a la luz". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

LOS PATRONES DE TEMPERATURA PREPARAN A LAS PLÁNTULAS PARA RESPONDER A LA LUZ

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área CIENCIAS BIOLÓGICAS

Elizabeth Irene Karayekov

Directores de tesis: Dr. Jorge Casal

Dr. Jorge Muschietti

Consejero de Estudios: Dr. Jorge Muschietti

Lugar de trabajo: IFEVA, FAUBA

Buenos Aires, 2009

LOS PATRONES DE TEMPERATURA PREPARAN A LAS PLÁNTULAS PARA RESPONDER A LA LUZ

En la naturaleza, las plantas están sometidas a ciclos de alternancia entre el día y la noche, que generan ciclos de luz-oscuridad y de alta-baja temperatura ambiente. De ese modo, una plántula etiolada que está en la oscuridad, bajo las primeras capas del suelo, recibe temperaturas alternadas antes de ser expuesta a la luz.

En esta tesis se describe un efecto sinérgico de la exposición transitoria a temperaturas elevadas y la señal de luz sobre el proceso de desetiación en *Arabidopsis thaliana*. Esta respuesta se manifiesta como un aumento en la inhibición del alargamiento del hipocotilo y el desplegado de los cotiledones. Se ha demostrado que este efecto sinérgico depende de phyB en su forma activa y de componentes río abajo en la vía de señalización iniciada por la luz. Realizando un análisis de los patrones globales de expresión de las plántulas tratadas con pulsos de calor y luz, se encontró un alto porcentaje de genes involucrados en la generación de ritmos circadianos que presentan niveles de expresión diferencial. Además, se probó que la combinación de pulsos de temperatura elevada y luz genera ritmos circadianos en el crecimiento del hipocotilo, demostrándose una relación entre el reloj biológico y el fenómeno de promoción de la des-etiación. Se demostró que cuando las plántulas son entrenadas previamente con pulsos de temperatura elevada la sensibilidad a la luz presenta un ritmo circadiano, que se correlaciona con un ritmo de abundancia de ARNm de *LHY* y *CCA1*. Asimismo, se pudo relacionar la presencia de los genes *PRR7* y *PRR9* con la generación de ritmos de *LHY* por los pulsos de temperatura elevada en oscuridad.

En conclusión, breves exposiciones a altas temperaturas causan oscilaciones rítmicas de varios genes entre los que se encuentran *LHY* y *CCA1*. La capacidad del fitocromo B de provocar la inhibición del crecimiento del tallo se manifiesta cuando los niveles de expresión de *LHY* y *CCA1* son bajos.

Palabras clave: elongación del hipocotilo, fitocromos, reloj biológico, *gating*, temperatura elevada

TEMPERATURE FLUCTUATIONS PREPARE PLANTS TO RESPOND TO LIGHT SIGNALS

In natural environments plants are exposed to day-night cycles that lead to light-dark and high-low ambient temperature alternations. While growing in the dark, under the soil, an etiolated seedling is exposed to temperature variations prior to reach the surface and receive light.

We found that the combination of a brief exposure to high temperature before the exposure to light had a synergic effect on hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. We have demonstrated that active phyB and downstream pathway components are necessary for the synergic response to occur. Microarray data of seedlings exposed to high temperature and light stimulus have shown a large portion of genes involved in circadian rhythms with differential expression pattern compared to seedlings exposed only to light. We also found that the combination of a brief exposure to high temperature with exposure to light generates circadian rhythms on hypocotyl elongation rate. Additionally, we discovered that when seedlings are daily exposed to high temperature pulses a rhythmic sensitivity to light signals is developed. We have found a correlation between light sensitivity changes and *LHY* and *CCA1* circadian expression levels. These mRNA oscillations caused by high temperature brief exposure in darkness are dependent on *PRR7* and *PRR9* genes.

In this work, we described a new physiological phenomenon on early plant development caused by the interaction between light and temperature signals. We have also found a possible mechanism to explain how brief high temperature exposure could impact on light signal sensitivity.

Key words: hypocotyl growth, phytochromes, plant circadian clock, gating, temperature fluctuation

AGRADECIMIENTOS

A Jorge Casal, porque además de su gran talento y capacidad como investigador ha sido un excelente director. Gracias a tu versatilidad, nos desviamos un poco “de la senda” y arribamos a esta tesis. Gracias por haberme acompañado durante estos años de formación con tu optimismo y buen humor que son excelentes aliados en los momentos más duros de una tesis! Siempre te estaré especialmente agradecida, porque sin saberlo allá por el 2004 tomaste una decisión que cambió el rumbo de mi vida...

A Jorge Muschiatti, por su predisposición, sus valiosos consejos y el uso de su laboratorio para los experimentos de Northern blot.

En el IFEVA: A Ogui, por ser de lo que no hay! Gracias por la buenísima onda que trajiste al lab y por la música!. A Andrea, por la compañía en las mañanas y por dar una mano siempre que lo necesité. A mis compañeros de laboratorio Carlos, “Pipa”, Luciana, Gustavo, Esteban, María, Leo, Santiago, Martín, Matías y Sabrina por aquellos buenos tiempos. A las chicas del laboratorio de UV Pato, Mercedes, Miriam y Micaela, por la buena onda de siempre.

A mis amigas Ro, Ana, Pau, Sil y Costi: haber venido a Bs. As. valió la pena sólo por conocerlas y contar con su amistad, las quiero muchísimo!. A Ro por mostrarme las gamas de grises y por toda la ayuda en el lab, que hubiera sido de mi sin vos!; a Ana por tener siempre la palabra justa, gracias por tus consejos!; a Paulis por ser tan divina y siempre mantener la diplomacia, arriba tus enganches musicales!; a Sil por jugarse por mí más de una vez, por el temario inagotable de los almuerzos y por la llegada del mate dulce! Y finalmente a Costi por tu inmensa generosidad, por haber estado desde el mismísimo principio...

A Julián, lo más lindo que me esperaba en Bs. As. Gracias por el amor, por compartir tu vida conmigo y hacerme tan feliz. Y como si fuera poco, también me hiciste el aguante en las numerosas noches de desvelo en el lab! Te amo.

A mis papás, Luis y Cielo, gracias por ser tan generosos, por cuidarme tanto, por valorarme y apoyarme siempre. Sin ustedes no hubiera podido lograrlo. Los quiero!

	Pág.
RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
INTRODUCCIÓN	
<i>I. La Percepción Lumínica.....</i>	<i>4</i>
<i>El proceso de desetiología.....</i>	<i>4</i>
<i>Recepción y transducción de la señal.....</i>	<i>5</i>
<i>Componentes de la señalización iniciada por fitocromos.....</i>	<i>5</i>
<i>II. La Percepción De La Temperatura.....</i>	<i>6</i>
<i>Respuestas a la temperatura elevada.....</i>	<i>7</i>
<i>Fluctuación de la temperatura en las capas superiores del suelo.....</i>	<i>8</i>
<i>Interacción entre temperatura y luz.....</i>	<i>8</i>
<i>III. Reloj Biológico Y Ritmos Circadianos.....</i>	<i>9</i>
<i>El Oscilador Central.....</i>	<i>10</i>
<i>“Inputs” y Entrenamiento del reloj.....</i>	<i>11</i>
<i>“Outputs” del reloj biológico.....</i>	<i>12</i>
<i>Regulación del reloj sobre la elongación del hipocotilo.....</i>	<i>13</i>
<i>Regulación de las respuestas al ambiente por el reloj.....</i>	<i>13</i>
HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS	
<i>Condiciones De Crecimiento.....</i>	<i>16</i>
<i>Fuentes Lumínicas.....</i>	<i>16</i>
<i>Material Vegetal.....</i>	<i>17</i>
<i>Medición De Largo De Hipocotilo y Ángulo Entre Cotiledones.....</i>	<i>17</i>
<i>Medición De La Cinética De Elongación Del Hipocotilo.....</i>	<i>18</i>
<i>Esterilización De Semillas.....</i>	<i>18</i>
<i>Extracción De ARN y Análisis De Microarreglos.....</i>	<i>18</i>
<i>Extracción De ARN y Cuantificación De Mensajeros Por PCRq.....</i>	<i>19</i>
<i>Mediciones De Actividad Luciferasa.....</i>	<i>20</i>

RESULTADOS

I. Caracterización Fisiológica Del Efecto Sinérgico Entre La Luz Y La Temperatura Elevada.....	22
Diseño experimental para estudiar la interacción entre la temperatura y la luz sobre la desetiología.....	22
Caracterizaciones fisiológicas primarias.....	22
Identificación de algunos componentes involucrados.....	24
Efectos sobre la cinética del alargamiento del hipocotilo.....	27
Relación entre el efecto sinérgico y el phyB biológicamente activo.....	28
II. Estudio De Los Cambios En La Expresión Génica Causados Por La Interacción Entre El Calor Y La Luz.....	29
Análisis de los cambios globales en el transcriptoma.....	30
Análisis de fase de los genes con expresión diferencial.....	32
Relación de algunos componentes del reloj biológico con el efecto sinérgico entre la luz y los pulsos breves de temperatura elevada.....	32
III. Efectos De La Combinación De Alta Temperatura y Luz Sobre Los Ritmos Circadianos.....	33
Ritmos de expresión génica.....	33
Ritmos de alargamiento del hipocotilo.....	36
IV. Estudio De Los Cambios En La Sensibilidad a La Luz Roja Causado Por El Pulso De Alta Temperatura.....	37
Análisis de la respuesta de gating sobre la tasa de elongación del hipocotilo.....	38
Análisis del gating de la respuesta de CAB2 a la luz.....	39
V. Búsqueda De Elementos Involucrados En La Respuesta De “Gating”.....	41
Identificación de componentes del reloj biológico relacionados al gating de sensibilidad a la luz roja.....	42
Evaluación de PRR7 y PRR9 como reguladores de los ritmos en los niveles de ANRm de LHY/CCA1 generados por los pulsos de alta temperatura.....	45
Vinculación de los genes candidatos con la respuesta de gating de sensibilidad a la luz roja.....	46

DISCUSIÓN

<i>Un Nuevo Fenómeno De Interacción Entre Luz y Temperatura Que Afecta El Desarrollo De Las Plantas.....</i>	48
<i>El Fenómeno Estudiado Involucra Componentes De Distintas Vías De Señalización.....</i>	49
<i>La Combinación De Pulsos De Alta Temperatura Con La Exposición a La Luz Genera Ritmos Circadianos En Las Plantas.....</i>	50
<i>El Ritmo De Abundancia De ARNm De LHY y CCA1 Generado Por Los Pulsos De Calor Se Correlaciona Con El Ritmo De Sensibilidad A La Luz Roja.....</i>	51
<i>El Gating De Sensibilidad a Luz Roja Es Una Respuesta Específica Sobre El Crecimiento Del Hipocotilo.....</i>	52
<i>Coordinación Del Crecimiento Del Hipocotilo Por La Luz Y El Reloj Biológico.....</i>	53
<i>Modelo De La Interacción De Señales Entre Luz y Temperatura Elevada.....</i>	54
ANEXO I.....	55
ANEXO II.....	57
REFERENCIAS.....	66

I. La Percepción Lumínica

Durante el desarrollo, las plantas son expuestas a múltiples señales ambientales, siendo la luz una de las más importantes. La luz no sólo es la fuente de energía desencadenante del proceso fotosintético, sino que además provee señales que son traducidas por las plantas en información sobre el ambiente. Estas señales afectan ampliamente la regulación del crecimiento y el desarrollo (Smith, 2000).

La sensibilidad de las plantas a las señales del ambiente luminoso depende del contexto de desarrollo. Es así que en ocasiones las plantas pueden detectar y responder a unos pocos fotones de luz, como es el caso de la germinación en las semillas enterradas que son brevemente expuestas a la luz durante el laboreo del suelo (Scopel *et al.*, 1991). En cambio, algunos procesos requieren varias horas de luz por día, como el desarrollo del aparato fotosintético de las plántulas o la inducción de la floración por días largos.

El proceso de desetiología

En la naturaleza el crecimiento de plántulas etioladas ocurre mientras éstas se encuentran en oscuridad, bajo los primeros estratos del suelo, y elongan sus tallos para alcanzar la superficie. En *Arabidopsis*, las plántulas etioladas son altas y tienen cotiledones plegados amarillos, cloroplastos indiferenciados y el hipocotilo posee un gancho que protege al meristema apical del tallo. La percepción de la luz significa la emergencia del suelo y causa el proceso de desetiología. La desetiología es el conjunto de cambios que conllevan la transición de una plántula que crece en oscuridad, a expensas de las reservas de la semilla, a una plántula fotosintéticamente competente. En *Arabidopsis thaliana*, el proceso de desetiología involucra la expansión de los cotiledones, la organización del aparato fotosintético, la inhibición del alargamiento del hipocotilo y la síntesis de pigmentos con funciones fotoprotectoras (Chory *et al.*, 1989; Deng *et al.*, 1991). Para que el proceso de desetiología se desencadene en una plántula que emerge del suelo, es necesaria la señal que implica el cambio entre una condición de oscuridad continua y la exposición a ciclos de luz, independientemente de las características que el ambiente lumínico presente. Una plántula puede encontrar diversas condiciones lumínicas al iniciar este proceso, los flujos pueden ser bajos o altos, el fotoperíodo puede ser de día largo o día corto. Hasta ahora se conoce poco sobre los mecanismos que llevan a que una plántula pueda compensar estas diferencias (Mazzella & Casal, 2001).

Recepción y transducción de la señal

En *Arabidopsis*, la luz es percibida por tres familias de fotorreceptores: los fitocromos (phyA, phyB, phyC, phyD y phyE) que son receptores de luz roja y rojo lejano, los criptocromos (cry1 y cry2) y las fototropinas que son receptores de luz azul. Los fitocromos poseen dos formas fotoconvertibles: una forma inactiva, que absorbe máximamente luz roja, Pr; y una forma biológicamente activa, que absorbe luz rojo lejano, Pfr (Casal et al., 2003). Los cinco fitocromos son sintetizados en su forma inactiva Pr, que se localiza en el citosol. Tras la absorción de luz roja (R) Pr se convierte en la forma activa Pfr, que es traslocada al núcleo, permitiendo la interacción con elementos que inician la transducción de la señal (Casal et al., 2003) y la regulación de la transcripción de numerosos genes (Casal & Yanovsky, 2005). Con respecto a los criptocromos, CRY2 se localiza en el núcleo constitutivamente, mientras que CRY1 se encuentra en el núcleo en oscuridad y migra al citoplasma con la luz (Lin & Shalitin, 2003).

Las señales generadas por los fotorreceptores son integradas y transducidas a través de factores de transcripción bZIP como HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5) y HYH (HY5-HOMOLOG) (Oyama, Shimura & Okada, 1997; Holm et al., 2002). Existe una correlación entre la abundancia de estos factores y la fotomorfogénesis. COP1 y DET1 son represores de la fotomorfogénesis en oscuridad y actúan en el núcleo como E3 ubiquitin ligasas, marcando factores positivos de la señalización lumínica, como HY5, para su degradación vía proteosoma (Osterlund, Hardtke & Deng, 2000). En presencia de luz COP1 migra al citosol, permitiendo la acumulación de HY5 y el desencadenamiento del proceso fotomorfogénico.

Componentes de la señalización iniciada por fitocromos

Se han identificado muchos factores que actúan río abajo de fotorreceptores específicos. Existen, entonces, componentes específicos de la señalización mediada por phyA (desencadenada más fuertemente por luz rojo lejano) o por phyB (desencadenada por luz roja).

Una familia de factores de transcripción muy estudiada es la de los bHLH. Se ha demostrado que la forma Pfr de los fitocromos interactúa directamente con una subfamilia, definida como *phytochrome interacting factors* (PIFs). El primer miembro caracterizado es PIF3 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3; Ni et al., 1998), que interactúa con phyA y phyB, y se une al ADN a través del motivo G-box en las regiones promotoras de genes regulados por luz (Martinez-García et al., 2000), inhibiendo su transcripción. PIF3 y los bHLH relacionados (PIF4, PIF5 y PIF6)

funcionan como inhibidores de la fotomorfogénesis (Leivar *et al.*, 2008). En presencia de luz, el fitocromo en su forma activa Pfr marca a PIF3 para su degradación, permitiendo la transcripción de los genes activados por luz (Bauer *et al.*, 2004; Leivar *et al.*, 2008) como los genes *CAB* (*CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN*) entre los genes vinculados al desarrollo del aparato fotosintético.

A través del screening de líneas mutantes en *Arabidopsis*, se han identificado algunos componentes adicionales, específicos de la vía de señalización iniciada por phyB sobre la fotomorfogénesis, como *GI* (*GIGANTEA*), *ELF3* (*EARLY FLOWERING 3*) y *ELF4* (*EARLY FLOWERING 4*). Los mutantes nulos de estos genes presentan disminuidas las respuestas de desetiología bajo luz roja. Se ha demostrado que *ELF3* es un factor transcripcional que interacciona con phyB (Liu *et al.*, 2001), mientras que *ELF4* codifica para una proteína que no presenta homología alguna con proteínas de función establecida (Khanna *et al.*, 2003). *GI*, es una proteína que se localiza constitutivamente en el núcleo celular (Huq *et al.*, 2000).

II. La Percepción De La Temperatura

Las plantas pueden percibir y responder a los cambios de temperatura del ambiente. Tanto las respuestas desencadenadas por las temperaturas altas como las bajas son esenciales para la regulación de eventos claves del desarrollo y para la supervivencia. Existen respuestas que se desencadenan rápidamente (aclimatación al frío, compensación de temperatura, tasa de crecimiento, fluidez de las membranas celulares), mientras que otras requieren del monitoreo de la temperatura ambiente durante días o semanas (tiempo a floración, vernalización, estratificación, resistencia al congelamiento, tolerancia adquirida al estrés térmico) (Penfield, 2008).

En otros organismos como *Listeria* (Johanson *et al.*, 2002), *Bacillus subtilis* (Mansilla *et al.*, 2004) y *Drosophila* (Rozenzweig *et al.*, 2005) se han descrito algunos mecanismos de percepción de temperatura. En plantas, si bien se han realizado numerosos estudios genéticos en *Arabidopsis* que implican a varios genes en las respuestas a la temperatura ambiente, aún no se ha identificado una molécula que actúe como sensor de temperatura, y la mayoría de los estudios se enfocan en comprender las respuestas a las temperaturas extremas dejando en un segundo plano los mecanismos moleculares que subyacen a las respuestas a variaciones acotadas en la temperatura ambiente.

Respuestas a la temperatura elevada

Existen dos niveles de respuesta a la temperatura elevada, por un lado la respuesta de tolerancia basal y por otro la tolerancia adquirida. La primera involucra las respuestas que ocurren tras una primera exposición a temperaturas elevadas, sin aclimatación previa (Vierling, 1991). En cambio, cuando existe un período de aclimatación, de exposición a temperaturas altas no extremas durante al menos 15 minutos (38 °C en *Arabidopsis*), se genera una tolerancia adquirida incrementándose la temperatura máxima tolerada (en *Arabidopsis* puede llegar a los 45 °C) (Hong & Vierling, 2000). La aclimatación requiere de la expresión de proteínas de estrés térmico (HSPs, Heat Shock Proteins) que protegen a la planta del estrés oxidativo. Se ha postulado que la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) activan directamente la transcripción de las HSPs y que a su vez, éstas podrían actuar como sensores de ROS (Volkov *et al.*, 2006).

Parte de las respuestas a las temperaturas elevadas involucran cambios para mantener la fluidez en la estructura de las membranas celulares, aumentando el contenido de ácidos grasos saturados (Falcone *et al.*, 2004). Este aumento estaría relacionado con cambios en la expresión o estabilidad de los productos proteicos de genes de desaturasas de ácidos grasos a temperaturas elevadas (Penfield, 2008).

También existen cambios inducidos por el aumento de temperatura que involucran la acción de hormonas como el ácido salicílico (SA), el ácido abscísico (ABA), las giberelinas (GAs) y las auxinas. La acción del SA ha sido relacionada exclusivamente a la tolerancia basal (Clarke *et al.*, 2004), en cambio el ABA a la tolerancia adquirida (Larkindale *et al.*, 2005). La relación de las GAs con la temperatura ha sido estudiada mediante experimentos de termo-periodismo. La temperatura tiene una alta correlación con la tasa de crecimiento, sin embargo, existe una respuesta termo-periódica de crecimiento promovida por el aumento de la diferencia entre el máximo de temperatura durante el día y el mínimo alcanzado durante la noche (Penfield, 2008). En muchas especies una mayor diferencia termo-periódica aumenta la elongación del tallo, en pera se ha demostrado que esta elongación es mediada por la represión transcripcional de una enzima catabolizadora de GAs (GA 2-oxidasa) y por el aumento de la expresión de genes de la biosíntesis de GAs (Stavang *et al.*, 2005). Además del nivel de GAs, el aumento de las tasas de crecimiento se correlacionan con el contenido de auxinas de los tejidos. En *Arabidopsis* la exposición a 29 °C produce una respuesta de elongación celular que es acompañada de un aumento en la cantidad de auxinas (Gray *et al.*, 1998).

Fluctuación de la temperatura en las capas superiores del suelo

Dependiendo en gran medida de la carga de radiación solar incidente, la temperatura ambiente a la que pueden estar expuestas las plantas fluctúa a lo largo del año y ciclan a lo largo del día. Dependiendo además del canopeo presente, la temperatura en las primeras capas del suelo puede variar ampliamente. Se han establecido modelos que simulan los efectos del canopeo vegetal sobre la transferencia de calor en la interfase suelo-atmósfera (Flerchinger et al., 1998). El monitoreo diario de la temperatura en las primeras capas del suelo (a 4 cm de la superficie) muestra fluctuaciones de hasta 25 °C en los meses más calurosos (Battla, datos no publicados), alcanzando una diferencia de hasta 10 °C con respecto de la temperatura del aire. Tomando en cuenta que el proceso de desetiología ocurre en plántulas que se encuentran atravesando las primeras capas del suelo, podemos pensar que las respuestas a las altas temperaturas del suelo podrían condicionar esta etapa del desarrollo.

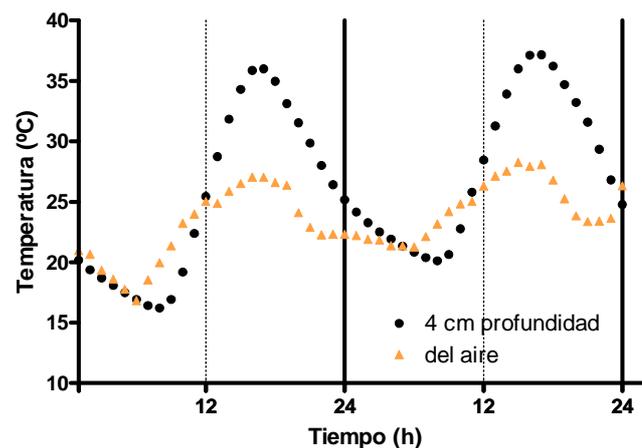


Figura 1. La temperatura de las primeras capas del suelo varía ampliamente a lo largo del día. Los puntos representan la temperatura medida a 4 cm de profundidad bajo el suelo, mientras que los triángulos representan la temperatura del aire. Gráfico realizado con datos provistos por el Dr. Battla (no publicados), tomados durante el mes de diciembre de 2004.

Interacción entre temperatura y luz

Aunque aún se desconocen los modos de percepción y las vías de señalización que indican cambios de la temperatura ambiente, se han caracterizado ciertas relaciones entre la temperatura y algunos procesos del desarrollo controlados por luz (revisado por Franklin, 2009). Con respecto al proceso de germinación, se sabe que para germinar las semillas de *Arabidopsis* requieren de un período de estratificación seguido de exposición a la luz. A nivel hormonal, este proceso está regulado

positivamente por la presencia de giberelinas (GAs), y se ha demostrado que las temperaturas altas inducen la síntesis de ácido abscísico (ABA) el cual reprime la biosíntesis de GAs, evitándose la germinación (Toh *et al.*, 2008). Se ha estudiado el rol de los diferentes miembros de la familia de fitocromos en el proceso de germinación a distintas temperaturas, y se ha visto que existe una marcada dominancia de algunos fitocromos sobre otros dependiendo de la temperatura indicando una posible especialización de la acción de cada fitocromo en función de la temperatura (Heschel *et al.*, 2007).

La arquitectura de las plantas es otro aspecto de su biología que se encuentra afectado por la temperatura y por la luz. Utilizando plantas de *Arabidopsis* cultivadas bajo las mismas condiciones lumínicas, pero a distintas temperaturas, se ha observado que mientras las plantas a 16°C presentan una roseta enana y compactada, las plantas a 28°C presentan un fenotipo típico de plantas crecidas en ambientes sombreados: pecíolos elongados, área foliar reducida y una posición más erectofila de las hojas (Franklin, 2009). Además se ha demostrado que la supresión de la elongación de los internodos de la roseta requiere de los fotorreceptores phyB y cry1, pero su acción es modulada por la temperatura (Mazzella, Bertero & Casal, 2000).

III. Reloj Biológico Y Ritmos Circadianos

Muchas variables de la fisiología de las plantas fluctúan a lo largo del día, algunos en respuesta a las fluctuaciones diarias de factores ambientales como los ciclos de luz-oscuridad, o de alta – baja temperatura que derivan de la alternancia del día y la noche. Pero no se trata solamente de la capacidad que poseen las plantas de responder al amanecer o al atardecer, sino de anticipar estos cambios diarios y ajustar su biología a ellos. El reloj biológico interno mantiene una estimación del paso del tiempo sincronizando los procesos fisiológicos con el momento apropiado del día. Este reloj biológico genera ritmos que tienen un período (el tiempo en que completa un ciclo) cercano a las 24 horas por lo tanto se lo denomina circadiano (del latín, *circa*: casi y *dies*: día). En efecto, una característica que define a los ritmos circadianos es que son capaces de mantener el período aún cuando se priva a las plantas de señales externas (Salomé & McClung, 2005). Puede considerarse que el reloj circadiano posee tres partes: un oscilador central que genera el comportamiento rítmico, una vía de entrada (“input”) que lleva información del ambiente para entrenar el oscilador central, y la vía de salida (“output”) que regula los procesos fisiológicos (Fig. 2; Gardner, *et al.*,

2006). Sin embargo, los límites suelen ser poco claros, ya que las diferentes partes del reloj están interconectadas e incluso existen numerosos componentes con más de un rol. Por ejemplo se considera que los fotorreceptores como phyB y cry1 son parte del “input” del reloj, pero ambos son a su vez, “outputs” rítmicos del reloj, ya que oscilan a nivel de ARNm y proteína (Kozma-Bognár *et al.*, 199; Tóth *et al.*, 2001).

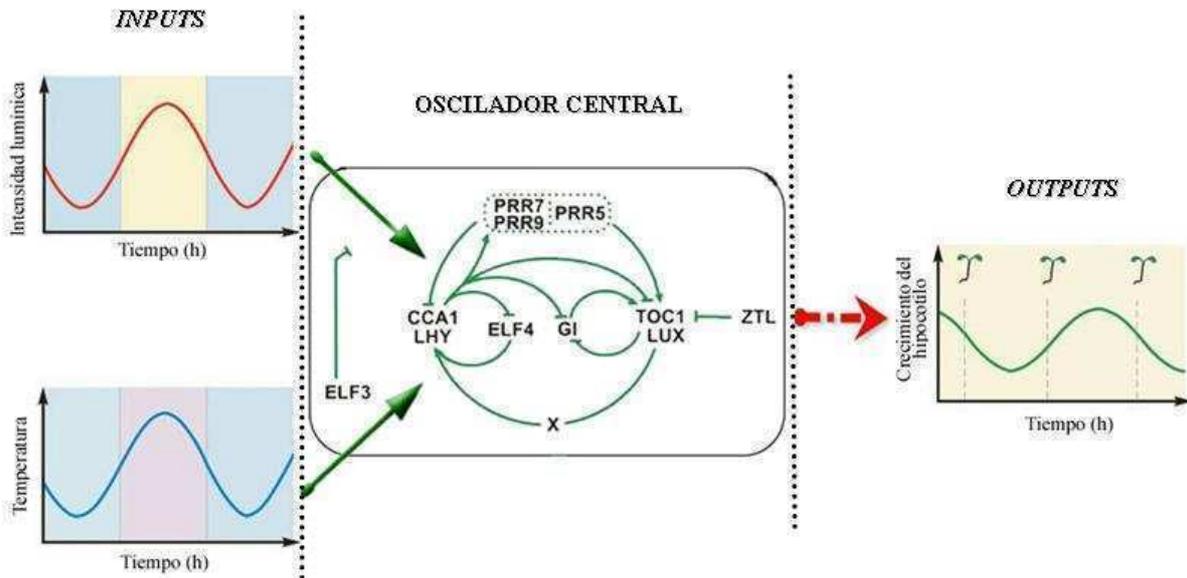


Figura 2. Representación de las partes constitutivas del reloj biológico. Los “inputs” o vías de entrada, como las señales lumínicas o los cambios de temperatura, entrenan al oscilador central. Este entrenamiento desencadena la generación de ritmos en diversos “outputs” o vías de salida, algunos fisiológicos como el crecimiento del hipocotilo. Figura adaptada de Hotta *et al.*, 2007.

El Oscilador Central

Actualmente se considera que el oscilador central de Arabidopsis consiste en múltiples circuitos cerrados de retroalimentación que se encuentran interconectados (Fig. 2). El primer circuito descrito es el que involucra a CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 (CCA1) y LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) y a TIMING OF CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1 (TOC1) (Alabadí *et al.*, 2001). CCA1 y LHY son factores de transcripción que poseen alta homología de secuencia y funciones parcialmente redundantes (Mizoguchi *et al.*, 2002). TOC1, también llamado PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 1 (PRR1) es miembro de esta familia de reguladores, que incluye además a PRR3, PRR5, PRR7 y PRR9 (Mizuno & Nakamichi, 2005). CCA1/LHY, reprimen la expresión de TOC1, a través del reconocimiento y unión a un motivo EE (Evening Element) presente en su región promotora (Alabadí *et al.*, 2001), y TOC1 promueve la expresión de CCA1/LHY.

La luz activa la expresión de *CCA1/LHY*, esto genera una disminución gradual de los niveles de *TOC1* que causan a su vez una caída en la producción de *CCA1/LHY*. Con los niveles de *CCA1/LHY* bajos, se levanta la represión ejercida sobre *TOC1* y el ciclo comienza nuevamente (Alabadí *et al.*, 2001). De esta manera se generan picos diarios de expresión de *CCA1/LHY* en las primeras horas del amanecer y de *TOC1* al atardecer. En el año 2005 Locke, Millar & Turner introdujeron dos componentes adicionales a este modelo. Los autores postularon que la luz activaría la expresión de un componente “Y” (que podría ser *GIGANTEA*, *GI*) que promueve la expresión de *TOC1*. A su vez, *TOC1* actuaría a través de un componente hipotético “X” para inducir la expresión de *LHY*, y tanto *TOC1* como *LHY* serían reguladores negativos del componente Y (Fig. 2).

Otros circuitos, no tan descriptos aún, podrían involucrar a los miembros restantes de la familia PRRs y *CCA1*, ya que se ha demostrado que *CCA1* regula la expresión de *PRR7* y *PRR9* a través de la unión a un sitio CBS (*CCA1*-binding site) presente en sus promotores (Farré *et al.*, 2005). Experimentos realizados con los dobles mutantes nulos indican que los PRRs regularían negativamente la expresión de *CCA1/LHY*.

Otros elementos han sido propuestos como integrantes del oscilador central. Uno de ellos es el gen *EARLY FLOWERING 4 (ELF4)* que se expresa en fase con *TOC1* y podría formar otro circuito del oscilador ya que su expresión es regulada negativamente por *CCA1/LHY*. Además, la inducción de la expresión por luz de *ELF4* requiere de *CCA1* y *LHY* y viceversa (Kikis, Khanna & Quail, 2005).

“Inputs” y Entrenamiento del reloj

Para mantener el reloj circadiano endógeno sincronizado con el ambiente, existen una serie de mecanismos de reseteo o entrenamiento generado por señales específicas recibidas del ambiente, que en momentos precisos del día (fase), afectan directamente el funcionamiento del oscilador central. Esto resulta en el ajuste de fase y mantenimiento del período cercano a 24hs de cada ciclo.

La luz y la temperatura son los dos estímulos principales que cumplen esta función (Fig. 2; Millar, 2004). Los fitocromos y criptocromos son la vía de entrada de las señales lumínicas al reloj, aunque se desconoce aún la manera en que estas señales son transducidas desde los fotorreceptores hasta el oscilador central. Se sabe que *ELF3 (EARLY FLOWERING 3)* regula negativamente la transducción de la señal lumínica al reloj, los mutantes con pérdida de función presentan ausencia de ritmos en condiciones de luz, pero no bajo oscuridad (McWatters *et al.*, 2000). Existen muchos

puntos de entrada posibles para las señales lumínicas al oscilador central dado que la transcripción de *CCA1/LHY*, *GI*, *ELF4* y *PRR9* es inducida por luz (Wang & Tobin, 1998; Huq & Quail, 2000; Farré *et al.*, 2005; Kikis *et al.*, 2005). Por otra parte, DET1 y COP1 podrían estar involucrados, ya que el reloj circadiano de los mutantes nulos para estos genes presentan períodos reducidos (Song & Carré, 2005). También ZEITLUPE (ZTL) podría tener un rol importante ya que regula la degradación dependiente de la luz de TOC1 (Más *et al.*, 2003) y se comprobado que interactúa *in vitro* con PHYB y CRY1 (Jarillo *et al.*, 2001).

El reloj circadiano puede ser entrenado también por ciclos de temperatura. Las bases moleculares de este entrenamiento no se conocen. Sólo se ha involucrado en el proceso a los genes *PRR7* y *PRR9*, debido a que los dobles mutantes nulos *prp7 prp9* fallan en el entrenamiento por ciclos de temperatura alternante (Salomé & McClung, 2005). Si bien la temperatura es una señal importante para el entrenamiento del reloj, existe un mecanismo de compensación que evita que cambios en la temperatura ambiente se traduzcan directamente a cambios en el reloj. Dado que la temperatura acelera las tasas a las que suceden las reacciones bioquímicas sería de esperar que una planta cultivada a temperaturas fisiológicas altas, presentara un reloj acelerado, con un período más corto. En cambio, cultivando plantas de *Arabidopsis* entre 12 y 27°C, se ha observado que este rango de temperatura no tiene efecto sobre la fase o el período del reloj circadiano (Edwards *et al.*, 2005). Esto demuestra que existe un mecanismo capaz de compensar los cambios inducidos por la temperatura en el metabolismo celular. Se ha estudiado la expresión de genes relacionados al reloj a diferentes temperaturas, en estos experimentos pudo verse que a temperaturas altas la expresión de *LHY* es menor y esto es compensado por un aumento en los niveles de expresión de *TOC1* y *GI*. En cambio las temperaturas bajas, producen un aumento en los niveles de *CCA1*, acompañado por una reducción en la expresión de *GI* (Gould *et al.*, 2006).

“Outputs” del reloj biológico

Las vías de salida del oscilador central conducen a la generación de ritmos fisiológicos y bioquímicos en las plantas como la fotosíntesis, el movimiento de las hojas, la elongación del hipocotilo, la apertura y el cierre de estomas, entre otros (Fig. 2). No se conoce aún cómo la información generada por el reloj es transducida en la generación de estos ritmos, pero se propone que ciertos mecanismos regulatorios como el control de la abundancia de proteínas y la regulación de la actividad enzimática estarían involucrados (Hotta *et al.*, 2007). El reloj circadiano puede regular

la abundancia de proteínas involucradas en vías metabólicas, a través del control de la transcripción génica, de la estabilidad del ARN o de la degradación de las proteínas (Hotta et al., 2007). Un ejemplo de la regulación sobre la transcripción es CCA1 que induce la expresión de genes *LHC* (Light-Harvesting-Complex) (Mizoguchi et al., 2002). Se estima que cerca del 16% de los transcritos codificados en el genoma de *Arabidopsis* presentan ritmos de abundancia, interpretándose que las proteínas involucradas en vías relacionadas del metabolismo celular se expresan de manera coordinada, generándose picos de abundancia en determinados momentos del día (Harper et al., 2000).

Regulación del reloj sobre la elongación del hipocotilo

En 1999, Dowson-Day & Millar desarrollaron un sistema de alta definición para el estudio del crecimiento del hipocotilo utilizando fotografías tomadas de manera automática entre lapsos regulares de tiempo. Así pudieron estudiar el crecimiento del hipocotilo en condiciones de luz continua (LL), en plántulas entrenadas bajo un fotoperíodo de día largo (12h-luz/12h-oscuridad). Encontraron que la elongación del hipocotilo era regulada por el reloj circadiano, ya que presenta un ritmo diario que depende de la presencia de genes relacionados al reloj como *TOC1* y *ELF3*. Según determinaron, el patrón de crecimiento del hipocotilo, presenta su máximo en las horas que corresponden al atardecer subjetivo, y su mínimo en las horas cercanas al amanecer subjetivo (Dowson-Day & Millar, 1999). También se ha observado una fuerte correlación entre los fenotipos de diversos mutantes de genes del reloj circadiano y de fotomorfogénesis, por lo que se puede pensar que existe una relación estrecha entre el reloj y la elongación del hipocotilo (Nozue & Maloof, 2006).

Entonces, sabemos que la luz inhibe la elongación del hipocotilo y también que la elongación está regulada por el reloj circadiano, pero desconocemos aún cómo la luz y el reloj coordinan la elongación del hipocotilo. Se han planteado dos modelos para ésta interacción (Nozue & Maloof, 2006). Un modelo establece una conexión lineal entre la señalización lumínica, el oscilador circadiano y la maquinaria de elongación del hipocotilo. De manera que la luz inhibe la elongación del hipocotilo a través del reloj circadiano. Un modelo alternativo establece que el reloj y la maquinaria de elongación del hipocotilo son regulados por la luz separadamente y que posteriormente el reloj actuaría como modulador de la elongación.

Regulación de las respuestas al ambiente por el reloj

Una de las consecuencias del control circadiano es que el mismo estímulo aplicado en diferentes momentos del día puede resultar en una respuesta de distinta intensidad, a este fenómeno se lo ha llamado “gating” (Hotta *et al.*, 2007). Probablemente el “gating” permite a las plantas responder mejor a la gran variedad de estímulos presentes en el ambiente y también a responder sólo cuando es beneficioso.

Existen varios ejemplos de regulación por el reloj de las respuestas a estímulos del ambiente como la luz y la temperatura. Con respecto a la luz, la abundancia de PHY y CRY está controlada por el reloj, y esto puede resultar en un “gating” de la señal lumínica al reloj (Tóth *et al.*, 2001). Otro ejemplo es la expresión de CAB2 (chlorophyll a/b binding protein 2) que es regulada por la luz y el reloj, la intensidad del aumento de la expresión causado por la luz depende del momento del día en que el estímulo lumínico es aplicado (Millar & Kay, 1996). Posteriormente se vio que en mutantes nulos de *ELF3*, la intensidad de la respuesta de CAB2 a la luz es siempre similar a la respuesta máxima encontrada en las plantas de genotipo salvaje, por lo que *ELF3* actuaría reprimiendo esta vía de manera rítmica. (McWatters *et al.*, 2000).

En la naturaleza, las plantas están sometidas a ciclos de alternancia entre el día y la noche, que generan ciclos de luz-oscuridad y de alta-baja temperatura ambiente. De ese modo, podemos pensar que una plántula etiolada que está emergiendo del suelo recibe señales de cambios alternantes de temperatura antes de recibir luz. Incluso puede ser expuesta a temperaturas relativamente altas, debido a la carga de radiación solar en los estratos superiores del suelo. Se han estudiado los efectos de los ciclos de alternancia de temperatura ambiente como señales generadoras de ritmos circadianos, pero no se ha explorado la relación que puede existir entre estas señales y las generadas por la percepción lumínica. Sabemos que los ciclos de luz desencadenan el proceso de desetiología pero, si bien existe una íntima relación entre los ciclos de temperatura y los de alternancia de luz-oscuridad, no se han descrito aún los efectos fisiológicos de la combinación de ambas señales.

Proponemos estudiar el efecto de la combinación de las altas temperaturas con ciclos de luz sobre el proceso de desetiología en *Arabidopsis thaliana*. Esperamos que las temperaturas elevadas que pueden alcanzar los estratos superiores del suelo actúen como indicadores indirectos que anticipan en las plántulas etioladas la presencia de luz.

Inducción de la germinación

Las semillas fueron sembradas en cajas de acrílico transparente (40 mm x 33 mm x 15 mm) o cajas de Petri conteniendo una solución de agar-agua o agar-Murashige and Skoog (MS) según se indica en los apartados siguientes (imbibición). Luego fueron incubadas en oscuridad a 4 °C durante 4 días (estratificación). Terminada la estratificación se expuso a las semillas a un pulso de dos horas de luz roja, para sincronizar la germinación de las plántulas (día 0 de tratamiento), seguido de 24 horas de oscuridad a 22 °C.

Multiplicación del material vegetal

Para la multiplicación de semillas, se transplantaron las plántulas germinadas en agar-agua, a vasos plásticos de 250 cm³ con una mezcla de vermiculita, perlita y turba (2:2:1). Dependiendo de la época del año, las plantas fueron crecidas en invernáculos o en cámaras de luz blanca continua de 120 μmol/m²/s de irradiancia (tubos fluorescentes Philips TLD 15W/54). Las plantas fueron regadas durante todo su ciclo de vida con fertilizante *Hakaphos Rojo* 1g/L (Compo).

Tratamientos de luz y temperatura

La luz blanca fue provista por tubos fluorescentes Philips TLD 15W/54. La luz azul fue generada por la combinación de tubos fluorescentes y filtros de acrílico azul de 2 mm de espesor (Paolini 2031). La luz roja fue provista por la combinación de tubos fluorescentes con filtros de acetato rojo (*LEE Filters* N° 106), naranja (*LEE Filters* N° 105) y amarillo (*LEE Filters* N° 101). El rojo lejano continuo fue generado por una lámpara incandescente de 150 W (Philips R95) en combinación con un filtro de acetato rojo y seis filtros de acrílico azul Paolini 2031. Para el pulso de final del día de rojo lejano (EOD) fue utilizada una lámpara incandescente de 150 W (Philips R95) en combinación con un filtro RG9 (Schott, Mainz, W. Germany). Las distintas intensidades de luz fueron logradas agregando hojas de papel blanco de 75g/m² entre las fuentes de luz y las plántulas y/o variando la distancia entre ellas.

El manejo de las plántulas en condiciones de oscuridad se utilizó luz verde de baja irradiancia generada por tubos fluorescentes envueltos con hojas de acetato de color verde (*LEE Filters* N° 089). Estas condiciones de luz se consideran seguras, ya que tienen efectos despreciables en el desarrollo de las plántulas (Fankhauser & Casal, 2004).

Todos los experimentos fueron realizados en cámaras de cultivo con temperatura controlada y verificada con termómetro de mercurio. Para los cambios de temperatura las plantas fueron transferidas manualmente entre cámaras de temperaturas fijas.

Material Vegetal

En los experimentos realizados en esta tesis se utilizó como material vegetal plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia de los siguientes genotipos:

- Plantas de genotipo salvaje Columbia (Col 0 y Col 2)
- *phyB-9* (Reed *et al.*, 1993)
- *phyA-211* y *phyA-211 phyB-9* (Reed *et al.*, 1994)
- *cry1-304*, *cry2-1* y *cry1-304 cry2-1* (Guo *et al.*, 1999)
- *hy5-221* (Shin *et al.*, 2007)
- *pif3-1* (Cedido por el Dr. C. Fankhauser)
- *pif4-101* (Cedido por el Dr. C. Fankhauser)
- *pif3-1 pif4* (Cedido por el Dr. C. Fankhauser)
- *elf3-1* (Zagotta, *et al.*, 1996)
- *elf4-101* (Khanna, Kikis & Quail, 2003)
- *gi-2* (Fowler *et al.*, 1999)
- *toc1-101* (Kikis *et al.*, 2005)
- *prr3* (salk 090261)
- *prr5* (salk 006280)
- *prr7-3*, *prr9-1* y *prr7-3 prr9-1* (Farré *et al.*, 2005)
- Líneas transgénicas que expresan luciferasa bajo el control de las regiones promotoras de los genes *TOC1*, *CCR2*, *CCA1* o *CAB2* (Covington & Harmer, 2007)

También se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Wassilewskija de los genotipos:

- Plantas de genotipo salvaje WS
- *lhy-21*, *cca1-11* y *lhy-21 cca1-11* (Hall *et al.*, 2003)

Medición De Largo De Hipocotilo y Ángulo Entre Cotiledones

Se utilizaron cajas de acrílico transparente conteniendo 5 ml de agar-agua 0.8%. Se sembraron 16 semillas de cada genotipo por caja. Luego del pulso de luz roja dado en el día 0, las plántulas fueron expuestas a los distintos tratamientos lumínicos durante los tres días siguientes o mantenidas en oscuridad como control. El largo del hipocotilo se midió con regla con una precisión de 0,5 mm y el ángulo de apertura entre cotiledones se midió utilizando un transportador con una apreciación de 10°. Cada tratamiento se realizó por triplicado y de cada caja se midieron las 10 plántulas más altas, y el promedio de cada caja fue tomado como una repetición (Fankhauser & Casal, 2004). Cada experimento fue realizado como mínimo tres veces.

Medición De La Cinética De Elongación Del Hipocotilo

Para medir la cinética de la tasa de elongación del hipocotilo, la siembra de las semillas se realizó en horas de la tarde (18hs) brindando a las plántulas de una señal de sincronización (Salomé & McClung, 2008). Se colocaron 15 semillas alineadas en cajas de acrílico transparente conteniendo 5 ml de 1X Murashige and Skoog (MS, Sigma) 0.8% agar. Para cada tratamiento se sembraron al menos 6 réplicas. El pulso de luz roja del día cero fue dado en horas de la mañana (9hs). Luego, las cajas fueron colocadas verticalmente y mantenidas en esta posición hasta la finalización del experimento. Basándonos en los experimentos realizados por Dowson-Day & Millar (1999), se tomaron fotografías de las cajas, en condiciones de oscuridad, utilizando la cámara de 8 mega pixels (Canon *Power Shot*) a intervalos regulares de tiempo. Luego se utilizó un programa de procesamiento de imágenes (*Photoshop 7.0*) para superponer las fotografías y calcular el cambio de longitud del hipocotilo de cada plántula. Relativizando este valor al tiempo transcurrido entre dos fotografías sucesivas, se obtiene la tasa de elongación del hipocotilo expresada en mm/h. Cada dato corresponde al promedio de la medición de al menos 15 plántulas.

Esterilización De Semillas

La esterilización de las semillas se realizó mediante el método de fase-vapor cloro. Se eligió esta técnica ya que permite la esterilización superficial de las semillas sin hidratarlas, independizando este procedimiento del momento de imbibición. Para ello se incubaron entre 50-100 semillas por microtubo en un ambiente herméticamente cerrado que contiene un recipiente con la mezcla de 20 ml de agua lavandina concentrada (55g/L) y 10ml de HCl 1M. La acidez del medio produce la liberación de gas cloro a partir del hipoclorito. Las semillas se incubaron de 6 a 16 hs en presencia de gas cloro.

Extracción De ARN y Análisis De Microarreglos

Las semillas de genotipo WT Columbia fueron esterilizadas durante 16 horas. Al día siguiente fueron sembradas en placas de Petri conteniendo 25 ml de medio 1X Murashige and Skoog (MS, Sigma) con 1% de agar. Luego del pulso de luz roja en el día 0, un grupo de plántulas (ARN C+R) fueron tratadas durante tres días con un pulso de 37°C durante 90 min. Luego del pulso de 37°C del tercer día fueron expuestas a 6 horas de luz roja de 12 μ mol/m²/s. Mientras que otro grupo de plántulas (ARN R) sólo recibió un pulso de 6 horas de luz roja en el día 3. Cada tratamiento se realizó por

duplicado y las plántulas fueron cosechadas en condiciones de oscuridad, en nitrógeno líquido justo después de finalizado el pulso de luz roja del día 3. La extracción del ARN total se realizó utilizando el kit *RNeasy Miniprep* (Quiagen). 5 µg de ARN de cada muestra fueron procesados según el protocolo del *Gene Chip Expression Analysis* (Affymetrix) y utilizados para hibridar los microchips *ATH1* (Affymetrix) que contienen oligonucleótidos de ADN que representan aproximadamente 24000 genes diferentes del genoma de *Arabidopsis thaliana*. Este procedimiento y la hibridación fueron realizados por el servicio *Affymetrix* de IFEVA. Para analizar el efecto del tratamiento se realizó un análisis de varianza y se seleccionaron aquellos genes que presentaron un valor de p menor a 0.05. Luego se calcularon los coeficientes de los valores de expresión para cada gen entre los tratamientos, y se seleccionaron los genes que presentaban una diferencia de expresión entre tratamientos de tres veces o más. Las anotaciones de los genes fueron actualizadas utilizando los recursos disponibles en la página web del TAIR (www.arabidopsis.org, <ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Microarrays/Affymetrix/>).

Extracción De ARN y Cuantificación De Mensajeros Por PCR cuantitativa (PCRq)

Se esterilizaron superficialmente semillas de WT (Columbia) y de doble mutante nulo *prp7 prp9* durante 16 horas con el método de fase-vapor. Al día siguiente fueron sembradas en placas de Petri conteniendo 25 ml de medio 1X Murashige and Skoog (MS, Sigma) con 1% de agar. Luego del pulso de luz roja en el día 0, se realizaron los tratamientos. Las plántulas fueron mantenidas en oscuridad y un grupo de plántulas (C) fueron tratadas durante tres días con un pulso de 37°C durante 90 minutos y otro grupo control permaneció a 22°C. Se cosecharon plántulas, en condiciones de oscuridad, cada 3 horas durante 48 horas comenzando a la hora de finalización del pulso de 37°C del tercer día de tratamiento. Las muestras se tomaron por triplicado. El ARN total se extrajo utilizando el kit *NucleoSpin RNA Plant* (Macherey-Nagel). Para la síntesis de ADNc se utilizó la transcriptasa reversa *SuperScript III* (Invitrogen) con oligo-dT (18 nucleótidos T) como cebador y 2 µg de ARN por reacción. El volumen total de la reacción obtenida (20 µl), se diluyó 5 veces (volumen final 100 µl). La PCRq se realizó con *FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)* (Roche) utilizando 2 µl de la dilución de cDNA por reacción. La amplificación se llevó a cabo utilizando el siguiente programa:

Paso 1: 1 ciclo 95°C 10min
Paso 2: 40 ciclos 95°C 15seg
 Tm °C 1min

Dado que el *SYBR Green* produce fluorescencia al unirse a moléculas de ADN doble cadena, pero de manera inespecífica a la secuencia, parte de la fluorescencia emitida puede corresponder a productos de amplificación inespecífica, o a dimerizaciones entre primers. Para verificar que el total de la fluorescencia emitida corresponde al producto de amplificación esperado, luego de la amplificación se realizó una reacción de disociación, mediante la cual se obtiene el valor de la temperatura de disociación del amplicón. La reacción de disociación se llevó a cabo utilizando el siguiente programa:

1 ciclo 95°C 15seg
 Tm °C 1min
 95°C 15seg

La reacción de PCR y la cuantificación de la fluorescencia fueron realizadas con un equipo *ABI 7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Para cada punto se midieron tres muestras independientes. De cada muestra se realizaron dos réplicas técnicas, y el promedio de estos dos valores se tomaron como una repetición. Los datos de expresión de los genes de cada muestra fueron relativizados al nivel de expresión del gen *PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A)* (Czechowski et al., 2005). Los primers utilizados y las condiciones de la reacción de PCR y se enumeran en la tabla 1.

Mediciones De Actividad Luciferasa

Las semillas fueron esterilizadas superficialmente durante 16 h con el método de fase-vapor y en la tarde del día siguiente (a las 18 h) fueron sembradas en placas de 96 pocillos (Berthold 96-clear bottom) que contenían 200 µl de MS 1% sacarosa, 0.8% agar. Luego fueron mantenidas en oscuridad a 4 °C durante 4 días. Por la mañana (a las 9 h) se las expuso a un pulso de luz roja de dos horas, para sincronizar la germinación. Al día siguiente comenzaron los distintos tratamientos, y 24 horas antes de comenzar con la medición se agregó a cada pocillo 50 µl de luciferina 0.5mM. Las mediciones de LUC se realizaron en un luminómetro *Centro LB 960* (Berthold) a intervalos de una hora y en condiciones constantes de oscuridad a 22 °C. Los valores

de actividad de luciferasa para cada plántula en cada hora fueron relativizados a la mediana de la actividad de luciferasa que presentó cada plántula, por lo que se presenta los datos como “actividad luciferasa normalizada”, y cada dato es el promedio de los valores obtenidos para un mínimo de 60 plántulas que corresponden a tres experimentos independientes.

Tabla 1. Secuencias de los primers y condiciones utilizadas para las reacciones de Real Time PCR

Gen	FW/RV	Secuencia	Concentración Final (μM)	Tm ($^{\circ}\text{C}$)	Amplificación (pb)
CCA1 AT2G46830	FW	CCAGATAAGAAGTCACGCTCAGAA	0,5	56	88
	RV	GTCTAGCGCTTGACCCATAGCT			
ELF3 AT2G25930	FW	CATTCGCAGCCGTTGATGAGG	0,25	60	83
	RV	TGTTCTTGTCGTCGTTGTGGTTG			
Gi AT1G22770	FW	CTATGTCTATGAGGGCAGGTGTTG	0,5	60	100
	RV	ACTTGACTTAGCGGAGGAAAAAGC			
LHY AT1G01060	FW	GACTCAAACACTGCCAGAAGA	0,2	60	76
	RV	CGTCACTCCCTGAAGGTGTATTT			
PIF3 AT1G09530	FW	TGATGTGTCGTCTCCTGTTACTGTC	0,5	60	55
	RV	GTTTACCGCCATATCACTCTCTTGC			
PIF4 AT2G43010	FW	ACTTCTCCTCCCACTTCTTCTCAAC	0,5	60	75
	RV	TGGACTTAGGCTTAACCGTCTCTG			
PIF5 AT3G59060	FW	GAACCTGGCAAGAAGAACCTTAGC	0,5	60	77
	RV	AGTTGAAACAGAACAGTAACACAGAGAG			
PP2A AT1G13320	FW	TAACGTGGCCAAAATGATGC	0,5	60	61
	RV	GTTCTCCACAAC^CGCTTGGT			
PRR7 AT5G02810	FW	CTAACCCCTGAGTTTCCAAGTAATC	0,25	60	94
	RV	CCCATTGTGACATCTTCAAATT			
PRR9 AT2G46790	FW	GCCAGAGAGAAGCTGCATTGA	0,5	60	83
	RV	CCTGCTCTGGTACCGAACCTT			
TOC AT5G61380	FW	TCTTCGCAGAATCCCTGTGAT	0,25	60	81
	RV	GCTGCACCTAGCTTCAAGCA			
ZTL AT5G57360	FW	GGAGTAGCACCACCACCAAGG	0,5	60	78
	RV	TGAGCCGCCAAATATCAAGATTCTG			

I. Caracterización Fisiológica Del Efecto Sinérgico Entre La Luz Y La Temperatura Elevada

Diseño experimental para estudiar la interacción entre la temperatura y la luz sobre la desetiología

Se diseñó un protocolo para estudiar el proceso de desetiología en condiciones que combinaran la exposición a luz de baja irradiancia con la exposición a temperatura elevada. La aproximación consiste en un tratamiento diario con pulsos cortos de temperatura elevada, seguidos por un fotoperíodo corto de irradiancia baja. Basándonos en estudios realizados por Hong y Vierling (2000) que indican que una exposición de 120 min. a 38 °C aumenta la resistencia al estrés por calor (aclimatación) y por datos de Binelli y Mascarenhas (1990) que demuestran que plantas tratadas a 37 °C no presentan signos marcados de estrés; se definió el pulso de alta temperatura como de 37 °C durante 90 minutos (Fig. 3).

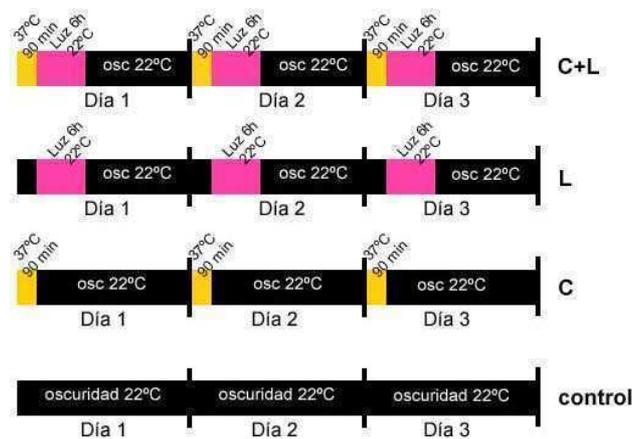


Figura 3. Diseño experimental utilizado para estudiar el efecto de la combinación de la exposición a alta temperatura transitoria y luz.

Caracterizaciones fisiológicas primarias

Plántulas de *Arabidopsis thaliana* fueron sometidas al protocolo descrito de la figura 3. Se encontró que la combinación del pulso de 37 °C y 6 horas de luz blanca de 12 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (C+L) aumentaba la inhibición del alargamiento del hipocotilo, comparado con el control, expuesto a luz pero no al pulso de alta temperatura (L); en tanto que el pulso de calor en ausencia de luz (C) no presentaba diferencias con el control de oscuridad (control) (Fig. 4A y 4B).

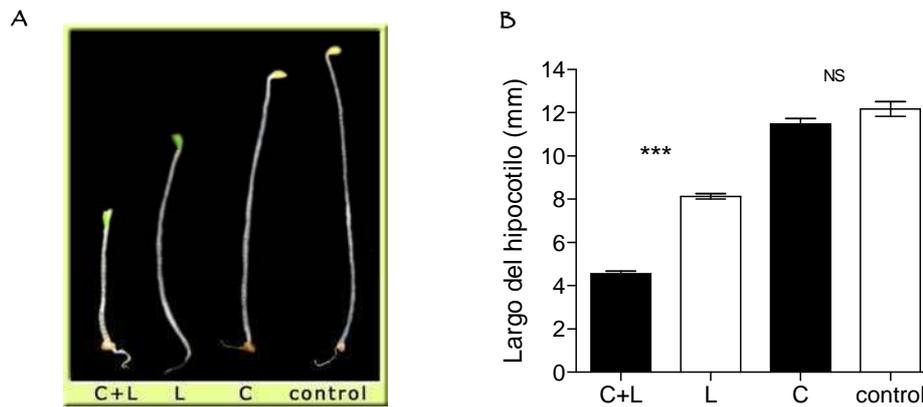


Figura 4. La combinación de pulsos diarios de alta temperatura y luz promueve la desetiología. A) Fotografía de plántulas sometidas a los tratamientos C+L, L C y control. B) Largo del hipocotilo obtenido en los distintos tratamientos, utilizando $12 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de luz blanca. Los datos son el promedio y EE de un mínimo de 9 réplicas. Como análisis estadístico se realizó el test de Bonferroni donde ***= a $p < 0.001$ y NS= no significativo.

Para estudiar si esta interacción dependía del flujo de luz, se realizaron mediciones del largo del hipocotilo en plántulas expuestas durante tres días al pulso de calor previamente descrito, seguido de 6 horas con distintas irradiancias de luz blanca a 20°C . Se observó que el efecto de las altas temperaturas incrementaba con la irradiancia entre 0.7 y $12 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, pero a radiaciones más altas el efecto decaía (Fig. 5A).

Trabajando con 6 h de luz blanca de $12 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de irradiancia se realizó una curva de respuesta a pulsos de 90 min. de temperaturas entre 15 y 40°C (Fig. 5B). Pudo comprobarse que el efecto promotor de la desetiología producido por la combinación del pulso de calor y la luz aumentaba con el aumento de temperatura, alcanzando su máximo a 37°C . También, se estudió el efecto de las distintas temperaturas mantenidas de modo constante entre 15 y 30°C sobre el proceso de desetiología de plántulas expuestas diariamente a seis horas de luz blanca (Fig. 5C). A diferencia de la promoción de la desetiología por altas temperaturas transitorias y, como han descrito otros autores (Gray *et al.*, 1998; Koini *et al.*, 2009), la exposición continua a temperaturas elevadas produce un aumento del alargamiento de los hipocotilos con respecto a la oscuridad. Por lo tanto, la mayor inhibición del alargamiento del hipocotilo causado por la luz es una respuesta específica a los pulsos cortos de temperaturas elevadas, y un nuevo fenómeno fisiológico del desarrollo temprano de las plantas.

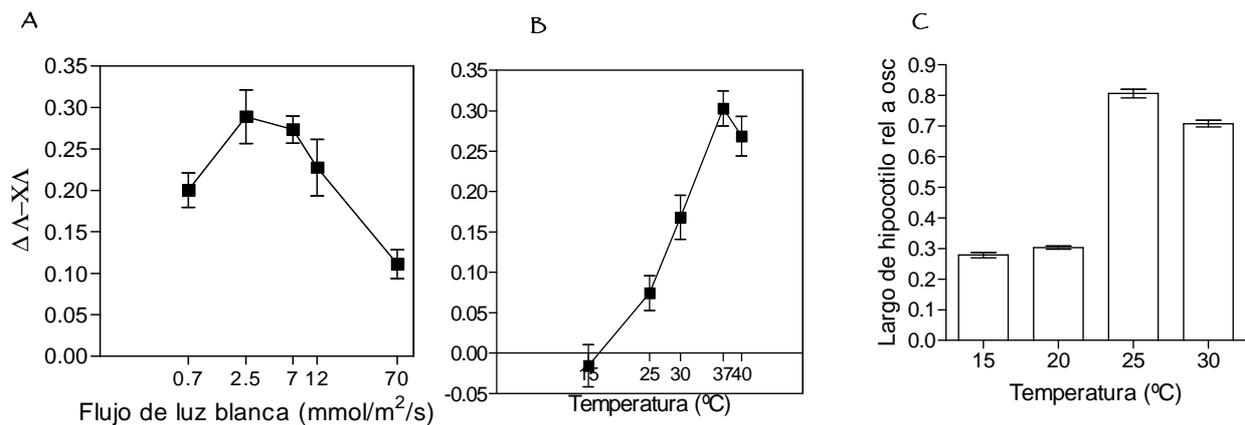


Figura 5. Caracterización primaria de la respuesta sinérgica entre alta temperatura y luz. A) Curva de respuesta a distintos flujos de luz blanca. $\Delta L-CL$ representa el efecto del pulso de alta temperatura, calculado como la diferencia entre el valor de largo de hipocotilo relativo en L y el valor relativo en C+L. B) Curva de respuesta a pulsos de distinta temperatura combinado con 6 horas de luz blanca a $12 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. C) Largo de hipocotilo relativo a oscuridad causado por la exposición diaria a 6 horas de luz blanca de $12 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a distintas temperaturas. Los datos son el promedio y EE de un mínimo de 9 réplicas.

Identificación de algunos componentes involucrados

Una vez definido el tratamiento y caracterizada la respuesta de promoción de la desetiología, se estudió el efecto del pulso de alta temperatura combinado con distintas calidades de luz, encontrando una inhibición significativa del alargamiento del hipocotilo tanto bajo luz roja, roja lejana o azul (Fig. 6A). Para identificar algunos componentes de la vía de transducción de señales involucrados en esta respuesta, se utilizaron mutantes nulos de los principales fotorreceptores y de *HY5*, un gen integrador de las señales de distintos fotorreceptores durante la fotomorfogénesis. Tanto los mutantes de *cry1* y *cry2* como el mutante de *phyA* presentaron un patrón similar a los descriptos para las plantas de genotipo salvaje. En cambio, en los mutantes de *phyB* y *HY5* el efecto de promoción de la desetiología por la temperatura fue ausente (Fig. 6B). Se realizaron curvas de respuesta a flujos de luz blanca para los mutantes nulos *phyA*, *phyB*, *cry1*, *cry2* y *hy5*, en estas puede observarse nuevamente que los mutantes *phyB* y *hy5* presentan ausencia de la respuesta descrita en el genotipo salvaje, en tanto los mutantes nulos de otros fotorreceptores no presentan mayores diferencias con respecto de las plántulas de genotipo salvaje (Fig. 7).

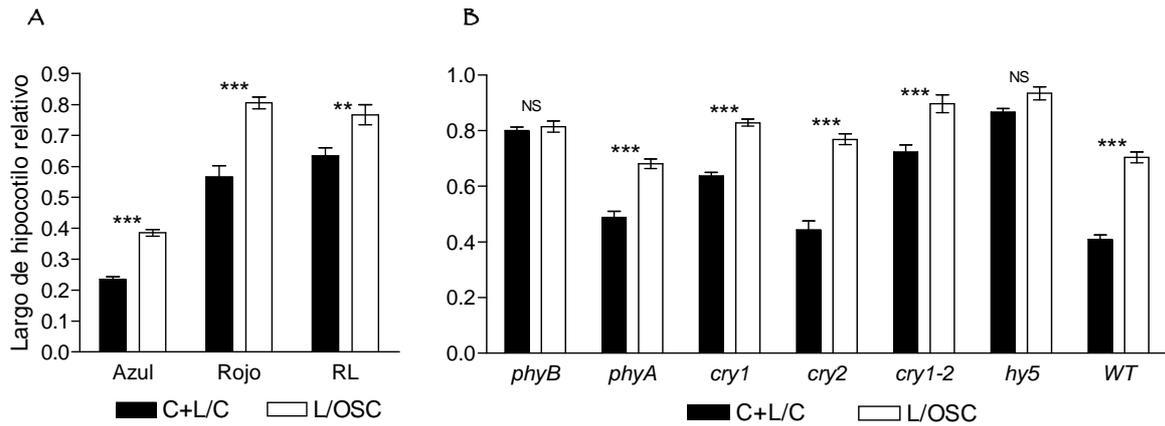


Figura 6. El efecto promotor de la desetiología por un pulso de 37 °C se manifiesta bajo distintas calidades de luz pero no en ausencia de *phyB* o *HY5*. A) Largo de hipocotilo relativo en los tratamientos combinados utilizando 6 h de luz azul, roja, o roja lejana (RL) de 12 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. B) Largo de hipocotilo relativo para varios mutantes nulos y genotipo salvaje (WT) utilizando 6 horas de luz blanca de 12 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Los datos son el promedio y EE de un mínimo de 9 réplicas. Como análisis estadístico se realizó el test de Bonferroni donde ***= a $p < 0.001$, ** = a $p < 0.01$ y NS= no significativo.

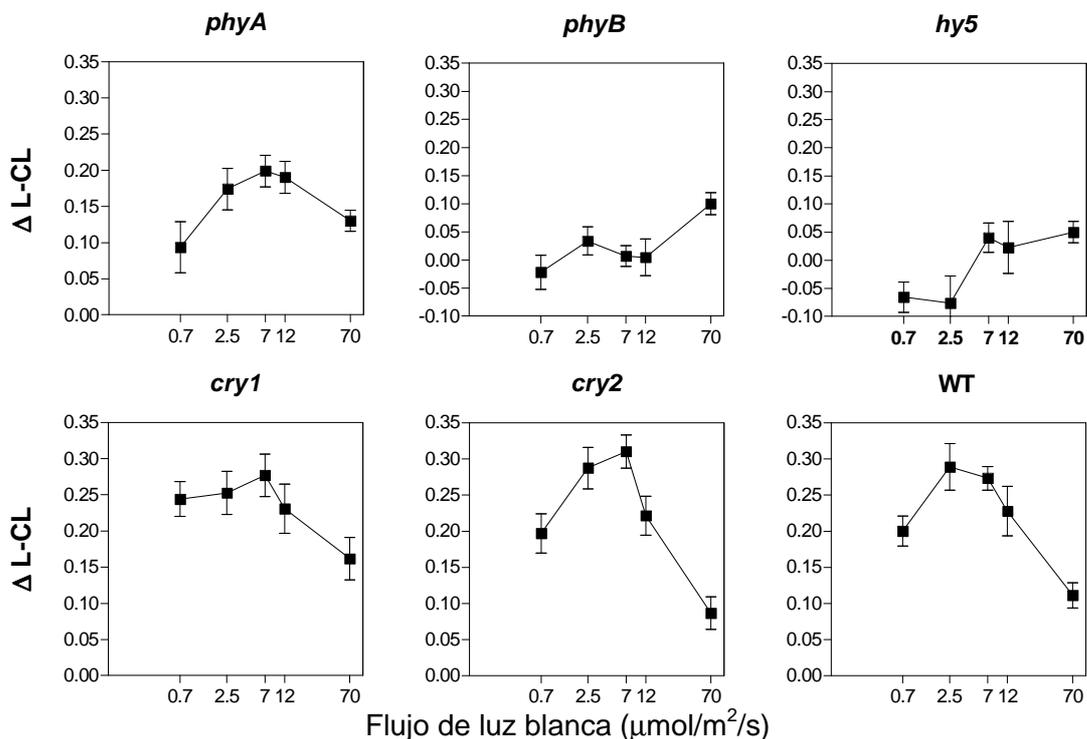


Figura 7. La interacción entre luz y pulsos de alta temperatura requiere *phyB* y *HY5*. Curva de respuesta a distintos flujos de luz blanca para varios mutantes nulos y WT. Los datos son el promedio y EE de un mínimo de 9 réplicas.

Para evaluar la acción de los fitocromos en más detalle se utilizaron los mutantes simples y doble de *phyA* y *phyB* en un tratamiento combinado con luz roja. Bajo estas condiciones, las plantas de genotipo salvaje tratadas con la combinación de alta temperatura y luz roja (C+R) no sólo manifiestan una mayor inhibición del alargamiento del hipocotilo sino también, un incremento en el ángulo de apertura de cotiledones (Fig. 8B). Este aumento de la magnitud de la respuesta de desetiología no se observa cuando *phyB* se encuentra ausente (mutante *phyB*), de esta manera se concluye que el potenciamiento de la desetiología causado por la combinación de los pulsos de alta temperatura y baja irradiancia de luz depende de la presencia de *phyB* (Fig. 8A).

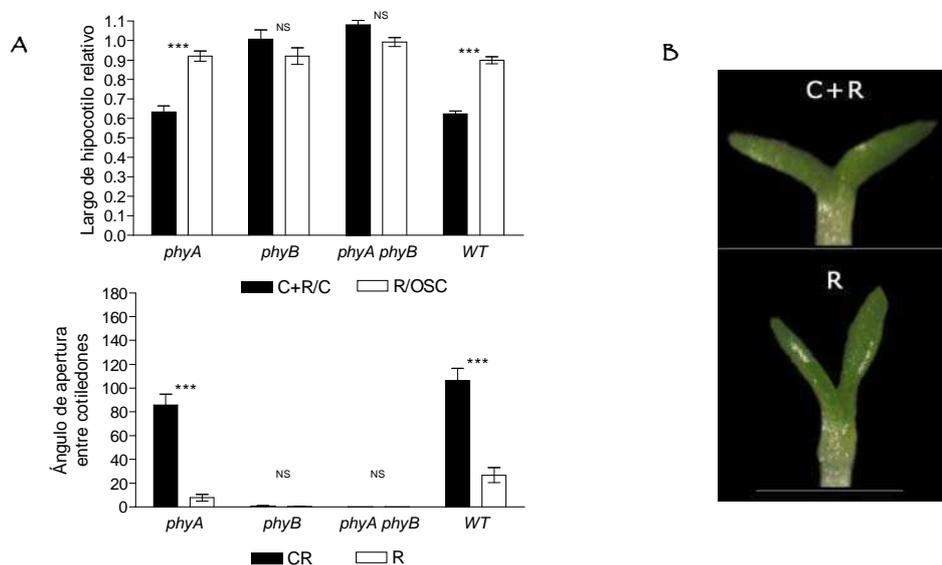


Figura 8. La promoción de la desetiología causada por el pulso de alta temperatura depende de la presencia de *phyB*. A) Largo de hipocotilo y ángulo de apertura entre cotiledones en plántulas de genotipo salvaje y mutantes nulos de *phyA* y *phyB*. B) Fotografías que ilustran el efecto promotor sobre la desetiología (en el ángulo de apertura entre cotiledones) causado por el suplemento de temperatura elevada transitoria. A y B realizados bajo tratamientos de alta temperatura combinados con 6 horas de luz roja de $12 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Los datos son el promedio y EE de un mínimo de 9 réplicas. Como análisis estadístico se realizó el test de Bonferroni donde ***= a $p < 0.001$, ** = a $p < 0.01$ y NS= no significativo.

Para intentar identificar algunos de los componentes involucrados en la transducción de señales que llevan a la manifestación de la respuesta observada, se estudió el fenotipo de algunos mutantes nulos de genes que participan en la vía de señalización de *phyB*. Se encontró que el potenciamiento de la desetiología por los pulsos de calor está ausente en varios de estos mutantes indicando que genes como *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3* y *4* (*PIF3* y *PIF4*), *EARLY FLOWERING*

3 (*ELF3*) y *GIGANTEA* (*GI*), son necesarios para la respuesta a las altas temperaturas. Por el contrario, el mutante *elf4* no mostró efectos significativos en relación al genotipo salvaje (Fig. 9).

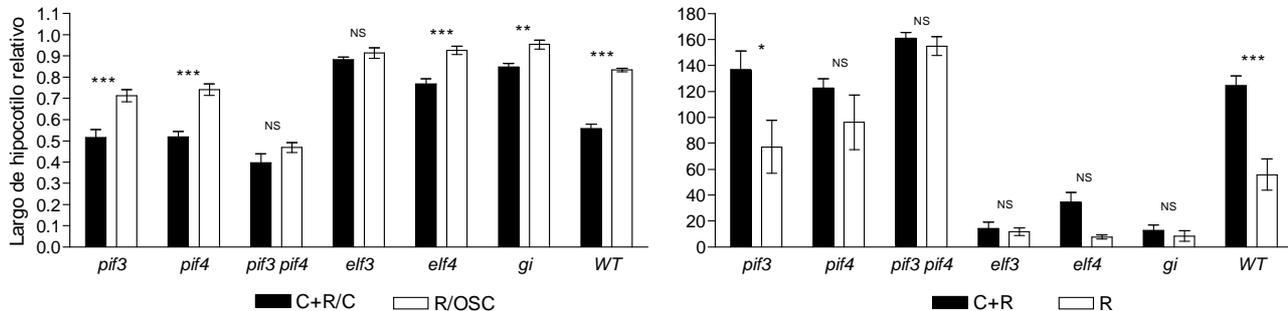


Figura 9. El efecto sinérgico sobre la desetiología depende de la presencia de genes involucrados en la vía de señalización iniciada por phyB. Largo de hipocotilo y ángulo de apertura entre cotiledones en plántulas de genotipo salvaje y mutantes nulos de genes de la vía de señalización de phyB. Los tratamientos fueron realizados combinados con 6 horas de luz roja de 12 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Los datos son el promedio y EE de un mínimo de 9 réplicas. Como análisis estadístico se realizó el test de Bonferroni donde ***= a $p < 0.001$, ** = a $p < 0.01$ y NS= no significativo.

Efectos sobre la cinética del alargamiento del hipocotilo

En experimentos posteriores se estudió la cinética de la respuesta de la tasa de crecimiento del hipocotilo. Se utilizó una variación del protocolo utilizado anteriormente que consistió en la exposición al pulso de alta temperatura durante tres días en los tratamientos C+R y C, pero el pulso de luz roja se dio únicamente en el tercer día en C+R y R, mientras que el control permaneció en oscuridad a 22 °C (control). Midiendo la tasa de alargamiento durante 6 horas en que las plántulas fueron expuestas a luz roja no se observaron efectos significativos de la luz o de la exposición previa en altas temperaturas (Fig. 10A). En cambio, la tasa de elongación durante el período de oscuridad que siguió a las 6 horas de luz roja (18 horas), presenta una inhibición leve en las plántulas que fueron tratadas sólo con luz roja, y una inhibición mucho más marcada en las plántulas tratadas con alta temperatura. Esto indica que las diferencias observadas en el largo del hipocotilo entre los tratamientos C+R y R (Fig. 8) se debe al decremento tardío en la tasa de elongación del hipocotilo causado por el suplemento de alta temperatura (C+R).

Cabe preguntarse si este decremento se observa durante las 18 horas posteriores a la exposición a la luz, debido a que es necesario un período de oscuridad, o a que el efecto causado por la temperatura elevada y la luz se manifiesta de forma retrasada. Para definir entre estas alternativas se realizó un experimento

similar, midiendo la tasa de elongación del hipocotilo durante las 18 horas siguientes al pulso de 6 horas de luz roja, pero, durante ese período las plántulas fueron sometidas a distintos flujos de luz roja. Así pudo comprobarse que un período de oscuridad no es excluyente para la manifestación de la respuesta sinérgica, ya que las plántulas expuestas de manera constante a luz roja, presentan valores similares (Fig. 10B). Incluso, no se observaron efectos de los distintos flujos de luz roja sobre la tasa de elongación del hipocotilo.

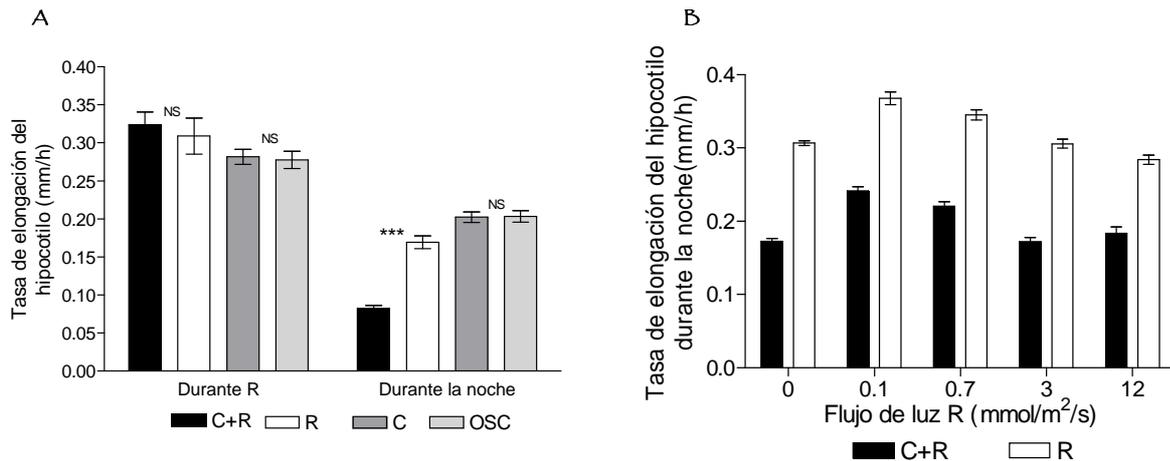


Figura 10. El efecto de la combinación de alta temperatura y luz roja sobre la tasa de elongación del hipocotilo no depende de un período de oscuridad. A) Tasa de elongación del hipocotilo durante el pulso de 6 horas de luz roja (durante R), y durante 18 horas siguientes (durante la noche). B) Tasa de elongación del hipocotilo “durante la noche” en condiciones de luz continua de distintos flujos de luz roja. Los datos son el promedio y EE de un mínimo de 12 réplicas. Como análisis estadístico se realizó el test de Bonferroni donde ***= a $p < 0.001$, ** = a $p < 0.01$ y NS= no significativo.

Relación entre el efecto sinérgico y el phyB biológicamente activo

Utilizando este tipo de experimentos pudo comprobarse que la presencia de phyB en su forma activa (Pfr) resulta necesaria para la manifestación de la inhibición del alargamiento causado por el sinergismo entre alta temperatura y luz. En efecto, si se adiciona un pulso de rojo lejano al final de las 6 horas de luz roja (EOD), para revertir en alta proporción el Pfr a su forma biológicamente inactiva (Pr), el efecto de la combinación de alta temperatura y luz casi desaparece (Fig. 11A). Además, se estudió en qué medida el efecto sinérgico se correlaciona con la cantidad de phyB activo. Para ello se midieron las tasas de elongación durante la noche de plántulas que luego de las 6 h de luz roja quedaron expuestas a flujos específicos de luz roja lejana, que establecen distintos niveles de Pfr. Para evitar confundir los efectos sobre la elongación producidos por la acción de la luz rojo lejana continua percibida por phyA,

estos experimentos se realizaron con el mutante nulo de *phyA*. Los resultados muestran un incremento del efecto sobre la tasa de elongación que se corresponde con los niveles crecientes de Pfr (Fig. 11B). Esto indica que el efecto sinérgico producido por la combinación de alta temperatura y luz depende cuantitativamente de la presencia de *phyB* en su forma activa.

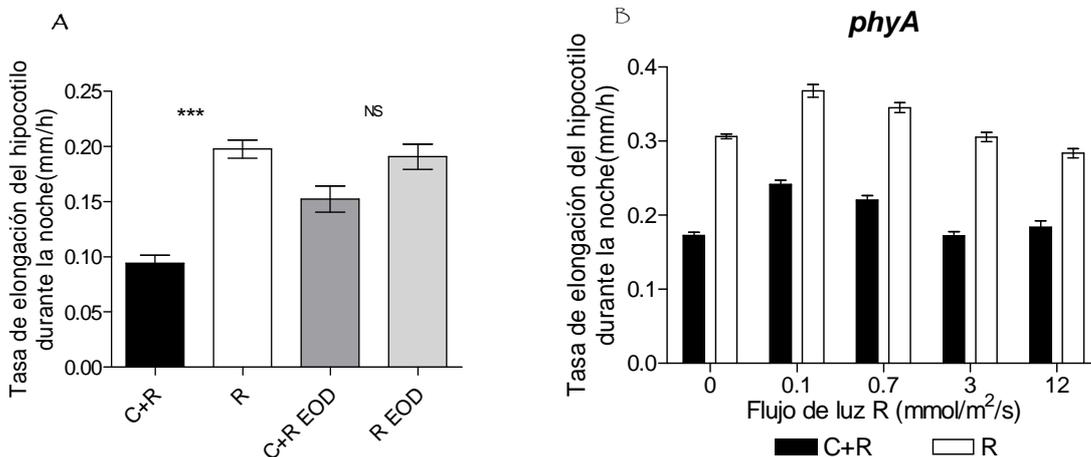


Figura 11. La tasa de elongación del hipocotilo disminuye por la combinación de alta temperatura y luz roja de forma dependiente a la presencia de PfrphyB. A) Tasa de elongación del hipocotilo durante la noche en experimentos de EOD. B) Tasa de elongación del hipocotilo durante la noche en condiciones de luz roja lejana que establecen distintos porcentajes de PfrPhyB. Los datos son el promedio y EE de un mínimo de 12 réplicas. Como análisis estadístico se realizó el test de Bonferroni donde ***= a $p < 0.001$, ** = a $p < 0.01$ y NS= no significativo

II. Estudio De Los Cambios En La Expresión Génica Causados Por La Interacción Entre El Calor Y La Luz

Para indagar en los posibles genes involucrados en la respuesta de promoción de la desetiología por pulsos de alta temperatura, se decidió realizar un estudio global de los cambios del transcriptoma bajo las condiciones descritas. Para ello, microarreglos ATH1 Affymetrix fueron hibridados con el ARN extraído de dos grupos de plántulas tratadas como lo muestra el esquema de la figura 12. Un grupo de plántulas (ARN C+R) fueron tratadas durante tres días con un pulso de 37 °C durante 90 min. Luego del pulso de 37 °C del tercer día fueron expuestas a 6 horas de luz roja de 12 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. En cambio, otro grupo de plántulas (ARN R) sólo recibió un pulso de 6 horas de luz roja en el día 3.

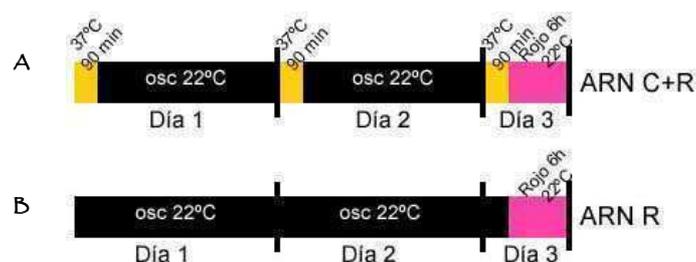


Figura 12. Representación de los tratamientos utilizados para la realización de microarreglos.

A) Las muestras correspondientes al tratamiento combinado de luz y alta temperatura (ARN C+R) provienen de plántulas sometidas durante tres días a un pulso de 37 °C de 90 min. de duración, seguido el tercer día por 6 horas de luz roja de 12 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. B) Las muestras que corresponden al tratamiento control (ARN R) sólo fueron expuestas al pulso de 6 horas de luz roja de 12 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ el tercer día.

Análisis de los cambios globales en el transcriptoma

Como primer paso se analizó la expresión de aquellos genes cuyos mutantes no presentaban amplificación de la respuesta a la luz por la temperatura elevada, es decir *HY5*, *PIF3*, *PIF4*, *ELF3*, *ELF4* y *GI*. Sólo *ELF4* y *GI* mostraron diferencias significativas estadísticamente (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de expresión obtenidos para los genes cuyos mutantes nulos pierden la respuesta de promoción de desetiología causada por la temperatura elevada

Gen	C+R		R		valor p
	Media	±SD	Media	±SD	
<i>HY5</i>	69,6	12,5865	46,45	11,38442	0,194307
<i>PIF3</i>	166,7	13,71787	142,3	35,49676	0,460259
<i>PIF4</i>	208,25	11,243	173,1	16,82914	0,133457
<i>ELF3</i>	375,55	11,52584	320,55	43,34565	0,225172
<i>ELF4</i>	261,1	18,38478	97,75	30,33488	0,022842
<i>GI</i>	457,7	14,00071	337,45	35,42605	0,046721

El conjunto de los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente de manera más global seleccionando solamente aquellos genes que presentaban diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). Se encontró una porción mayor de genes cuya expresión se encuentra aumentada, más de tres veces, en el tratamiento C+R (55 genes), y una porción menor de genes cuya expresión se encuentra aumentada, más de tres veces, en el tratamiento R (16 genes) (Anexo, Tabla 1). Como era de esperar, algunos de los genes con niveles mayores de expresión en C+R (14,77%) son genes de respuesta a la temperatura elevada. En

cambio, dado que ambos tratamientos tuvieron condiciones lumínicas idénticas, se destaca que el 10,2 % de los genes que aumentan la expresión en C+R sean genes de respuesta a luz de alta irradiancia. Analizando el grupo total de genes que cambian más de tres veces su expresión con respecto al tratamiento, se identificaron genes relacionados a la vía de transducción de señales iniciada por luz roja (como *LHY*, *ELF4*, *PRR9* o *ELIP2*). Además, se encontró que más de la mitad de los genes con expresión diferencial entre tratamientos (53,5%) presentan patrones de expresión rítmicos a largo del día (“diurnal”, <http://diurnal.cgrb.oregonstate.edu/>), y que del total de genes involucrados en el control de ritmos circadianos (según base de datos en TAIR, www.arabidopsis.org) el 7.69 % se encuentran representados.

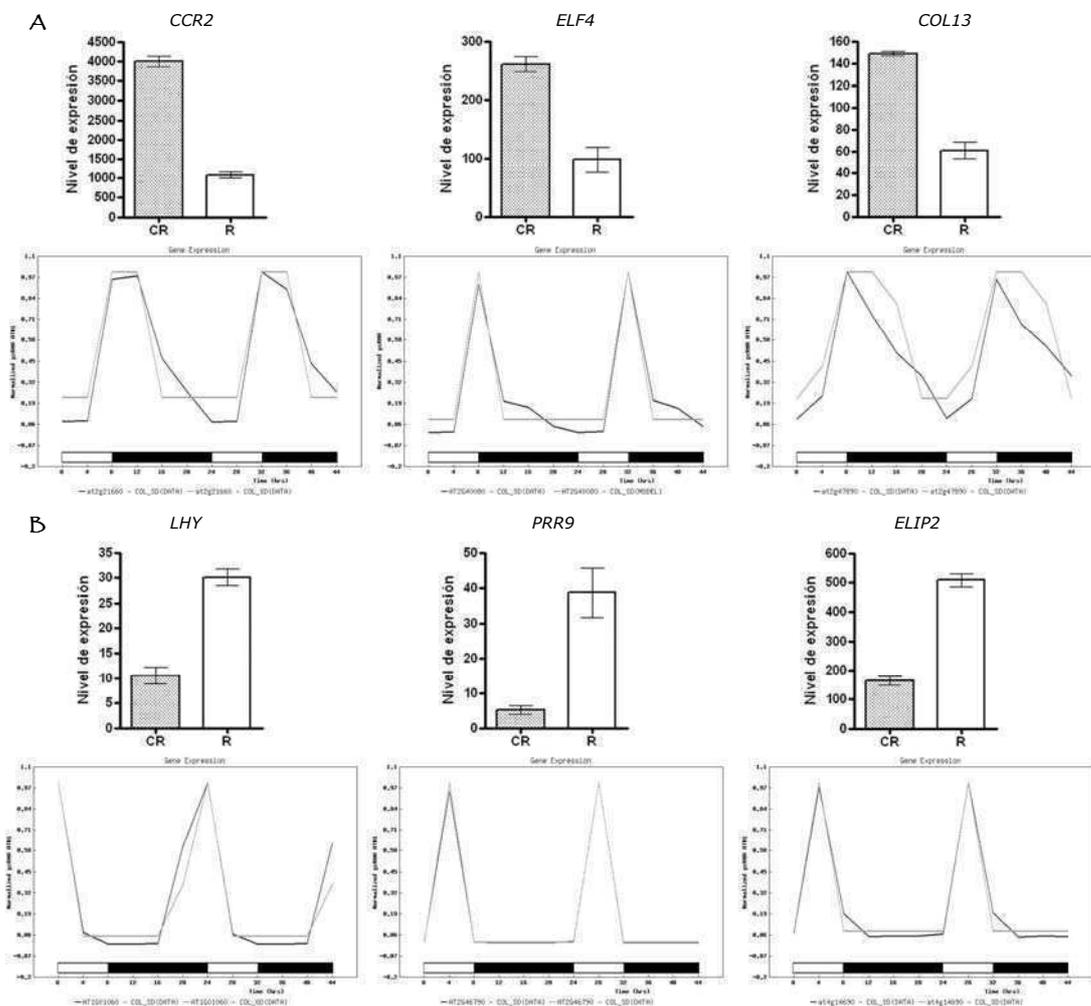


Figura 13. Algunos genes representativos del análisis de los datos obtenidos en los microarreglos. Los gráficos de barras muestran los valores de expresión obtenidos en los microarreglos en ambos tratamientos C+R y R. Las curvas en los gráficos que se encuentran debajo corresponden al patrón de expresión bajo condiciones de día corto: 8-h-luz/16-h-oscuridad (representado con la barra blanca y negra) obtenidas de la base de datos “diurnal”. A) Genes con niveles de expresión mayores en CR. B) Genes con niveles de expresión mayores en R. Los datos son el promedio y EE de 2 réplicas.

Análisis de fase de los genes con expresión diferencial

Se analizó el grupo total de genes diferencialmente expresados con una herramienta web que permite buscar y visualizar el perfil de expresión de genes del transcriptoma de *Arabidopsis thaliana* a lo largo del día (“diurnal”, <http://diurnal.cgrb.oregonstate.edu/>). En los genes que presentan un incremento del nivel de expresión de más de tres veces en C+R comparado con R se encontró una sobre-representación (32,1%) de genes que se expresan al final del día (8-h-luz/16-h-oscuridad), como *CCR2*, *ELF4* y *COL13* (Fig. 13A). En cambio en los genes que aumentan su nivel de expresión más de tres veces en R comparado con C+R, se encuentran sobre-representados (62,5%) genes que tienen un pico de expresión en horas tempranas del día como *LHY*, *PRR9* y *ELIP2* (Fig. 13B).

Sobre la base de estos resultados surge la hipótesis que el pulso de alta temperatura podría causar una sincronización del reloj. Otros autores han visto una mayor sincronización de fase en la expresión de genes del reloj biológico de *Arabidopsis* cuando se entrena a las plántulas etioladas con ciclos de temperatura alternante (Salomé, Xie & McClung, 2008). Entonces, el pulso de 37 °C utilizado aquí, a pesar de ser mucho más corto que los intervalos de alta temperatura utilizados en los patrones de temperaturas alternadas, podría funcionar como una señal que marca el comienzo del día, sincronizando el reloj y el ritmo de expresión de los genes, en el tratamiento C+R. Por lo tanto, la diferencia de expresión de genes encontrada entre los tratamientos C+R y R resultaría de un defasaje de la oscilación de los genes entre los tratamientos. De ser esta hipótesis cierta, sería de esperar que este defasaje en la expresión génica se tradujera en un defasaje del ritmo circadiano de las plántulas.

Relación de algunos componentes del reloj biológico con el efecto sinérgico entre la luz y los pulsos breves de temperatura elevada

Dada la fuerte incidencia de genes con ritmos circadianos de expresión en los resultados de análisis de los microarreglos, se estudió la respuesta de desetiología bajo el protocolo que combina los pulsos de alta temperatura con luz roja, en varios mutantes nulos de genes que componen el reloj biológico (Fig. 14). Se encontró que la ausencia de genes como *LHY*, *CCA1*, *TOC1*, *PRR7* o *PRR9* causa la pérdida del efecto promotor de la desetiología por el suplemento de alta temperatura. En cambio la ausencia de otros genes relacionados como *PRR3*, *PRR5*, *CONSTANS*, o *FLC* no causan alteraciones en el fenotipo comparado con las plántulas de genotipo salvaje.

Esto sugiere que algunos circuitos autorregulados del reloj biológico estarían involucrados en la manifestación de la respuesta sinérgica entre la temperatura elevada y la luz, mientras que otros aparentemente no lo estarían.

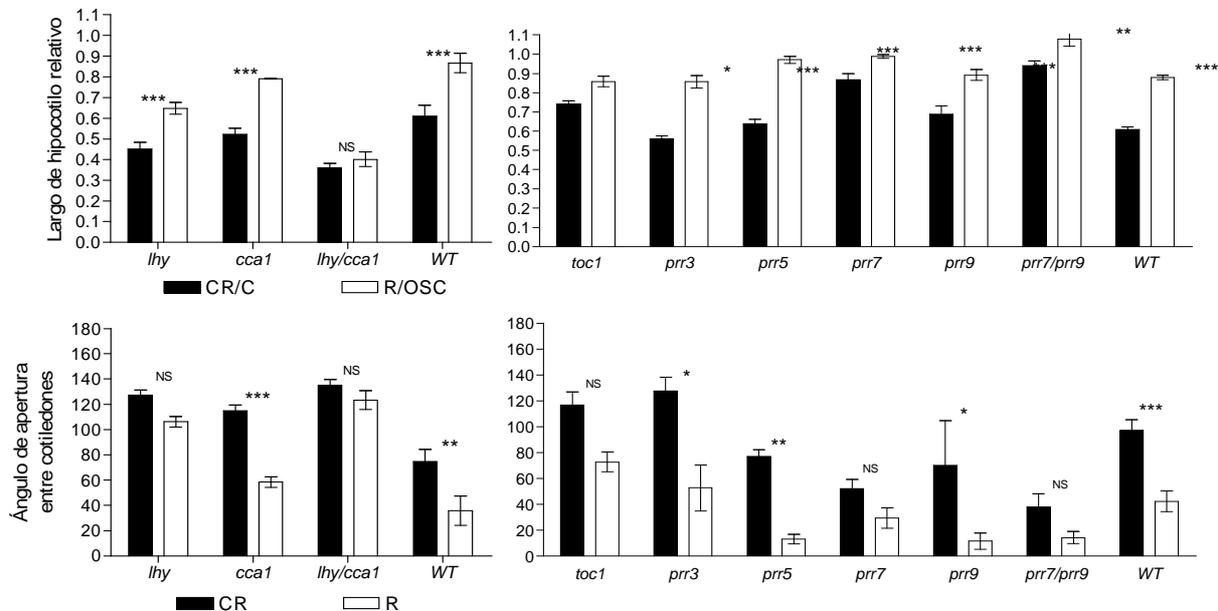


Figura 14. Ciertos componentes del reloj biológico de *Arabidopsis* son necesarios para la manifestación del efecto promotor de la desetiología por las altas temperaturas. Mediciones realizadas bajo tratamientos de alta temperatura combinados con 6 horas de luz roja de $12 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Los datos son el promedio y EE de un mínimo de 9 réplicas. Como análisis estadístico se realizó el test de Bonferroni donde *** = a $p < 0.001$, ** = a $p < 0.01$ y NS = no significativo.

III. Efectos De La Combinación De Alta Temperatura y Luz Sobre Los Ritmos Circadianos

Para determinar si existe un cambio de fase del ritmo circadiano entre tratamientos (C+R y R), se estudiaron los ritmos que se generan entrenando a las plántulas con los diferentes tratamientos, por un lado, sobre la fase de expresión de ciertos genes rítmicos y, por otra parte, sobre los ritmos en un output fisiológico.

Ritmos de expresión génica

Se utilizaron líneas de *Arabidopsis* transformadas con construcciones que fusionan los promotores de los genes *TOC1*, *CCA1* o *CCR2* al gen reportero luciferasa. Las plántulas fueron entrenadas durante tres días utilizando los protocolos

anteriormente descriptos C+R, R, C y control (oscuridad, O). El monitoreo de la actividad luciferasa comenzó en el tercer día de entrenamiento y se extendió durante cuatro días en condiciones de libre curso, oscuridad continua a 22 °C (Fig. 15A). Basándonos en los trabajos de Salomé, Xie & McClung (2008), la siembra de las semillas se realizó en horas de la tarde (18:00), y el pulso de rojo para inducir la germinación fue dado en horas de la mañana; según los autores estas señales resultan suficientes para poner el reloj circadiano en funcionamiento de forma sincronizada.

Los valores de actividad luciferasa fueron normalizados a la mediana de expresión de cada plántula individual, de forma que sirven para estudiar los patrones rítmicos de expresión pero, los niveles de transcripción no son comparables entre distintos tratamientos. Los resultados obtenidos indican que la expresión génica presenta ritmos en los cuatro tratamientos utilizados (Fig. 15B). En el caso de los genes *TOC1* y *CCR2* los ritmos generados son de una mayor amplitud y persistencia que en *CCA1*. Se obtuvieron patrones similares de expresión para *TOC1* y *CCR2*, donde existe un marcado cambio de fase entre el tratamiento control (O) y C+R, R o C. Se observa entonces que tanto el pulso de 37 °C, el pulso de luz roja o la combinación de ambos produce un defasaje en la expresión de *TOC1* y *CCR2* de aproximadamente 12 horas. En otras palabras, un breve pulso de alta temperatura es suficiente para adelantar la fase de expresión en algunos genes como *TOC1* y *CCR2*. Sin embargo, se encontró un cambio en la fase entre los tratamientos C+R y R para la expresión de *CCR2* y no la de *TOC1*, por lo que se descarta la expresión diferencial de los genes con expresión rítmica encontrada en los microarreglos se deba simplemente a un cambio generalizado de las fases de expresión causado por la temperatura elevada.

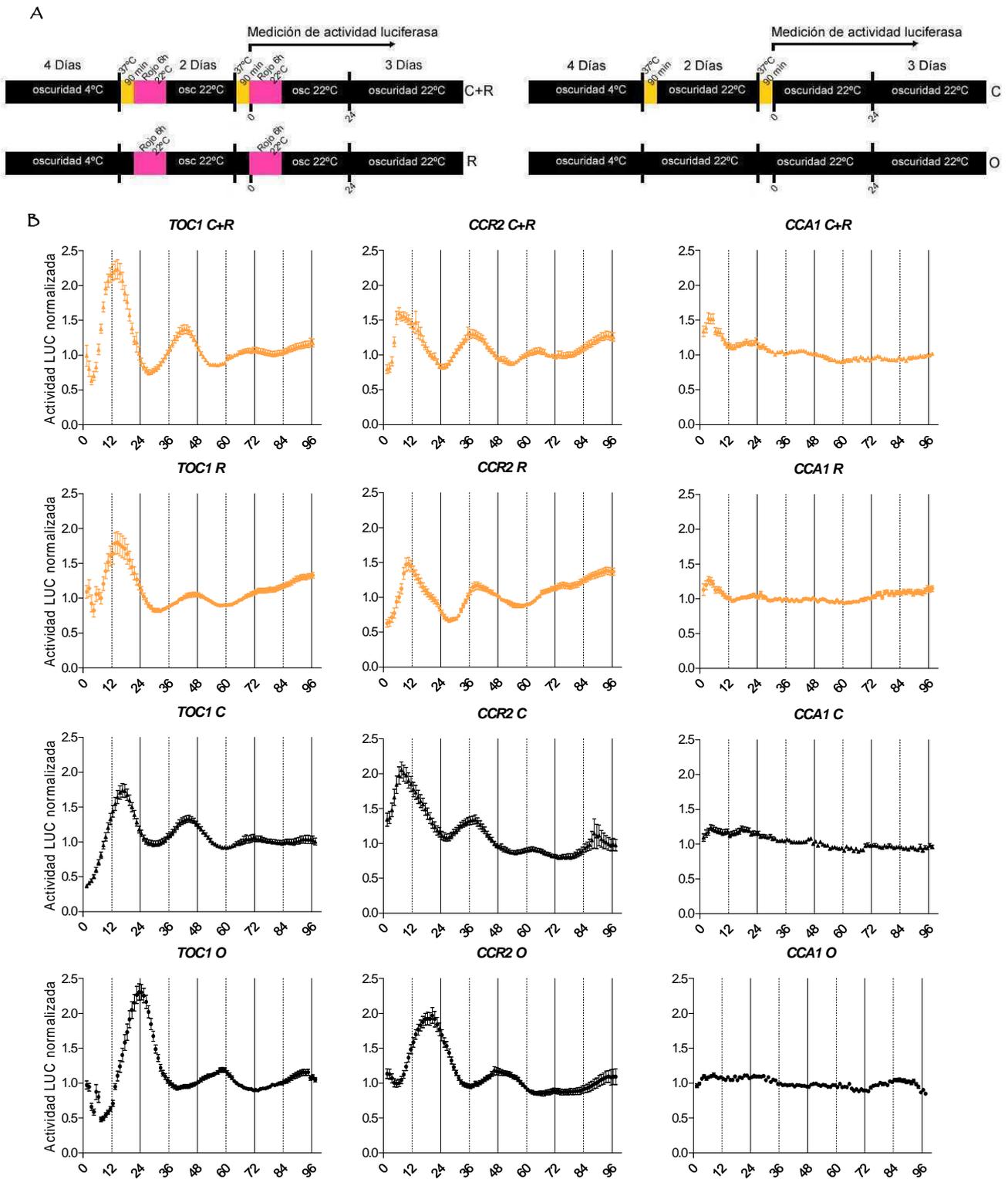


Figura 15. Los pulsos de temperatura provocan un cambio de fase en los ritmos circadianos. A) Diagrama de los tratamientos y condiciones de medición de la actividad luciferasa en B. B) Expresión de los genes *TOC1*, *CCA1* y *CCR2* generada por el entrenamiento con los distintos tratamientos. Los valores de actividad de luciferasa fueron relativizados a la mediana de la actividad de luciferasa que presentó cada plántula y cada dato es el promedio de los valores obtenidos en 60 plántulas. Por lo tanto, estos datos permiten comparar los patrones de oscilación pero no los niveles de expresión.

Ritmos de alargamiento del hipocotilo

El pulso de temperatura elevada puede cambiar la fase de expresión de genes rítmicos en oscuridad y para algunos genes analizados, aún en presencia de luz (Fig. 15B). Se estudió si el entrenamiento de las plántulas con los diferentes tratamientos genera ritmos en determinados outputs del reloj circadiano. Dado que el proceso fisiológico sobre el cual analizamos el efecto sinérgico de la alta temperatura y la luz es la desetiología, el output fisiológico más informativo sería el ritmo de elongación del hipocotilo generado por el entrenamiento de las plántulas con estímulos de alta temperatura y luz. Para esto se utilizaron los protocolos anteriormente descritos C+R, R, C y control (oscuridad, O) como entrenamiento durante dos días (día1 y día 2), luego las plántulas permanecieron en condiciones constantes de oscuridad y 22 °C (Fig. 16A). La tasa de elongación fue medida a intervalos de 3 horas, a partir de la hora 0 del día 2, que corresponde a la hora de finalización del pulso de 37 °C, hasta la hora 72 (día 4). Debido al continuo decremento en la tasa de elongación, atribuible posiblemente a un límite morfológico de la elongación de las células del hipocotilo, al final del día 4 los valores son cercanos a cero, por lo cual no se pudo continuar con la medición en días posteriores. El ritmo generado en las plántulas tras el entrenamiento C y control (O), no presentan diferencias significativas, ambos muestran una tendencia constante a la disminución de la tasa de elongación del hipocotilo a lo largo del tiempo (Fig. 16B). La diferencia observada en el valor de la tasa en el período 0-3 del día 2 puede atribuirse al efecto directo del pulso calor suministrado en C. Cuando las plántulas son entrenadas durante dos días con un pulso de luz roja de 12 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, los valores de las tasas de elongación del hipocotilo son de menor magnitud, pero describen la misma tendencia a lo largo del tiempo que en C y O. En cambio, cuando el entrenamiento combina el pulso de alta temperatura con el de luz roja, se genera un ritmo circadiano en la elongación del hipocotilo durante las 72 h estudiadas, que alcanza su valor de tasa mínimo al final del día subjetivo y su máximo durante las primeras horas del día subjetivo (Fig. 16C).

Podemos pensar entonces que la mayor inhibición del largo del hipocotilo generada por la combinación de un pulso de alta temperatura y luz roja es una consecuencia de la disminución en la tasa de elongación durante el período de oscuridad que sigue a las 6 horas de luz roja (Fig. 10A), y que esta disminución de la tasa de elongación es el resultado de un ritmo circadiano del crecimiento del hipocotilo generado por la combinación de ambas señales (Fig. 16B y 16C).

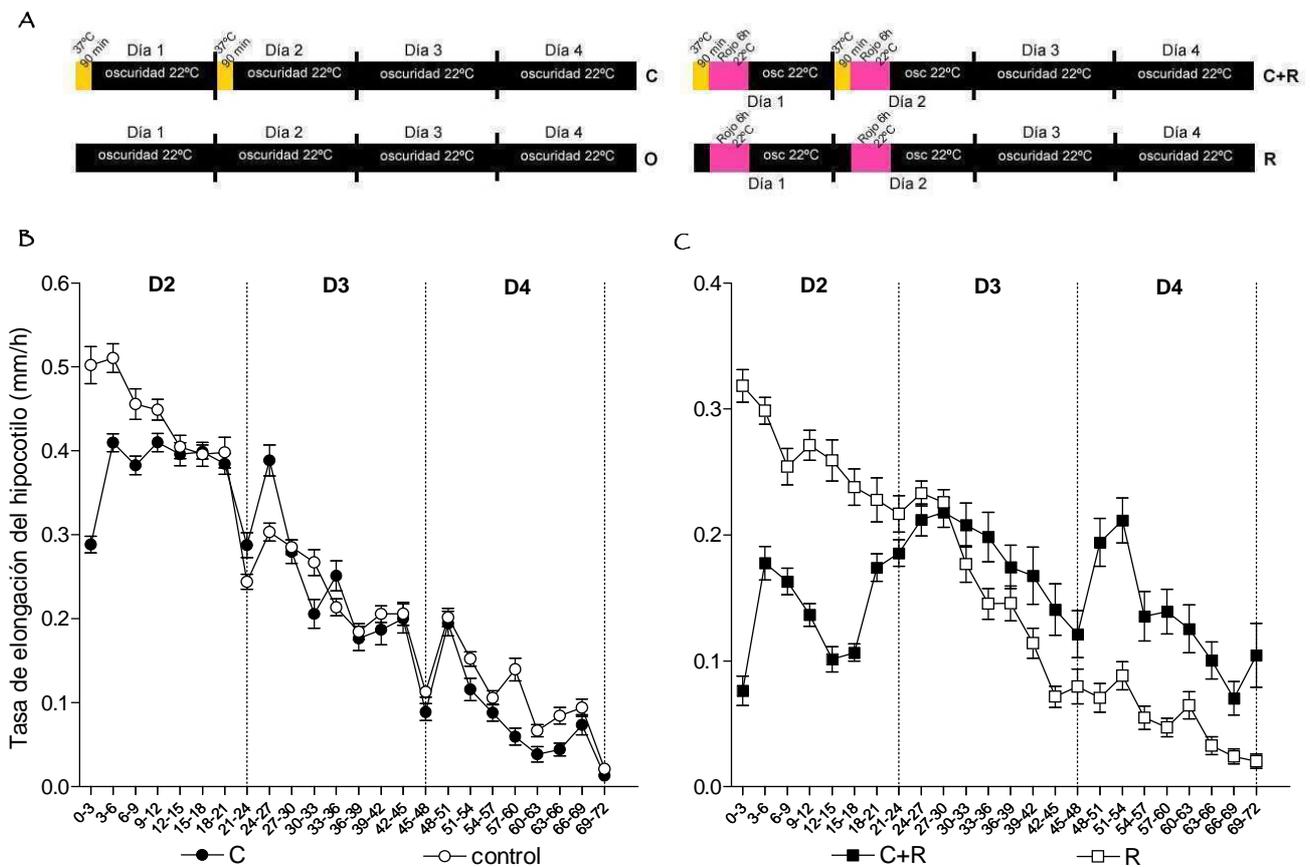


Figura 16. El suplemento del pulso de alta temperatura genera un ritmo circadiano en la elongación del hipocotilo. A) Representación de los tratamientos utilizados para el entrenamiento de las plántulas. B) Tasas de elongación medidas a intervalos de 3 horas. Los datos son el promedio y EE de un mínimo de 15 réplicas.

IV. Estudio De Los Cambios En La Sensibilidad a La Luz Roja Causado Por El Pulso De Alta Temperatura

Los resultados obtenidos previamente indican que el control de la respuesta generada por el suplemento de alta temperatura a la exposición lumínica involucra componentes del reloj biológico. Existen ejemplos de la modulación de la sensibilidad a las señales del ambiente causadas por el reloj circadiano (“gating”; Millar & Kay, 1996; McWatters *et al.*, 2000; Tóth *et al.*, 2001). En estos casos reportados se observa una variación de la sensibilidad a lo largo del día, de manera que pueden generarse en las plantas respuestas de distinta magnitud, dependiendo del momento del día en que un mismo estímulo sea percibido.

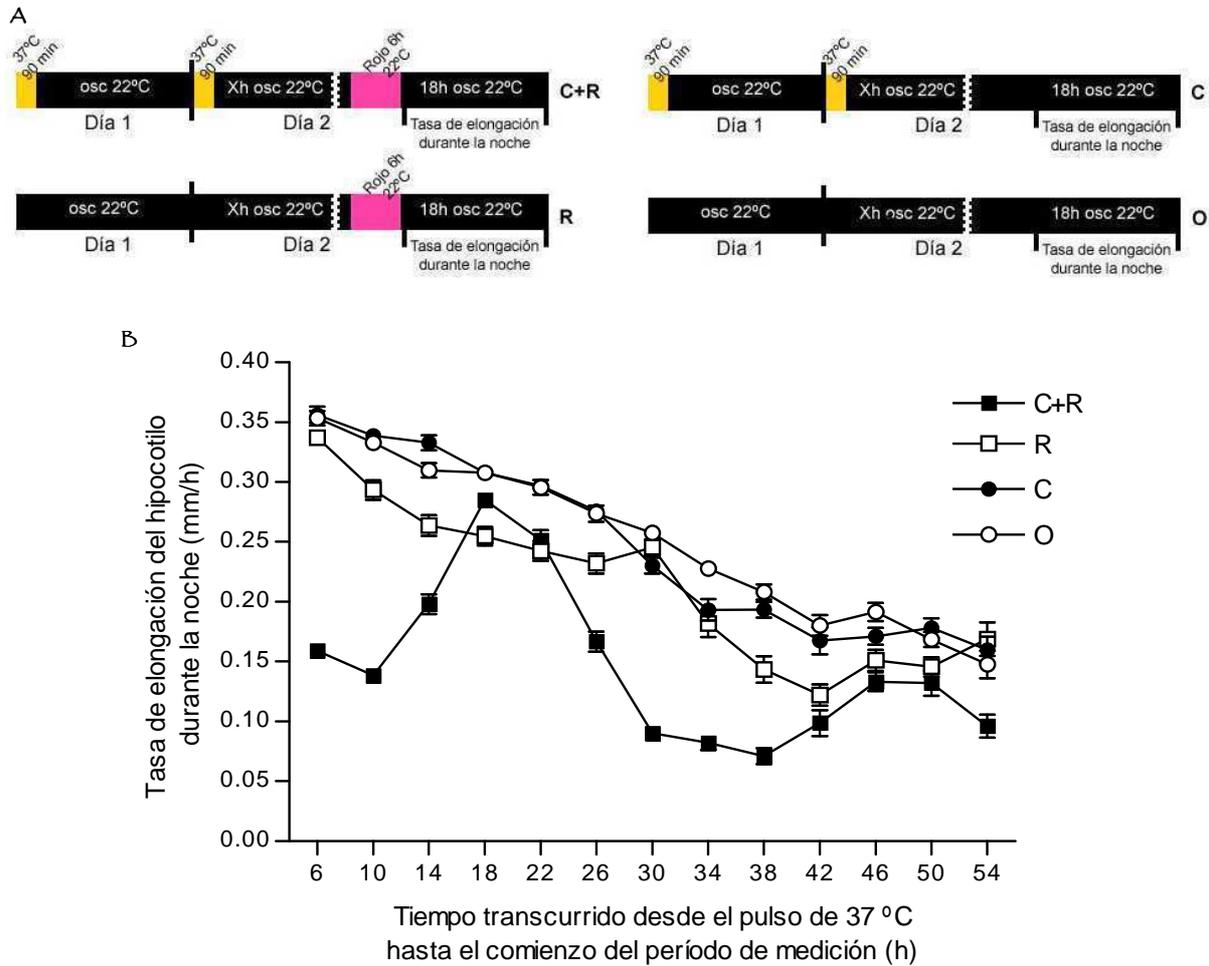
Análisis de la respuesta de gating sobre la tasa de elongación del hipocotilo

Se buscó estudiar si la respuesta sinérgica sobre la desetiología se relaciona con un efecto de la temperatura elevada sobre un ritmo de sensibilidad a la luz. Para ello, se realizó una curva de fase de respuesta utilizando un protocolo basado en los tratamientos principales C+R, R, C y control (oscuridad, O). Los tratamientos C+R y C tienen el suplemento de un pulso de 90 min. a 37 °C en el día 1 y 2 que culmina a la hora 0 de cada día. A partir del día 2, en los tratamientos C+R y R se aplicó un pulso de luz roja de 6 horas de duración a partir de la hora 0 con un defasaje cada 4 horas hasta cubrir las 48 horas entre el último pulso de calor y el comienzo del pulso de luz roja (Fig. 17A). Luego se midió la tasa de elongación del hipocotilo durante la noche (período que abarca las 18 horas de oscuridad que siguen al final del pulso de luz roja). En los tratamientos C y O, en los que no existe exposición a la luz, las mediciones se realizaron en los períodos equivalentes (Fig. 17A).

Analizando los resultados obtenidos encontramos que el tratamiento control describe una disminución constante de la tasa de elongación a lo largo del tiempo, al igual que el tratamiento C (Fig.17B). En el tratamiento R se observan pequeños cambios en la tasa de elongación a lo largo del día, que implicarían un leve cambio en la sensibilidad al pulso de luz roja (Fig.17B). En cambio, el tratamiento C+R muestra una amplia variación en la sensibilidad al pulso de luz roja a lo largo del día. Cuando el pulso de luz roja se da justo al finalizar el pulso de 37 °C (punto 6 de la curva), se observa una fuerte respuesta en la tasa de elongación respecto del resto de los tratamientos, que concuerda con los datos presentados previamente (Fig. 10A y 16C). Estos valores se mantienen incluso cuando han transcurrido 4 horas entre el final del pulso de calor y el comienzo del pulso de luz roja (punto 10 de la curva). Cuando transcurren entre 4 y 12 horas los valores de la tasa de elongación aumentan hasta alcanzar los valores presentes en R, C y O (punto 18 de la curva). En otras palabras, la respuesta disminuye y desaparece. A partir de las 16 horas (punto 22 de la curva) los valores de la tasa de elongación vuelven a disminuir hasta alcanzar valores de respuesta altos, semejantes al del punto 6, cuando han transcurrido 24 horas entre el pulso de 37 °C y el de luz roja (30). Este patrón se repite durante las siguientes 24 horas (desde el punto 30 al 54, Fig. 17B).

Estos resultados reflejan que cuando se suplementa con pulsos de alta temperatura existe un cambio en la sensibilidad al pulso de luz roja, que resulta muy dependiente del momento del día. Al comienzo del día subjetivo (fin del pulso de 37

°C) la sensibilidad es máxima y cerca de la mitad del día subjetivo es mínima. Esto nos permite inferir que el pulso de alta temperatura generaría la oscilación circadiana de ciertos componentes del reloj biológico que están relacionados a la respuesta de inhibición del hipocotilo por luz roja; generando un cambio en la sensibilidad de la respuesta a lo largo del día.



Análisis del gating de la respuesta de CAB2 a la luz

Además de la respuesta de gating de sensibilidad a la luz roja sobre la tasa de elongación del hipocotilo, se investigó si existe una respuesta similar sobre la modulación de la expresión de CAB2. La expresión del gen CAB2 es utilizada como marcador molecular para estudiar la integración de las señales endógenas y las provistas por el ambiente. Se sabe que la transcripción de CAB es controlada por la luz y por el reloj circadiano, de manera que si las plántulas etioladas son expuestas a

un pulso de luz roja, se genera un pico de expresión y, si son mantenidas en condiciones de luz continua, se observa un ritmo circadiano de abundancia de ARNm (Millar & Kay, 1996). Utilizando plántulas transgénicas de *Arabidopsis* que llevan una inserción que fusiona el promotor del gen *CAB2* a gen reportero LUC (luciferasa), se determinaron los niveles de transcripción bajo el mismo protocolo que en la figura 15A. Estos experimentos muestran que en los tratamientos R y control (O) se generan ritmos de expresión hasta las 48 horas de monitoreo de actividad LUC (Fig. 18). A diferencia de los resultados obtenidos para *TOC1* y *CCR2* (Fig. 15B), no se observa un defasaje de la expresión entre tratamientos. En tanto, la exposición al pulso de 37 °C causa una inducción transitoria de la transcripción de *CAB2*, que cuando se combina con la exposición a luz roja (C+R), la magnitud de esta inducción es 4 veces mayor que cuando es seguido de oscuridad (C, Fig. 18). Por lo tanto, la respuesta del gen *CAB2* al pulso de luz roja se potencia cuando las plántulas son expuestas previamente a un pulso de alta temperatura.

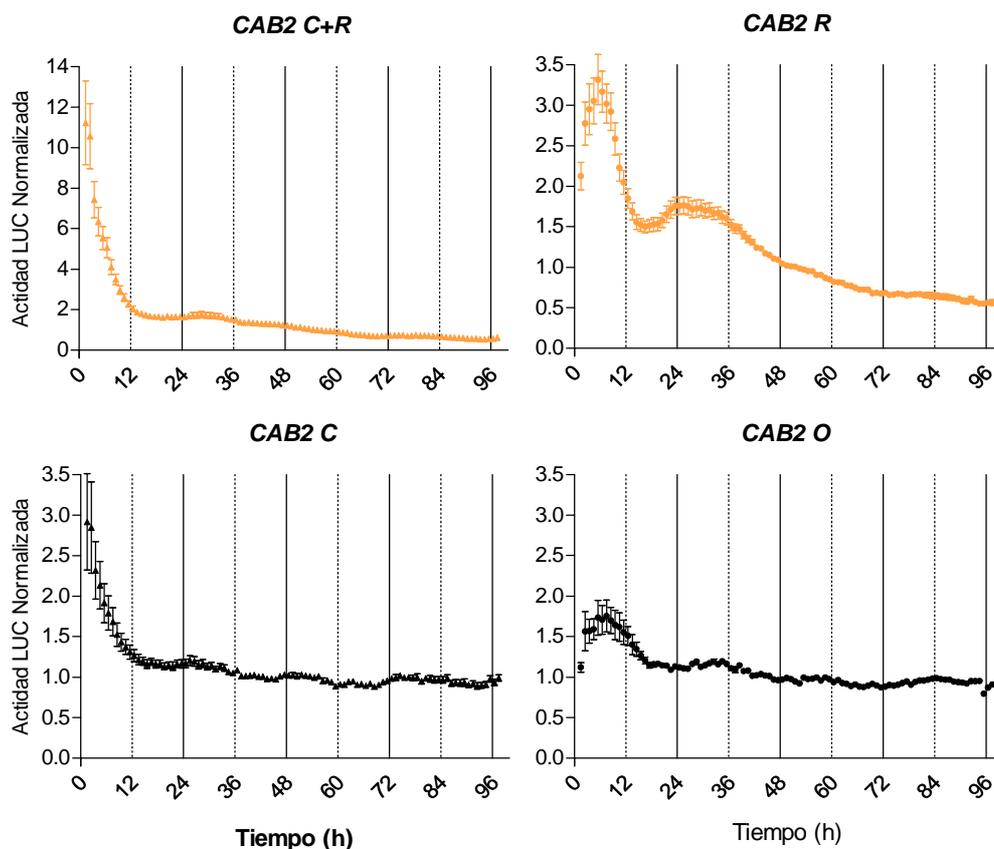


Figura 18. La combinación de pulsos de temperatura y luz roja provocan una fuerte inducción de la transcripción de *CAB2*. Expresión del gen *CAB2* generada por el entrenamiento con los tratamientos C+R, R, C y control O. Los valores de actividad de luciferasa fueron relativizados a la mediana de la actividad de luciferasa que presentó cada plántula y cada dato es el promedio de los valores obtenidos en 60 plántulas.

Dado que existe una respuesta diferencial de la expresión de *CAB2* en los tratamientos C+R y R, se estudió si esta respuesta responde también a un fenómeno de gating de sensibilidad a la luz roja causado por el pulso de 37 °C. Se utilizaron tratamientos similares a los de la figura 17, pero en este caso el pulso de luz roja duró 90 min. y fue dado a distintos grupos de plántulas con un defasaje de 6 horas hasta cubrir 42 horas entre el pulso de 37 °C y el comienzo de la exposición a luz roja. La medición de actividad LUC fue realizada justo al término de la exposición a luz roja, y en C y control (O) en los momentos equivalentes. Los resultados obtenidos muestran nuevamente la inducción de la transcripción de *CAB2* cuando la exposición a luz roja es precedida por un pulso de alta temperatura (hora 0, Fig. 19). Sin embargo, a partir de 6 hasta 42 horas entre el fin del pulso de 37 °C y el comienzo de la exposición a luz roja, este efecto desaparece, obteniéndose la misma respuesta en C+R y en R (Fig. 19). Incluso cuando han transcurrido 24 horas, la respuesta de C+R no cambia respecto a R, indicando que la inducción de la transcripción de *CAB2* en C+R no responde a un fenómeno de gating.

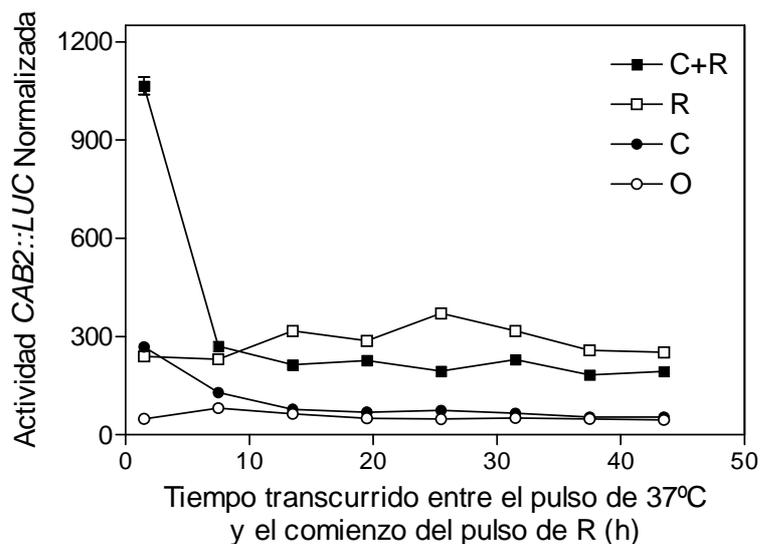


Figura 19. El suplemento de pulsos de temperatura elevada no genera una respuesta de gating sobre la inducción del gen *CAB2*. Los valores de actividad de luciferasa corresponden al promedio de los valores obtenidos en 40 plántulas.

V. Búsqueda De Elementos Involucrados En La Respuesta De “Gating”

En base a los experimentos realizados, podemos pensar que los componentes, responsables de la respuesta de “gating” a la luz roja generada por los pulsos de calor (Fig. 17B), podrían ser los productos de genes que estén involucrados en las

respuestas a la luz roja y que además tuvieran un patrón de expresión (o abundancia a nivel proteína) diferencial entre los tratamientos en oscuridad (C y control) que se correlacionara con los cambios en la sensibilidad a lo largo del día. Por ejemplo, si uno de los componentes que generan la respuesta de “gating” fuese un modulador positivo de la inhibición del hipocotilo por luz roja, debería mostrar niveles de abundancia altos en los momentos del día de mayor sensibilidad, y menos abundancia en los momentos del día de menor sensibilidad. En cambio, de ser el componente involucrado un regulador negativo de la inhibición del hipocotilo por luz roja, se esperaría un patrón inverso.

Identificación de componentes del reloj biológico relacionados al gating de sensibilidad a la luz roja

Para intentar identificar algunos de estos posibles componentes se midieron los patrones de expresión de genes que forman parte del oscilador central que están involucrados en las respuestas a la luz roja. Se cultivaron plántulas bajo un protocolo similar al de la figura 16A. Las plántulas fueron mantenidas en condiciones de oscuridad a 22 °C, un grupo fue tratado durante tres días con un pulso diario de 37 °C (C) y otro grupo control se mantuvo a 22 °C (O, Fig. 21A).

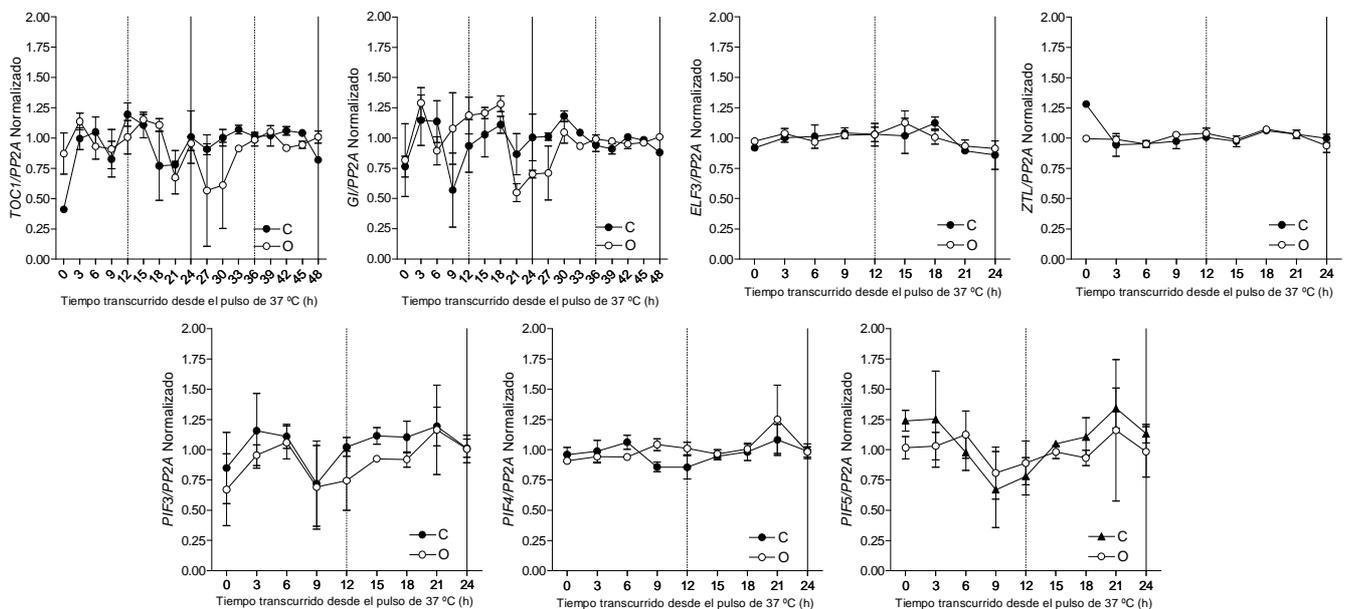


Figura 20. Existen genes cuya expresión no se ve afectada por el pulso de alta temperatura. Cuantificación por Real Time PCR de los niveles de expresión génica de genes componentes del reloj biológico: *TOC1*, *GI*, *ELF3* y *ZTL*, y genes controlados por el reloj: *PIF3*, *PIF4* y *PIF5*. Los datos son el promedio y EE de 3 réplicas biológicas por duplicado.

Se realizaron extracciones de ARN cada tres horas a partir de la hora de finalización del pulso de 37 °C en el día 3, durante 48 horas. Utilizando una técnica de PCR cuantitativa, pudieron medirse los niveles de expresión de algunos genes candidatos, seleccionados en base a su relación con las respuestas a la luz roja, a su carácter rítmico de abundancia de ARNm, y/o al fenotipo del mutante nulo en los tratamientos realizados en la figura 8.

Se estudiaron los patrones de expresión de los genes *TOC1*, *CCA1*, *LHY*, *GI*, *ELF3*, *PRR7*, *PRR9*, *ZTL*, *PIF3*, *PIF4* y *PIF5*. Los patrones de expresión de *TOC1*, *ELF3*, *ZTL*, *GI*, *PIF3*, *PIF4* y *PIF5* no presentan diferencias significativas entre el tratamiento C y el control (Fig. 20). En cambio, se observa una inducción transitoria de la expresión de *PRR7* y *PRR9* causada por el pulso de alta temperatura (punto 0, Fig. 21C). También, el ritmo de expresión de *LHY* y *CCA1* difiere ampliamente entre los tratamientos (Fig. 21B). Esto nos permite corroborar que el pulso de 37 °C es capaz de generar cambios en los patrones de expresión de genes que forman parte del oscilador central del reloj biológico, como ya habíamos observado con los resultados obtenidos con las mediciones de actividad luciferasa (Fig.15B). Sin embargo, los genes que muestran patrones rítmicos utilizando el gen reportero luciferasa o PCRq no son los mismos. Los patrones de expresión de *TOC1::LUC*, mostraron una fuerte oscilación rítmica y un marcado defasaje entre C y O (Fig.15B), mientras que por PCRq para el mensajero de *TOC1* no se observan ritmos definidos. Lo contrario ocurre para el gen *CCA1* donde los valores de actividad luciferasa en *CCA1::LUC* no presentan oscilaciones rítmicas importantes bajo ningún tratamiento; y los datos de PCRq muestran ritmos con amplias diferencias entre C y O (Fig. 21B). Si bien ambas técnicas fueron utilizadas para estudiar los niveles de expresión génica, debemos señalar que en los experimentos donde se cuantifica la actividad luciferasa, estamos estimando la tasa de transcripción del gen cuyo promotor se ha fusionado a la secuencia codificante de luciferasa. De esta manera, si hubiesen cambios a nivel de la estabilidad del ARNm no serían detectados. Además, en estas líneas el contexto genético (estado de la cromatina) en el que encuentra la inserción podría no reflejar todos los controles a los que se encuentra supeditada la transcripción del gen salvaje en su ubicación normal, limitaciones no presentes al usar PCRq.

Analizando los patrones de expresión de *LHY* y *CCA1* generados en C encontramos que los niveles de abundancia de sus transcritos se correlacionan a lo largo del día con los cambios de sensibilidad observados en la respuesta de “gating”, dado que ambos genes son reguladores negativos de la inhibición del hipocotilo bajo

luz roja. De modo que, comparando las figuras 17B y 19B se observa que los niveles mínimos de ARNm de *LHY* y *CCA1* alcanzados entre las 0 y 9 h después de la finalización del pulso de temperatura elevada coinciden con el período de mayor

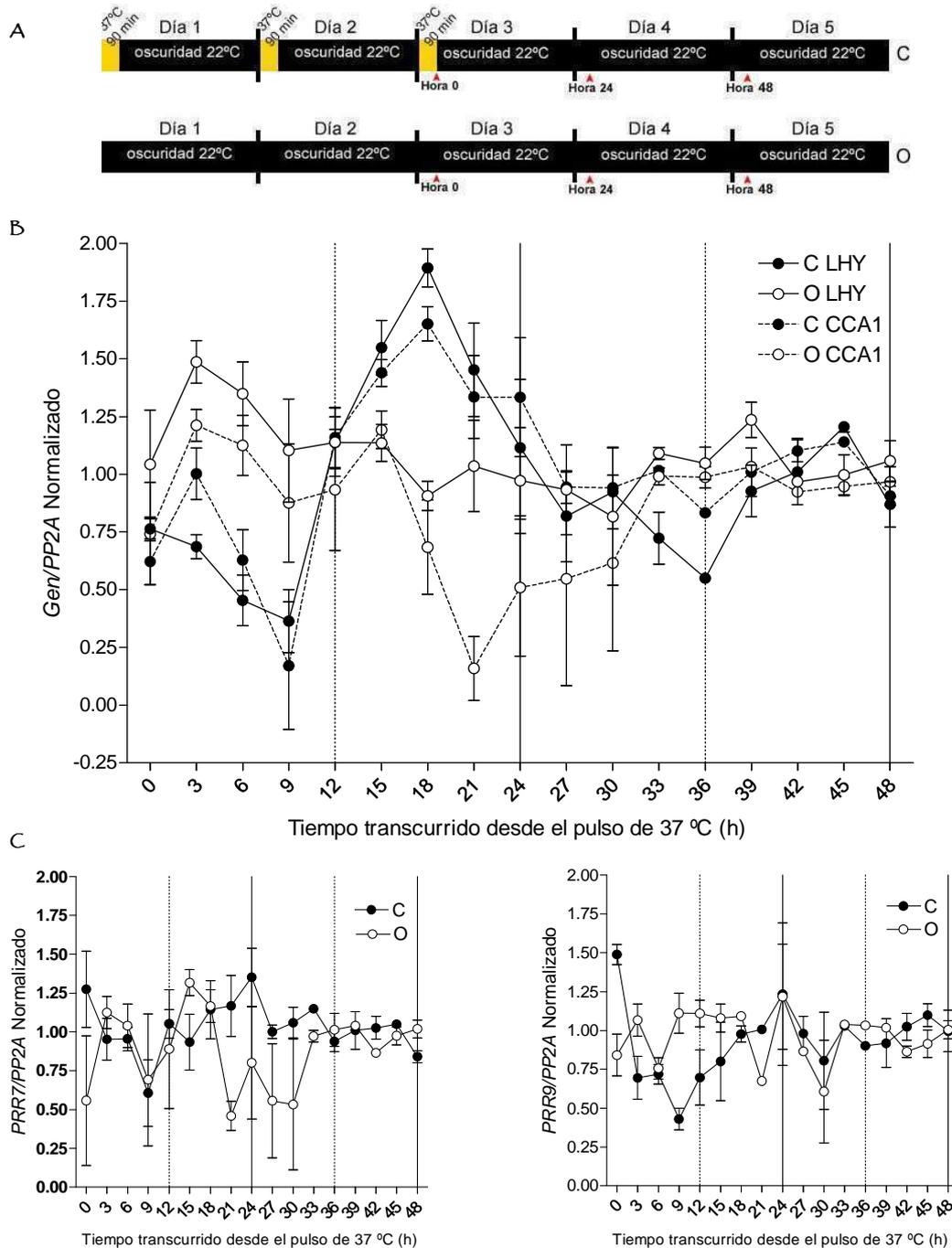


Figura 21. El pulso de alta temperatura genera cambios en los ritmos de expresión de *LHY* y *CCA1*. A) Tratamientos utilizados para realizar las extracciones de ARN utilizadas para la cuantificación por Real Time PCR. B) Niveles de expresión de los genes *LHY* y *CCA1*. C) Niveles de expresión los genes candidatos *PRR7* y *PRR9*. Los datos son el promedio y EE de 3 réplicas biológicas por duplicado.

sensibilidad a la luz que se extiende hasta 10 h después del pulso de temperatura elevada. Así mismo, entre las 15 y 21 h se alcanzan los valores máximos de abundancia de ARNm de *LHY* y *CCA1*, de manera coincidente con el período de menor sensibilidad a la luz roja que abarca entre las 18 y 22 h posteriores a la exposición a temperaturas elevadas. Dada esta fuerte concordancia entre ambos resultados podemos sugerir que el ritmo de expresión de estos genes nos permitiría explicar el fenómeno de “gating” de sensibilidad a la luz roja generado por la exposición a los pulsos de alta temperatura.

Evaluación de PRR7 y PRR9 como reguladores de los ritmos en los niveles de ARNm de LHY/CCA1 generados por los pulsos de alta temperatura

Existen datos que relacionan íntimamente a los genes *PRR7* y *PRR9* en la manifestación de la respuesta sinérgica sobre la desetiología causada por la combinación de exposición a temperaturas elevadas transitorias y luz. Por un lado, se observó que el pulso de temperatura elevada produce una inducción transitoria de la expresión de los genes *PRR9* y *PRR7* (Fig. 21B) y además, hemos probado que la respuesta sinérgica depende de la presencia de ambos genes (Fig. 14). Se ha involucrado directamente a *PRR7* y *PRR9* con la generación de ritmos circadianos por el entrenamiento con ciclos de temperaturas alternadas (Salomé y McClung, 2005) y, además, se ha establecido un circuito autorregulado que implica la inhibición de *LHY/CCA1* por *PRR7/PRR9*, y una inducción de éstos por *LHY/CCA1* (Farré *et al.*, 2005, Locke, *et al.*, 2006).

Basándonos en lo expuesto, surge la hipótesis que la inducción transitoria de la expresión de *PRR9* y *PRR7* causada por el pulso de alta temperatura sea responsable de generar una baja en los niveles de ARNm de *LHY/CCA1*, poniendo en marcha este circuito del reloj biológico. De ser así, podríamos esperar que la ausencia de los genes *PRR9* y *PRR7* impactara sobre los ritmos de abundancia generados en oscuridad por el pulso de temperatura elevada (Fig. 21B).

Para investigar esta posibilidad se cuantificaron los niveles de ARNm de *LHY* y *CCA1* en el doble mutante nulo *prp7 prp9* en los tratamientos de la figura 21A. Tomando como referencia los datos obtenidos para las plántulas de genotipo salvaje (WT), los resultados muestran que no existen diferencias significativas en los niveles de ARNm de *LHY* entre los tratamientos control (O) del doble mutante *prp7 prp9* y del WT (Fig. 22). En cambio, las mediciones realizadas bajo el protocolo C muestran un patrón similar sólo 3 y 6 horas después del pulso de 37 °C. Ya desde las 9 horas, en

ppr7 ppr9 los niveles de *LHY* alcanzan los valores del control O, donde se mantienen hasta la hora 27 (Fig. 22). Estos resultados muestran que los genes *PRR7* y *PRR9* están involucrados en la regulación de los niveles de ARNm de *LHY* generados por la exposición a pulsos de temperatura elevada. Sin embargo, como la oscilación de ARNm de *LHY* no se pierde totalmente (3 y 6 horas después del pulso de calor), queda abierta la posibilidad que otros genes estén involucrados en la regulación de *LHY* sobre las primeras horas luego del pulso de 37 °C.

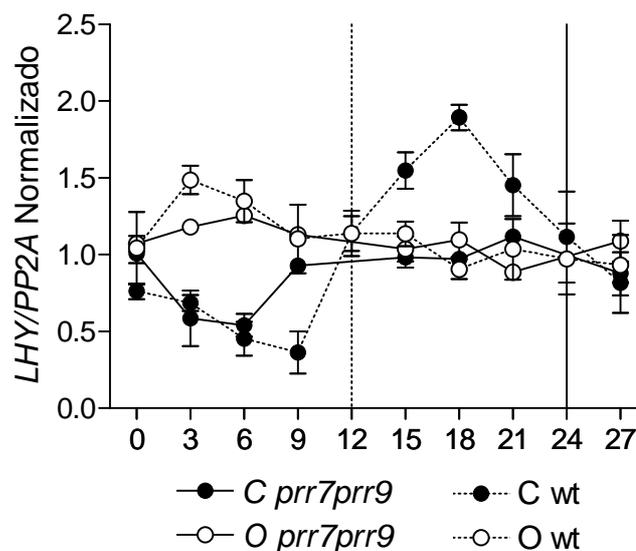


Figura 22. La oscilación en los niveles de *LHY* se pierde parcialmente en el doble mutante nulo *ppr7 ppr9*. Cuantificación por Real Time PCR de los niveles de expresión génica de *LHY* en plántulas de genotipo salvaje (WT) y en el doble mutante nulo *ppr7 ppr9*. Los datos son el promedio y EE de 3 réplicas biológicas por duplicado.

Vinculación de los genes candidatos con la respuesta de gating de sensibilidad a la luz roja

Los experimentos que combinan la exposición a altas temperaturas y luz roja con mediciones del largo final del hipocotilo indican que los genes *LHY*, *CCA1*, *PRR7* y *PRR9* son necesarios. Para evaluar la vinculación directa de estos genes a la respuesta de gating descrita, se estudió esta respuesta en los doble mutantes nulos *lhy cca1* y *ppr7 ppr9*, y en plántulas control de genotipo salvaje, *Ws* y *Col* respectivamente, de manera análoga a la Fig. 17A. Los resultados muestran que frente a las repuestas observadas en las plántulas de genotipo salvaje, ambos mutantes nulos presentan marcadas diferencias. Por un lado, cuando los genes *LHY* y *CCA1* se encuentran ausentes, los tratamientos C+R y R generan una respuesta de

similares características donde la sensibilidad a la luz roja es siempre máxima (Fig. 23). Contrariamente, cuando las plántulas carecen de los genes *PRR7* y *PRR9*, no existe diferencia en la respuesta generada por los distintos tratamientos, donde la sensibilidad es siempre mínima (Fig. 23). Estos resultados demuestran que los genes *LHY*, *CCA1*, *PRR7* y *PRR9* están involucrados en la generación de un ritmo de sensibilidad a la luz roja sobre la elongación del hipocotilo.

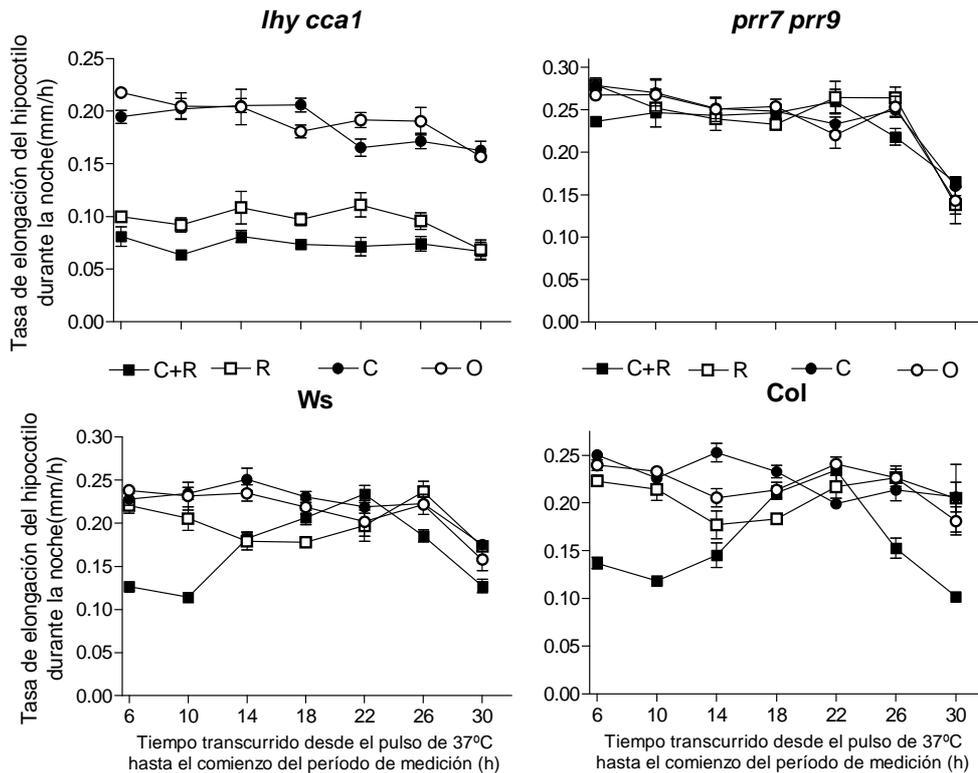


Figura 23. La respuesta de gating de sensibilidad a la luz roja no se manifiesta en ausencia de *LHY/CCA1* o *PRR7/PRR9*. Los gráficos muestran la tasa de elongación durante la noche, que corresponde a las 18 horas siguientes al fin del pulso de 6 horas de luz roja. Experimentos realizados siguiendo un protocolo análogo al de la Fig. 17A. Los datos son el promedio y EE de un mínimo de 4 réplicas.

Un Nuevo Fenómeno De Interacción Entre Luz y Temperatura Que Afecta El Desarrollo De Las Plantas

Estudiando la respuesta de desetiación en *Arabidopsis* bajo condiciones experimentales que combinan la exposición diaria a pulsos de temperatura elevada (37°C) y fotoperíodo corto de intensidad baja (6 h, 12 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), se caracterizó un fenómeno de interacción entre las señales producidas por la luz y la alta temperatura, que inducen un incremento de la magnitud de aspectos selectivos del proceso de desetiación. Este efecto fue evidenciado en una mayor inhibición del alargamiento del hipocotilo y una mayor apertura entre cotiledones; variables que no fueron afectadas significativamente por la temperatura en plantas cultivadas en oscuridad (Fig. 4A, 4B y Fig. 8).

Existen trabajos donde se describe el efecto de la temperatura sobre procesos del desarrollo controlados por luz, como la germinación, la floración o la arquitectura de las plantas adultas (revisado por Franklin, 2009). Además, se han descrito algunos casos donde la activación simultánea de distintas vías de señales tiene efectos sinérgicos sobre la desetiación. Por ejemplo, se establecen relaciones sinérgicas entre la activación de distintas vías de señalización lumínica (Casal & Mazzella, 1998; Sellaro *et al.*, 2009). Sin embargo, no existen antecedentes de interacciones entre las vías de señalización de luz y de temperatura que tengan un efecto promotor de la desetiación. En cambio, se han reportado efectos positivos de la temperatura elevada sobre el alargamiento del hipocotilo (Koini *et al.*, 2008). Este último sería, al menos en superficie, un efecto contrario al presentado aquí, pero que también fue reproducido en esta tesis cuando en lugar de aplicar aumentos transitorios de temperatura se usaron distintas temperaturas de modo continuo, concordando con lo observado por Gray *et al.*, 1998 y Koini *et al.*, 2008 (Fig. 5C). En efecto, hemos demostrado que el efecto descrito en esta tesis constituiría un nuevo fenómeno fisiológico del desarrollo temprano de las plántulas que se manifiesta solamente cuando la exposición a temperaturas elevadas es transitoria.

Asimismo, se ha relacionado a este fenómeno principalmente con la acción del fotorreceptor fitocromo B y a componentes río abajo de su vía de señalización (Fig. 6B, 7, 8 y 9). Esto concuerda con otros trabajos donde se han establecido especializaciones en las funciones de los miembros de la familia de fitocromos dependiendo de la temperatura (Mazzella, Bertero & Casal, 2000; Heschel *et al.*, 2007).

El Fenómeno Estudiado Involucra Componentes De Distintas Vías De Señalización

La magnitud de las interacciones permite pensar que es fundamental la importancia que tiene la conectividad entre vías de señalización iniciadas por distintos estímulos en la modulación de una respuesta fisiológica. En condiciones naturales, una mayor carga de radiación incidente sobre el suelo genera mayor temperatura y de ese modo, cuando pensamos en las respuestas de las plantas a la luz, es posible asociar este estímulo a otros como la variación en la temperatura ambiente o en el contenido de agua del suelo (debido a la relación entre temperatura y evaporación).

Trabajando con mutantes nulos hemos identificado algunos genes que tienen una importancia fundamental para la promoción de la desetiología por los pulsos de alta temperatura. En efecto, *PHYB*, *PIF3*, *PIF4*, *HY5*, *ELF3*, *LHY*, *CCA1*, *PRR7* y *PRR9* han sido identificados como genes cuya ausencia está ligada a la pérdida del efecto sinérgico sobre la desetiología causado por el suplemento de temperatura elevada (Fig.9 y Fig.13). Por una parte, es de esperar que trabajando con dos estímulos como la luz y la temperatura existan genes íntimamente relacionados a una de estas vías que afectan la interacción sinérgica. Es el caso de *PHYB*, *PIF3*, *PIF4* y *HY5*, genes que forman parte de las vías activadas por luz (Casal *et al.*, 2003; Oyama, Shimura & Okada, 1997; Ni *et al.*, 1998;), y de *PRR7* y *PRR9*, los únicos genes involucrados en la percepción de la alternancia de temperaturas (Salomé & McClung, 2005). Sin embargo, se encontró además que el fenómeno estudiado depende de la presencia de *LHY* y *CCA1*, genes componentes del oscilador central del reloj biológico, y de *ELF3* que ha sido particularmente implicado en la modulación de las vías de transducción de la señal lumínica sobre el reloj.

De forma concordante, realizando un análisis de los patrones globales de expresión de las plántulas tratadas con pulsos de calor y luz, se encontró un alto porcentaje de genes de respuesta a la temperatura elevada y de genes involucrados en la generación de ritmos circadianos que presentan niveles de expresión diferencial, comparado con el tratamiento que solo fue expuesto a luz (Anexo, Tabla 1). Es interesante que algunos de los genes que presentan mayores diferencias, sean genes que además son sensibles a la luz roja como *LHY*, *PRR9*, *ELF4*, *ELIP2* y *GI* a pesar que en las condiciones evaluadas ambas muestras estaban expuestas a idénticas condiciones de luz.

Considerando estos genes, podemos pensar que el fenómeno de promoción de la desetiología por la combinación de alta temperatura y luz, involucra la interacción entre al menos tres vías de señalización como son: la percepción y transducción de la señal luminosa, la percepción de los cambios de temperatura y la generación de ritmos circadianos.

La Combinación De Pulsos De Alta Temperatura Con La Exposición a La Luz Genera Ritmos Circadianos En Las Plantas

Se ha demostrado que existe un ritmo en el alargamiento del hipocotilo que es controlado por el reloj circadiano (Dowson-Day & Millar, 1999), y que este control depende de la presencia de luz y de la señalización por fitocromos (Nozue *et al.*, 2007). Los resultados presentados en esta tesis muestran que existen condiciones donde la presencia de estos factores no es suficiente para generar ritmos en el alargamiento del hipocotilo. En los experimentos de medición de tasa de elongación con entrenamiento en oscuridad o en fotoperíodo de 6 h de luz roja, con o sin el suplemento de alta temperatura se observó que, de manera concordante con Nozue *et al.* (2007), el crecimiento de los hipocotilos en oscuridad no presenta un ritmo y ocurre a alta velocidad (Fig. 16B). En cambio, cuando el entrenamiento es de fotoperíodo de luz roja a temperatura constante, tampoco puede observarse un ritmo en el crecimiento, aunque sí una disminución general de la tasa de elongación (Fig. 16C). La diferencia con los datos de Nozue *et al.* (2007) podría deberse a que aquí utilizamos luz roja, mientras que en el trabajo previo utilizaron luz blanca, que además de activar a los fitocromos activa a los criptocromos. En nuestro trabajo, sólo cuando el fotoperíodo es combinado con un pulso diario de alta temperatura, el entrenamiento genera un ritmo en el alargamiento del hipocotilo, de características similares al que han descrito Nozue *et al.* (2007), con un valor máximo de tasa durante las primeras horas del día subjetivo (Fig. 16C).

Este ritmo observado podría deberse a que las señales de alta temperatura y luz actúan conjuntamente como un input requerido por el reloj para ponerse en fase y generar un ritmo de crecimiento. Sin embargo, cuando se estudiaron los ritmos de expresión de los genes *TOC1* y *CCR2* se observó que el pulso de temperatura elevada es en sí mismo suficiente para adelantar la fase de oscilación, sin requerir la presencia de luz (Fig. 15B). Por lo tanto, la temperatura y la luz afectarían de manera independiente el funcionamiento del reloj biológico. Entonces, podríamos pensar que el ritmo de alargamiento observado es en realidad, la consecuencia de una alteración

en la sensibilidad a la luz roja a lo largo del día, que estaría generada por los pulsos de calor.

Pudimos determinar que la sensibilidad del alargamiento del hipocotilo a la luz roja presenta un ritmo circadiano cuando las plántulas son entrenadas previamente con pulsos diarios de temperatura elevada. El momento de mayor sensibilidad se extiende hasta transcurridas 12 h desde el pulso de alta temperatura y la menor sensibilidad se observa cuando han transcurrido entre 18 y 22 h (Fig. 17B). En trabajos previos se han caracterizado algunos ritmos de sensibilidad a las señales lumínicas (Millar & Kay, 1996; McWatters *et al.* 2000; Salter, Franklin & Whitelam, 2003). Mediante el trabajo realizado en esta tesis hemos encontrado una nueva respuesta de “gating” que se logra por el entrenamiento con pulsos de calor en plántulas etioladas y genera un ritmo circadiano en la sensibilidad a la luz roja sobre el crecimiento del hipocotilo, presentando su máximo durante las primeras horas del día subjetivo. El ritmo observado se mantiene incluso cuando han transcurrido 54 h desde el último pulso de alta temperatura, indicando que los pulsos de temperatura elevada en oscuridad generan una oscilación circadiana entrenable de componentes del reloj que modulan los efectos de la luz sobre el alargamiento del hipocotilo.

El Ritmo De Abundancia De ARNm De LHY y CCA1 Generado Por Los Pulsos De Calor Se Correlaciona Con El Ritmo De Sensibilidad A La Luz Roja

Para encontrar componentes rítmicos en oscuridad que puedan relacionarse con los cambios de sensibilidad a la luz a lo largo del día, se evaluó la expresión de genes candidatos en condiciones de oscuridad en respuesta al tratamiento de altas temperaturas. Se pudo comprobar que la exposición diaria a pulsos cortos de 37 °C afecta la expresión de ciertos genes del reloj biológico (Fig. 21). Genes como *LHY* y *CCA1* muestran un ritmo de expresión en respuesta a los pulsos de alta temperatura. Además, el patrón de abundancia de ARNm de *LHY* y *CCA1* que se genera por los pulsos diarios de alta temperatura describe un valor mínimo cuando han transcurrido 9 h desde el pulso de 37 °C y un pico máximo cuando han pasado 18 h (Fig. 21B). Siendo *LHY* y *CCA1* reguladores negativos de la sensibilidad a la luz roja, estos momentos de mayor y menor abundancia se correlacionan con los períodos de mayor (entre 6 y 12 horas después del pulso de 37 °C) y menor sensibilidad a la luz roja (entre 18 y 22 horas después del pulso de 37 °C) observados mediante el experimento de gating (Fig. 17B). Entonces, podemos proponer que el aumento de sensibilidad a luz roja estaría controlado por los niveles de *LHY* y *CCA1*, de manera que los pulsos

de alta temperatura generan un ritmo de expresión circadiana en estos genes lo que, a su vez, genera un ritmo circadiano de sensibilidad a la luz. La importancia de estos genes en la respuesta se destaca también por el fenotipo del doble mutante *lhy cca1*, que no mostraba sinergismo entre luz y temperatura (Fig. 14).

Uno de los circuitos descritos que forman parte del oscilador central es el que involucra una regulación recíproca entre *LHY/CCA1* y los *PRRs*. Se establece que *LHY/CCA1* promueve la expresión de los *PRRs* y que éstos regulan negativamente la expresión de *LHY/CCA1* (Farré *et al.*, 2005, Locke, *et al.*, 2006). Esto concordaría con el hecho que en el doble mutante nulo *prp7 prp9* el aumento de la inhibición del hipocotilo causada por la alta temperatura se encuentra ausente (Fig. 14); y también con el patrón de expresión de *PRR9* y *PRR7* generado por los pulsos de calor, donde se observan picos máximos justo después del pulso de alta temperatura (Fig. 21C), momento que coincide con el comienzo de la disminución de los niveles de abundancia de los mensajeros de *LHY/CCA1* (Fig. 21B).

Sin embargo, los niveles de *LHY* medidos en el doble mutante nulo *prp7 prp9* muestran una disminución durante las primeras 6 horas luego del pulso de alta temperatura (Fig. 22). Esto sugiere que los niveles de *PRR7* y *PRR9* no serían los responsables de la disminución en los niveles de *LHY* al comienzo del día. Por el contrario, las oscilaciones observadas a partir de las 9 horas posteriores al pulso de calor en las plántulas de genotipo salvaje desaparecen en el doble mutante *prp7 prp9* (Fig. 22), indicando que la presencia de estos genes es necesaria para la permanencia del ritmo de abundancia de *LHY* por los pulsos de temperatura elevada. En base al conjunto de datos presentados podemos relacionar la función de los genes *PRR7* y *PRR9* con la oscilación de los niveles de *LHY*. Sin embargo, no podemos excluir otros elementos no identificados en este trabajo que contribuyan al control de los niveles de *LHY* principalmente durante las primeras horas del día.

El Gating De Sensibilidad a Luz Roja Es Una Respuesta Específica Sobre El Crecimiento Del Hipocotilo

La respuesta de inducción de la expresión de genes *CAB* causada por la luz y la modulación de esta respuesta por el reloj circadiano han sido estudiadas previamente (Millar & Kay, 1996; Anderson *et al.*, 1997). En este trabajo hemos encontrado que la expresión del gen *CAB2* es fuertemente inducida por la exposición a un pulso transitorio de temperatura elevada (C, Fig. 18) y el efecto sinérgico provocado por la combinación del pulso de temperatura elevada y la luz roja (C+R, Fig. 18).

Valiéndonos de esta respuesta específica, se evaluó si existía, de manera análoga a la respuesta de inhibición del hipocotilo, un fenómeno de gating de sensibilidad a la luz roja que modulara la inducción de *CAB2* por luz. Mediante este experimento se demostró que la respuesta generada por la combinación del pulso de temperatura elevada y luz roja sobre la inducción de la expresión del gen *CAB2*, es una respuesta de carácter transitorio, que no es modulada por el reloj biológico (Fig. 19). De esta manera podemos determinar que el efecto de la combinación de las señales de luz y temperatura elevada generan un ritmo de sensibilidad a la luz roja que afecta específicamente a la respuesta de inhibición del hipocotilo y no así a otros marcadores del proceso de fotomorfogénesis, como la inducción de genes *CAB*.

Coordinación Del Crecimiento Del Hipocotilo Por La Luz Y El Reloj Biológico

No resulta fácil establecer el modo en que se coordinan las señales lumínicas, provistas por el ambiente, y las generadas por el reloj biológico, endógenas, en la determinación del crecimiento del hipocotilo. En este contexto, el trabajo desarrollado en esta tesis constituye un aporte para un mayor entendimiento de los efectos de la combinación de estas señales sobre la respuesta de inhibición del alargamiento del hipocotilo.

Hemos establecido que, de forma independiente de la luz, la temperatura elevada impacta directamente sobre algunos componentes del reloj biológico, ya sea: alterando la fase en la oscilación de abundancia de ARNm de genes rítmicos como *TOC1* y *CCR2* (Fig. 15B), provocando cambios transitorios de la expresión de genes como *PRR7* y *PRR9* (Fig. 21C), o generando ritmos de abundancia de ARNm en genes como *LHY* y *CCA1* (Fig. 21B). Por otra parte, hemos vinculado los efectos de la temperatura elevada con la sensibilidad al estímulo lumínico y el control del alargamiento del hipocotilo (Figs. 17B y 23). De manera que, accediendo al reloj biológico por una vía independiente de la luz, a través de la percepción de la temperatura, logramos un efecto sobre la modulación de las respuestas a las señales lumínicas.

Por lo tanto, los resultados presentados en este trabajo apoyan la idea de un modelo donde el reloj biológico y la maquinaria de elongación del hipocotilo son regulados por la luz separadamente, pero donde, además, la respuesta de elongación está sujeta a un efecto modulador del reloj (Nozue & Maloof, 2006).

Modelo De La Interacción De Señales Entre Luz y Temperatura Elevada

Los resultados presentados en esta tesis nos permiten proponer un modelo de interacción entre las señales de luz y temperatura elevada. Según este modelo, las plántulas etioladas que se encuentran en oscuridad bajo las primeras capas del suelo reciben breves exposiciones diarias a temperaturas elevadas debido a la carga de radiación (Fig. 1). Esta exposición genera cambios en los niveles de expresión de varios genes, induce a los genes *PRR7* y *PRR9* (Fig. 21C) y reprime a *LHY* y *CCA1* (Fig. 21B). El cambio transitorio en la expresión de estos genes pone en marcha el circuito autorregulado entre *PRR7/PRR9* y *LHY/CCA1* en condiciones de oscuridad.

Cuando las plántulas alcanzan la superficie y perciben la luz, ya presentan oscilaciones rítmicas de ARNm de *LHY* y *CCA1*, que dependen de *PRR7* y *PRR9* (Fig.22). Los niveles de abundancia mínima de *LHY* y *CCA1* corresponden a los momentos del día de mayor carga de radiación, período de exposición a temperaturas elevadas cuando las plántulas se encontraban en oscuridad. Por otra parte, la exposición a la luz provoca el aumento de Pfr phyB y su capacidad de provocar la inhibición del crecimiento del hipocotilo se manifiesta cuando los niveles de expresión de *LHY* y *CCA1* son bajos. De esta manera, la breve exposición diaria a temperaturas elevadas en condiciones de oscuridad preparan a las plántulas para responder a la luz, generándose momentos de mayor sensibilidad al Pfr phyB que se corresponden con las horas centrales del fotoperíodo, de modo que el gating por la acción de las temperaturas haría a las plántulas más sensibles a la luz de día que de noche (cuando normalmente no encontraría luz). Entonces, el mecanismo descrito en este trabajo podría contribuir a compensar las diferencias del ambiente lumínico, garantizándose el proceso de desetiología aún bajo circunstancias lumínicas muy pobres.

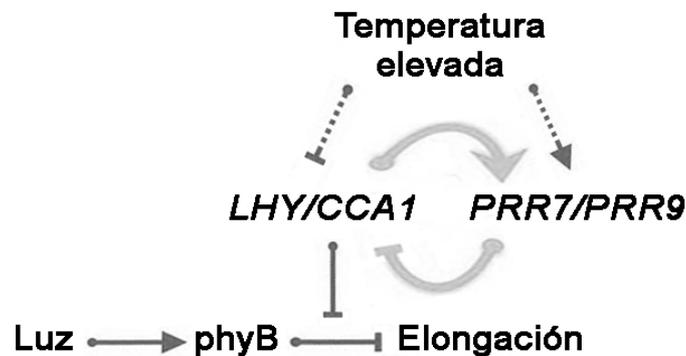


Figura 23. Modelo propuesto que explica la interacción entre las señales de temperatura elevada y luz descritas en este trabajo. Las flechas en punta indican una regulación positiva, las flecha de extremo romo indican una regulación negativa.

Tabla 1. Datos de microarreglos. Lista de genes con valores de $p < 0.05$ que cambian su expresión tres o más veces entre tratamientos.

ATG	Descripción	CR1	CR2	R1	R2	valor p
AT2G46790	APRR9 (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 9)	3,87	6,30	45,60	31,73	0,041
AT5G47220	ETHYLENE RESPONSE FACTOR 2	1,18	2,26	14,31	10,39	0,035
AT1G12010	ACC oxidase, putative	26,36	13,77	93,54	113,52	0,019
AT1G21520	L-ascorbate peroxidase	9,01	1,38	23,63	27,71	0,042
AT2G16070	ML domain-containing protein	15,33	38,76	104,30	106,81	0,022
AT4G38420	SKS9 copper ion binding	25,94	29,91	102,30	110,95	0,004
AT3G09440	heat shock cognate 70 kDa protein 3	195,50	176,29	775,37	628,25	0,020
AT3G19516	no_match	9,01	3,15	22,08	19,55	0,044
AT5G50260	cysteine proteinase, putative	11,54	7,67	32,07	28,94	0,014
AT4G14690	ELIP2 (EARLY LIGHT-INDUCIBLE PROTEIN 2)	149,25	177,38	530,71	485,90	0,006
AT2G27550	ATC (ARABIDOPSIS THALIANA CENTRORADIALIS)	19,71	26,76	65,02	72,29	0,012
AT2G46400	WRKY DNA-binding protein 46	13,65	10,13	39,72	30,39	0,043
AT2G32210	similar to unknown protein	87,60	84,80	226,24	274,52	0,021
AT1G01060	LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL)	8,84	12,20	31,73	28,38	0,014
AT2G32190	RNA and export factor binding protein	52,31	57,26	154,56	150,83	0,001
AT1G50280	phototropic-responsive NPH3 family protein	9,60	6,10	22,64	21,12	0,018
AT2G47890	Constans like/13 zinc finger family protein	147,06	150,62	53,26	68,27	0,008
ATCG00760	encodes a chloroplast ribosomal protein L36	2032,28	2267,42	1075,96	678,19	0,031
AT5G08230	PWWP domain-containing protein	31,25	36,79	10,43	16,76	0,040
AT3G20810	transcription factor jumonji (jmiC)	245,27	234,83	103,30	86,70	0,005
ATCG00150	Encodes a subunit of ATPase complex CF0	80,94	92,57	32,95	35,42	0,013
ATCG00550	PSII component	1298,47	1006,11	506,08	399,99	0,046
ATMG01200	hypothetical protein	20,13	24,79	6,77	10,73	0,046
AT1G30760	FAD-binding domain-containing protein	300,95	310,48	129,60	107,48	0,004
AT4G26270	phosphofructokinase family protein	52,56	58,24	21,30	21,00	0,007
AT5G47610	zinc finger family protein	687,14	712,85	304,91	229,38	0,008
AT2G22240	inositol-3-phosphate synthase isozyme 2	410,95	421,06	169,43	146,25	0,002
AT4G36420	ribosomal protein L12 family protein	36,39	40,24	13,76	15,31	0,008
AT2G30000	Identical to Uncharacterized protein At1g07170/At2g30000	235,76	207,77	71,57	95,19	0,017
AT2G40080	ELF4 (EARLY FLOWERING 4)	248,14	274,18	119,28	76,31	0,023
AT1G08630	THA1 (THREONINE ALDOLASE 1)	471,18	472,90	230,79	122,68	0,032
AT3G47860	apolipoprotein D-related	671,98	653,62	211,37	281,44	0,007
AT2G29090	CYP707A2 (cytochrome P450, family 707)	27,37	31,38	8,10	13,74	0,033
AT1G12710	ATPP2-A12 (PHLOEM PROTEIN 2-A12)	53,65	49,29	23,19	14,64	0,021
AT1G56300	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	658,08	657,95	272,85	204,02	0,007
AT2G29500	17.6 kDa class I small heat shock protein (HSP17.6B-CI)	649,57	677,92	216,81	251,72	0,003
AT5G12030	AT-HSP17.6A (Arabidopsis thaliana heat shock protein 17.6A)	639,21	664,45	243,66	204,91	0,003
AT1G66060	contains InterPro domain Protein of unknown function DUF577	17,01	16,82	5,88	5,59	0,000
AT1G03070	glutamate binding	74,63	70,54	20,31	28,04	0,008
AT3G62950	glutaredoxin family protein	21,73	21,84	5,55	8,94	0,013
AT2G32120	HSP70T-2; ATP binding	308,45	371,87	102,19	121,34	0,020
AT1G11340	S-locus lectin protein kinase family protein	21,56	20,56	6,10	7,71	0,004
AT1G53540	17.6 kDa class I small heat shock protein (HSP17.6C-CI)	387,79	427,75	125,94	128,93	0,005
AT1G77210	sugar transporter, putative	77,41	89,43	24,97	26,81	0,011
AT2G33790	pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	70,92	58,34	11,76	27,93	0,049
AT1G74460	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	26,45	25,38	6,21	9,61	0,010

AT1G17870	ATEGY3	108,15	127,30	30,74	40,22	0,016
AT1G21550	calcium-binding protein, putative	52,22	39,55	10,54	15,42	0,040
AT2G21660	ATGRP7 (COLD, CIRCADIAN RHYTHM, AND RNA BINDING 2)	3869,31	4129,62	998,40	1163,20	0,003
AT2G38465	similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO61577.1)	47,17	44,27	17,42	6,37	0,027
AT4G28390	AAC3 (ADP/ATP CARRIER 3); ATP:ADP antiporter/ binding	168,04	162,91	40,61	42,34	0,000
AT5G20230	ATBCB (ARABIDOPSIS BLUE-COPPER-BINDING PROTEIN)	438,16	597,45	126,38	108,38	0,038
AT1G52560	26.5 kDa class I small heat shock protein-like (HSP26.5-P)	132,24	158,78	33,29	30,50	0,014
AT4G21320	Encodes heat-stress-associated 32-kD protein	488,36	537,05	132,15	90,61	0,006
ATMG00690	hypothetical protein	37,14	38,76	3,11	13,18	0,028
AT1G71000	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	59,30	47,22	4,33	18,44	0,046
AT5G53870	plastocyanin-like domain-containing protein	325,80	274,97	46,94	81,11	0,016
AT1G78110	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G22230.1)	21,31	24,59	7,32	2,46	0,025
AT5G50240	no_match	51,55	45,35	7,21	13,41	0,013
AT5G42900	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G33980.1)	345,42	301,23	91,10	40,67	0,017
AT5G37670	15.7 kDa class I-related small heat shock protein-like (HSP15.7-CI)	358,90	303,00	60,03	65,70	0,011
AT4G10250	ATHSP22.0 (Arabidopsis thaliana heat shock protein 22.0)	567,79	576,89	85,55	97,32	0,000
AT1G62290	aspartyl protease family protein	904,20	1041,63	151,46	149,60	0,007
AT1G55610	BRL1 (BRI 1 LIKE); kinase	13,73	18,69	1,78	3,13	0,033
AT2G47180	ATGOLS1 (ARABIDOPSIS THALIANA GALACTINOL SYNTHASE 1)	1472,83	1623,34	232,57	225,13	0,003
AT4G23493	unknown protein	197,01	217,32	27,74	25,92	0,003
AT1G72660	developmentally regulated GTP-binding protein, putative	89,87	90,51	6,88	11,28	0,001
AT4G21323	subtilase family protein	22,49	26,76	3,66	1,01	0,012
AT5G59720	HSP18.2 (HEAT SHOCK PROTEIN 18.2)	3188,07	3235,95	63,47	65,81	0,000
AT3G09640	APX2 (ASCORBATE PEROXIDASE 2); L-ascorbate peroxidase	309,96	324,84	4,44	7,04	0,001
AT4G27670	HSP21 (HEAT SHOCK PROTEIN 21)	829,74	1056,97	13,98	2,46	0,014

En el trabajo que abarca el cuerpo central de esta tesis pudimos identificar un mecanismo que involucra a la temperatura elevada con la variación de la sensibilidad a los estímulos lumínicos. El desarrollo de esta investigación fue la derivación de una línea previa de trabajo que buscaba estudiar los mecanismos involucrados en el control de la sensibilidad a la luz que regulan el desarrollo en *Arabidopsis thaliana*. A pesar de haber contado con la identificación de un mutante con fenotipo muy interesante, a la fecha ha sido imposible establecer con certeza el gen mutado. A continuación se describen brevemente los resultados obtenidos y las dificultades encontradas para esta línea de trabajo.

I. ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio se ha demostrado que la desetiación en condiciones de flujos de luz muy bajos requiere de un potenciamiento de la sensibilidad mediada por la actividad sinérgica entre dos fotorreceptores: phyB y cry1, (Casal & Mazzella, 1998). Sin embargo, las bases moleculares y celulares de la regulación de la sensibilidad a la luz son mayormente desconocidas. Es por eso que en este trabajo se indagó específicamente en los mecanismos moleculares que subyacen a la determinación de la sensibilidad a estímulos lumínicos, usando como modelo la respuesta de desetiación en *Arabidopsis thaliana*.

II. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es la comprensión de los mecanismos moleculares que controlan la sensibilidad a los estímulos lumínicos que regulan el desarrollo. Para ello se buscará identificar genes involucrados en la regulación de la sensibilidad mediante genética directa. Luego se indagará sobre los procesos en que estos genes participan, así como también los mecanismos mediante los cuales actúan. En base a esto se enumeran los siguientes objetivos específicos:

1. Encontrar plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* que presenten un fenotipo hipersensible a las señales lumínicas.
2. Identificar los genes que causan la hipersensibilidad en dichos mutantes.
3. Caracterizar a nivel fisiológico y molecular la función de los genes identificados en el control de la sensibilidad a las señales lumínicas.

III. METODOLOGÍA

Material Vegetal

Se utilizaron semillas de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que llevan insertos de T-DNA (ADN de transferencia) al azar adquiridas en el Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) de la Universidad de Ohio. Se dispone de un total 23.600 semillas del ecotipo C24 que contienen una inserción de T-DNA “activation tagging” (R.Bresson & S. Yokoi). Estas líneas se denominan “activation tagging” porque contienen cuatro potenciadores de la transcripción 35S en tandem dentro del fragmento de T-DNA. Trabajar con este tipo de líneas permite, no sólo identificar mutantes por pérdida de función (debido a la interrupción de un gen por la inserción del T-DNA), sino que también, identificar mutantes con nivel o patrón de expresión génica alterada (debido a la acción del potenciador 35S sobre la transcripción de genes flanqueantes).

Selección de mutantes

Para realizar la búsqueda de mutantes, las semillas de *Arabidopsis* fueron sembradas sobre agar-agua 0.8% y dejadas en oscuridad a 4 °C durante 3 días, luego se les dio un pulso de luz roja para inducir su germinación. Durante tres días las plántulas fueron expuestas a un fotoperíodo de seis horas de luz blanca de 70µmol/m²/s. Al cuarto día se observaron los fenotipos de las plántulas. Bajo estas condiciones de luz de bajo flujo y fotoperíodo corto, se espera identificar plantas mutantes que presenten una respuesta hipersensible: hipocotilo corto, cotiledones expandidos, abiertos y verdes.

Se obtuvieron semillas de las plantas seleccionadas, y con ellas se realizaron las pruebas de post-selección. Estas consistieron en repetir el tratamiento inicial midiendo el largo del hipocotilo y el ángulo de apertura de los cotiledones con un control de oscuridad, el que se utilizó para relativizar los valores obtenidos en la luz. De esta manera se descartaron plantas cuyo fenotipo no correspondía a una hipersensibilidad al tratamiento lumínico. Así mismo, se estudió el fenotipo de los mutantes en la interacción sinérgica de phyB y cry1. Para ello las plantas fueron sometidas a tres condiciones: luz roja continua más tres horas de azul, luz roja continua, y tres horas de luz azul (Casal & Mazzella, 1998, Sellaro *et al.*, 2009).

Identificación del gen mutado

Se utilizó la técnica TAIL-PCR (Liu & Huang, 1998) que consiste en la utilización de un set de tres cebadores específicos para el vector de transferencia y un

set de cebadores degenerados para el genoma de *Arabidopsis*, para amplificar secuencias específicas flanqueantes a la inserción de T-DNA. Otra técnica utilizada fue la de PCR invertida que se basa en la digestión parcial con enzimas de restricción y cebadores específicos para recuperar las zonas adyacentes al inserto de T-DNA. De esta manera pudieron amplificarse, purificarse y secuenciarse fragmentos correspondientes a regiones de ADN que flanquean la inserción. En base a la utilización de la herramienta de BLAST disponible en la página web del ABRC, se pudieron identificar y localizar las secuencias amplificadas en el genoma de *Arabidopsis*. Luego se estudió si existía una co-segregación entre el fenotipo observado y la inserción de T-DNA identificada. Posteriormente se adjudicó el fenotipo observado o bien a la interrupción del gen donde se insertó el T-DNA (inserción intragénica), o a la sobreexpresión de genes cercanos a la inserción (inserción intergénica). Como primer acercamiento se midió la expresión de genes cercanos a la inserción utilizando PCR semi-cuantitativa para identificar alteraciones en los patrones de expresión.

IV. RESULTADOS

Búsqueda de mutantes

Durante tres días las plántulas fueron expuestas a un fotoperíodo de seis horas de luz blanca de $70\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Al cuarto día se observaron los fenotipos de las plántulas y se seleccionaron aquellas con fenotipos de hiper e hipo sensibilidad al tratamiento de luz. Utilizando este protocolo, de las 23.600 semillas disponibles se seleccionaron 350 plantas y se obtuvieron semillas de 230 de éstas, con las que se realizaron las pruebas de post-selección. De esta manera se confirmaron 14 mutantes

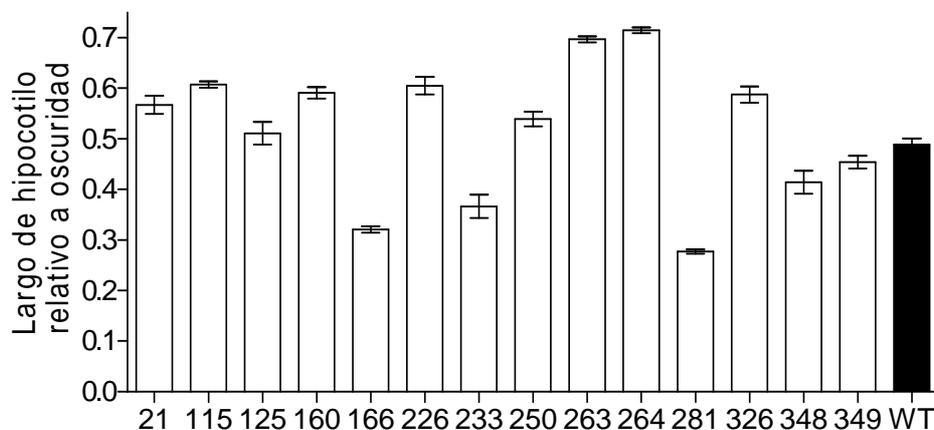


Figura 24. Largo de hipocotilo de los mutantes confirmados bajo el protocolo de selección. WT, genotipo salvaje del ecotipo C24.

cuyo fenotipo era atribuible a la sensibilidad que presentaban en respuesta al tratamiento lumínico (Fig. 24).

Caracterizaciones fenotípicas

Luego de confirmar el fenotipo de los mutantes bajo el tratamiento de selección, se procedió a estudiar su fenotipo de desetiología bajo distintas condiciones lumínicas. En primer lugar se estudió el fenotipo de desetiología de los mutantes seleccionados bajo condiciones de luz roja y azul continua, dado que las condiciones lumínicas utilizadas para la selección de mutantes fueron de luz blanca, que es un ambiente lumínico enriquecido en luz roja y azul. Como se muestra en la figura 25, se encontraron mutantes hipersensibles a la luz roja (mutantes 348 y 349); hiposensibles a la luz roja (mutantes 115, 125, 160, 226, 263, 264 y 326); levemente hipersensibles a la luz azul (mutantes 115 y 160); hiposensibles a la luz azul (mutantes 263, 264, 326, 348 y 349) e hipersensibles a ambas calidades de luz (mutantes 166, 233 y 281).

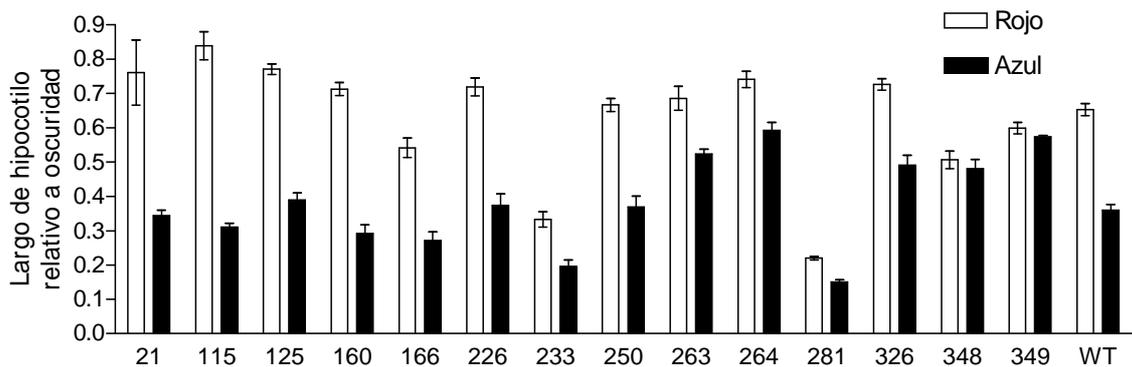


Figura 25. Largo de hipocotilo relativo a oscuridad, bajo tratamientos de luz roja continua y de luz azul continua. WT, genotipo salvaje del ecotipo C24.

Además, se estudió el fenotipo de desetiología de los mutantes confirmados bajo un protocolo de condiciones de luz donde se favorece la interacción sinérgica de phyB y cry1, esto es, exposición continua a luz roja, suplementada con tres horas de luz azul diariamente (R-A). Durante tres días las plántulas fueron expuestas a este tratamiento y tres condiciones más que actúan como controles: luz roja continua (R), sólo tres horas de luz azul por día (A) y oscuridad. Con estos datos pudo calcularse el efecto aditivo de la luz azul, que sería la suma del valor de inhibición bajo luz roja continua y la inhibición bajo tres horas de luz azul. La diferencia entre este valor y el obtenido por la medición del tratamiento que combina rojo continuo y tres horas de

azul define la magnitud de la coacción entre phyB y cry1. Mediante este protocolo se encontraron fenotipos de pérdida o disminución del efecto sinérgico entre phyB y cry1 en los mutantes 233, 263, 281 y 326, y un mutante en que el efecto sinérgico era de mayor magnitud, 348 (Fig. 26).

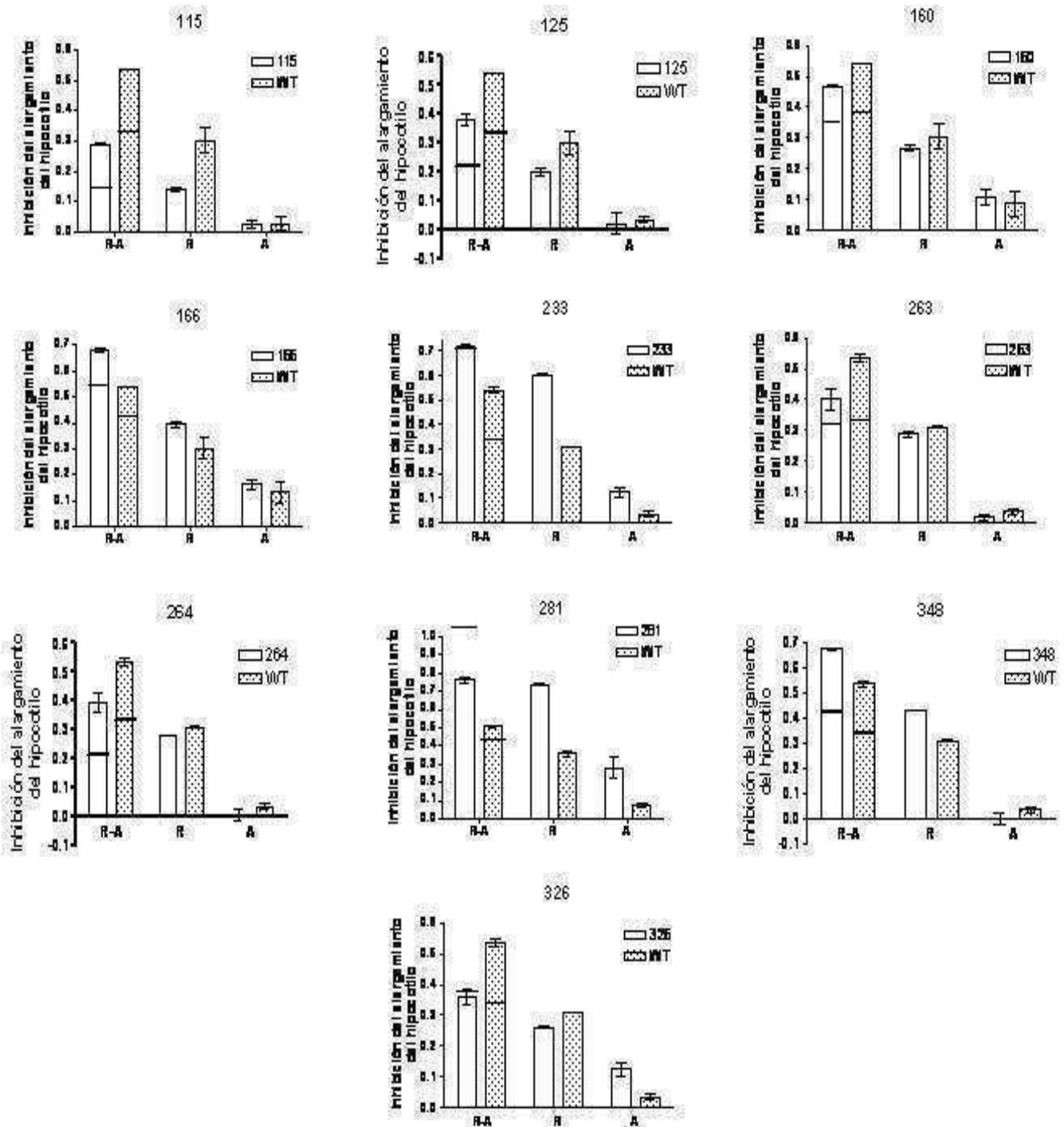


Figura 26. Inhibición del alargamiento del hipocotilo relativo a oscuridad de los mutantes confirmados, para los tratamientos lumínicos de rojo continuo más tres horas de azul diarias (RA), rojo continuo (R) y tres horas de luz azul (A). Las líneas transversales sobre las barras indican el valor teórico de una interacción aditiva.

Otras caracterizaciones realizadas son los estudios del tiempo a floración (medido como número de hojas en la roseta) en condiciones de día largo y de día corto. De todos los mutantes analizados, el 125 presentó un fenotipo muy marcado de floración temprana bajo ambos fotoperíodos (Fig. 27) y el mutante 233 sólo en condiciones de día largo.

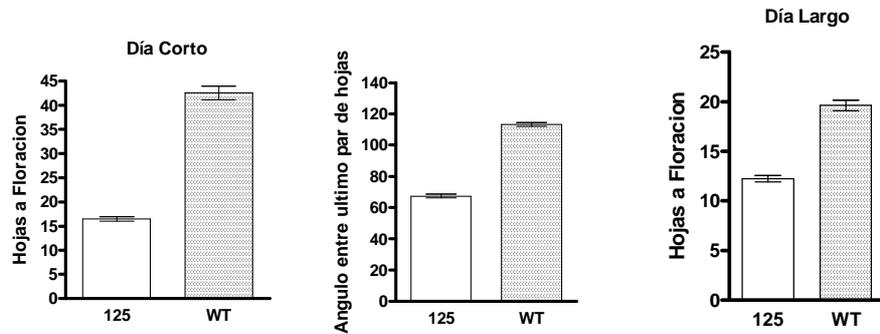


Figura 27. Fenotipo de tiempo a floración y ángulo entre el primer par de hojas correspondiente al mutante 125. Día corto corresponde a un fotoperíodo de 6 h de luz blanca de $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Día largo corresponde a un fotoperíodo de 16 h de luz blanca de $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

c- Identificación del sitio de inserción del T-DNA

Habiendo confirmado el fenotipo de los mutantes seleccionados y comenzado con su caracterización, se utilizaron técnicas moleculares para identificar la región del genoma en donde se haya la inserción de T-DNA en cada mutante. Se encontró una inserción de T-DNA en el cromosoma I para los mutantes 166 y 326, una en el cromosoma II para el mutante 281 y una inserción en el cromosoma III para los mutantes 115, 125, 233 y 348.

d- Confirmación del efecto de la inserción

Para confirmar la participación de la zona donde se encuentra el transgen en la generación del fenotipo observado, se realizaron estudios de co-segregación. Se genotiparon un mínimo de 50 plantas descendientes de una planta heterocigota para la inserción de T-DNA. Mediante el estudio de co-segregación se identificó a las mutaciones en 166 y 326 como de carácter dominante, mientras que en 281 como de carácter recesivo. Para cada mutante se eligieron genes candidatos próximos al sitio de inserción y se estudió si existían alteraciones en los niveles de expresión comparado con las plantas salvajes. Se realizaron RT-PCR utilizando primers

específicos que amplifican aproximadamente 500pb de la secuencia del mensajero del gen candidato. En el caso del mutante 166 se encontraron niveles menores de expresión para el gen *LHY*, en el mutante 326 se identificaron niveles menores del gen *ARGONAUTA 1* y se observó una sobre-expresión del gen *Atg28000* en el mutante 281 (Fig. 28). Las relaciones de *LHY* y *ARGONAUTA* con las respuestas a la luz han sido previamente caracterizadas (Mizoguchi *et al.*, 2002; Sorina *et al.*, 2005). En tanto que el gen *At2g28000* codifica para la chaperonina-60 α involucrada en el plegado y ensamblaje de proteínas importadas al cloroplasto. Se ha reportado el mutante knock out para este gen, *schlepperless (slp)*. Según Apuya *et al.*, 2001, la mutación *slp* causa un retardo en el desarrollo del embrión, produciendo embriones defectivos con cotiledones muy pequeños que no pueden desarrollar los plástidos de manera normal, generándose una plántula inviable con cotiledones blancos. Esta descripción sería concordante con la sobre-expresión del gen y el fenotipo observado en el mutante 281. Sin embargo, la imposibilidad de trabajar con las líneas mutantes knock out, plantea un problema para la confirmación del gen involucrado.

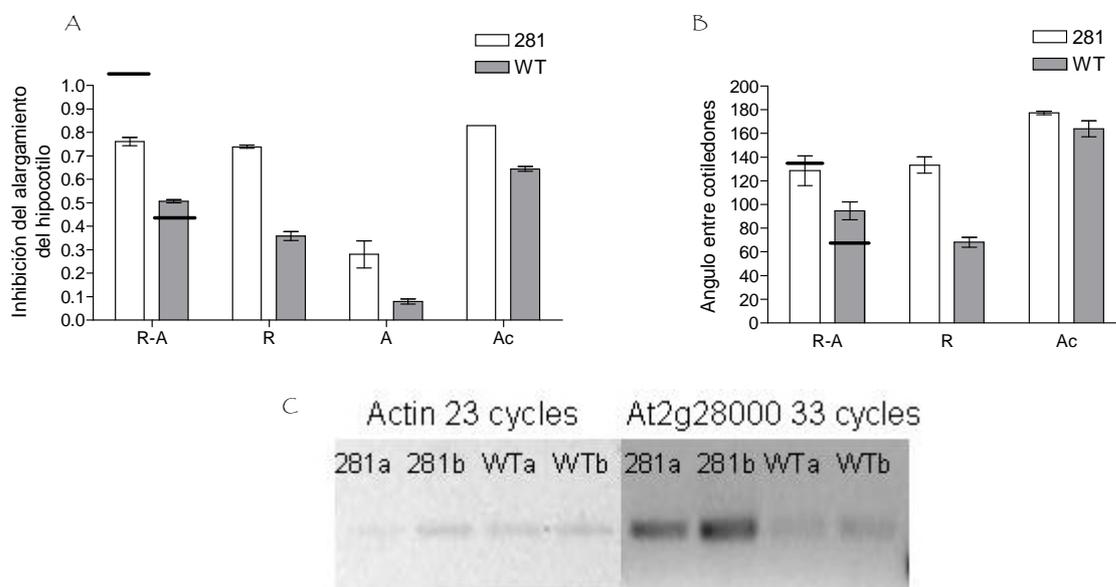


Figura 28. Caracterizaciones fenotípicas del mutante 281. A, inhibición del alargamiento del hipocotilo relativo a oscuridad bajo distintas condiciones lumínicas. B, ángulo de apertura de cotiledones bajo distintas condiciones lumínicas. C, sobreexpresión del gen *At2g28000* por RT-PCR. R-A: exposición continua a luz roja, suplementada con tres horas de luz azul diariamente, R: luz roja continua, A: tres horas de luz azul por día, Ac: luz azul continua

A través de la información disponible en el ABRC, se vio que la expresión de dicho gen es inducida por tratamientos de estrés por temperatura. Trabajando con datos de expresión del transcriptoma de *Arabidopsis* bajo condiciones lumínicas donde se favorece la interacción sinérgica de phyB y cry1 (baja irradiancia de luz roja y azul), se identificaron varios genes relacionados al estrés por temperatura cuya expresión dependía de la presencia de uno o ambos fotorreceptores. Teniendo en cuenta estos datos junto con el hecho que la posible sobre-expresión de un gen inducible por calor (At2g28000) causara un fenotipo de hipersensibilidad a la luz, se decidió estudiar el efecto de la temperatura sobre la sensibilidad a los estímulos lumínicos que regulan el desarrollo.

e- Caracterización molecular del mutante 281

Dado el carácter recesivo de la mutación 281, se estudió si la sobre-expresión del fragmento de 500pb podría ser en realidad la sobre-expresión de un transcripto truncado no funcional. Para ello, se utilizó RT-PCR con primers que hibridan en los UTRs y amplifican la secuencia completa del mensajero del gen At2g28000 (1800 pb aproximadamente). Los resultados mostraron más de un tamaño de banda como producto de la amplificación. Esto podría deberse a la presencia de más de una isoforma del gen At2g28000. Para estudiar esta posibilidad, se utilizó la técnica de Northern Blot, marcando la sonda correspondiente al mensajero completo con P³². De esta manera se evita el paso de amplificación y podríamos identificar y cuantificar los niveles de las distintas isoformas del gen. Se utilizaron extracciones de ARN de plantas de genotipo WT homocigota, heterocigotas y homocigotas mutante, todas segregantes de una planta heterocigota para la inserción 281. Los resultados mostraron que, contrariamente a lo observado por RT-PCR, no existe más de una isoforma para el mensajero del gen At2g28000, y tampoco una diferencia en los niveles de expresión entre los genotipos (Fig. 29). Esta falta de diferencia de expresión se toma como cierta, por el contrario, el primer indicio de sobre-expresión se debería a haber usado plantas salvajes del ecotipo C-24, que no provenían de la línea mutante. Por lo tanto, se descartó la implicancia del gen At2g28000 en el fenotipo de hipersensibilidad lumínica observado en el mutante y hasta la fecha no ha podido identificarse una alteración génica como responsable del fenotipo.

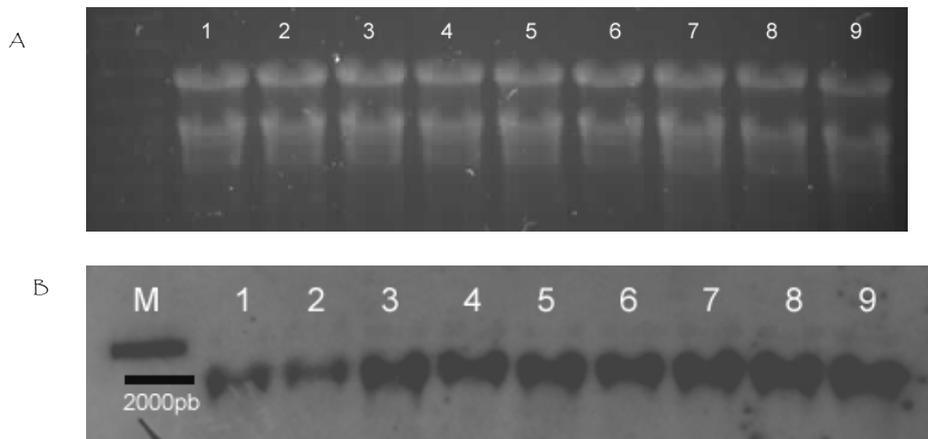


Figura 29. Northern Blot realizado con sonda correspondiente al mensajero completo (1800pb) del gen At2g28000. A) Control de carga de RNA. B) Placa de revelada luego de la transferencia y exposición. 1, 2 y 3 plantas de genotipo salvaje; 4,5 y 6 plantas heterocigotas; 7,8 y 9 plantas homocigotas mutantes.

V. CONCLUSIONES

En esta línea de trabajo se han identificado mutantes que resultarán útiles para estudios futuros relacionados al control de la sensibilidad a los estímulos lumínicos que regulan el desarrollo en *Arabidopsis*. Contamos con caracterizaciones fenotípicas sobre el proceso de desetiología bajo distintas calidades de luz y en floración bajo distintos fotoperíodos para varios de estos mutantes. En primer lugar, debería continuarse la búsqueda del gen responsable del fenotipo del mutante 281. Además, se han identificado inserciones en el cromosoma III para los mutantes 115, 125, 233 y 348, para las cuales deberían realizarse los estudios de co-segregación que nos permitan relacionar el fenotipo a la inserción de T-DNA.

- Alabadí, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Más, P. & Kay, S.A. (2001) Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 293: 880-883
- Anderson, S.L., Somers, D.E., Millar, A.J., Hanson, K., Chory, J. & Kay, S.A (1997) Attenuation of phytochrome A and B signaling pathways by the *Arabidopsis* circadian clock. *The Plant Cell* 9:1727-1743
- Andronis, C., Barak, S., Knowles, S.M., Sugano, S. & Tobin E. (2008) The clock protein CCA1 and the bZIP transcription factor HY5 physically interact to regulate gene expression in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 1: 58-67
- Apuya, N.R., Yadegari, R., Fischer, R.L., Harada, J.J., Zimmerman, J.L. & Goldberg, R.B. (2001) The *Arabidopsis* embryo mutant *schlepperless* has a defect in the *chaperonin-60* gene. *Plant Physiol.* 126: 717-730
- Bauer, D., Viczian, A., Kircher, S., *et al.* (2004) Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 1433-1445
- Binelli, G., Mascarenhas, J.P. (1990) *Arabidopsis*: Sensitivity of growth to high temperature. *Develop. Gen.* 11(4): 294-298
- Casal, J.J., Luccioni, L.G., Oliverio, K.A. & Boccalandro, H.E. (2003) Light, phytochrome signalling and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2: 625-636
- Casal, J. J., & M. A. Mazzella (1998) Conditional synergism between cryptochrome 1 and phytochrome B is shown by the analysis of *phyA*, *phyB*, and *hy4* simple, doble, and triple mutants in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118:19-25.
- Casal, J.J. & Yanovsky, M.J. (2005) Regulation of gene expression by light. *Int. J. Dev. Biol.* 49: 501-511
- Clarke, S.M., Mur, L.A., Wood, J.E. & Scott, I.M. (2004) Salicylic acid dependent signalling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 38:432-447
- Covington, M.F. & Harmer, S.L. The circadian clock regulates auxin signalling and responses in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* 5(8): e222
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K. & Scheible, W-R. (2005) Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in *Arabidopsis*. *Plant Phys.* 139: 5-17

- 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
- Deng, X.W., Caspar, T. & Quail, P.H. (1991) *cop1*: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Develop* 5: 1172-1182
- Dowson-Day, M.J. & Millar, A.J. (1999) Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyls elongation patterns in *Arabidopsis*. *Plant J.* 17: 63-71
- Edwards, K. D., Lynn, J.R., Gyula, P., Nagy, F. & Millar, A.J. (2005) Natural allelic variation in the temperature-compensation mechanisms of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Genetics* 170: 387-400
- Falcone, D.L., Ogas, J.P. & Somerville, C.R. (2004) Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biol.* 4:17
- Fankhauser, C. & Casal, J.J. (2004) Phenotypic characterization of a photomorphogenic mutant. *Plant J.* 39: 747-60
- Farré, E.M., Harmer, S. L., Harmon, F.G., Yanovsky, M.J. & Kay, S.A. (2005) Overlapping and distinct roles of *PRR1* and *PRR9* in the *Arabidopsis* circadian clock. *Curr. Biol.* 15: 47-54
- Fowler, S., Lee, S., Onouchi, H., Samarch, A., Richardson, K., Morris, B., Coupland G. & Putterill, J. (1999) *GIGANTEA*: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO J.* 18: 4679-4688
- Franklin, K.A. (2009) Light and temperature signal crosstalk in plant development. *Curr. Op.Plant Biol.* 12: 63-68
- Gardner, M.J., Hubbard, K.E., Hotta, C.T., Dodd, A.N. & Webb, A.R. (2006) How plants tell the time. *Biochem. J.* 397: 15-24
- Gould, P.D., Locke, J.C., Laure, C. et al. (2006) The molecular basis of temperature compensation in the *Arabidopsis* circadian clock. *The Plant Cell* 18: 1177-1187
- Gray, W.M., Östin, A., Sandberg, G., Romano, C.P., and Estelle, M. (1998) High temperature promotes auxin-mediated hypocotyls elongation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7197-77202
- Guo, H., Duong, H., Ma, N. & Lin, C. (1999). The *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism. *Plant J.* 19: 279-287

- Hall, A., Bastow, R.M, Davis, S.J., Hanano, S., McWatters, H.G., Hibberd, V., Doyle, M.R., Sung, S., Halliday, K.J., Amasino, R.M. & Millar, A.J. (2003) The *TIME FOR COFFEE* gene maintains the amplitude and timing of *Arabidopsis* circadian clocks. *The Plant Cell* 15: 2719-2729
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B, Straume, M., Chang, H.S. Han, B., Zhu, T., Wang., X., Kreps, J.A. & Kay, S.A. (2000) Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290: 2110-2113
- Hartmann, U., Sagasser, M., Mehrrens, F., Stracke, R. & Weisshaar, B. (2005) Differential combinatorial interactions of ACE-, MRE- and RRE-binding transcription factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Mol. Biol.* 57:155-171
- Hazen, S.P., Schultz, T.F., Pruneda-Paz, J.L., Borevitz, J.O., Ecker, J.R. & Kay, S.A. (2005) LUX ARRHYTHMO encodes a Myb-domain protein essential for circadian rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 10387-10392
- Heschel, S.M., Selby, J., Butler, C., Whitelam, G.C., Sharrock, R.A & Donohue, K. (2007) A new role for phytochromes in temperature-dependent germination. *New Phytol.* 174: 735-741
- Holm, M., Ma, L.G., Qu, L.J. & Deng, X.W. (2002) Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes & Dev.* 16: 1247- 1259
- Hong, S.W. & Vierling, E. (2000) Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4392-4397
- Hotta, C.T., Gardner, M.J., Hubbard, K.E., Baek, S.J., Dalchau, N., Suhita, D., Dodd, A.N. & Webb, A.A. (2007) Modulation of environmental responses of plants by circadian clocks. *Plant, Cell & Env.* 30: 333-349
- Huq, E., Tepperman, J.M., & Quail, P.H. (2000) GIGANTEA is a nuclear protein involved in phytochrome signalling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9789-9794
- Jarillo, J.A., Capel, J., Tang, R.H., Yang, H.Q., Alonso, J.M., Ecker, J.R. & Cashmore, A.R. (2001). An *Arabidopsis* circadian clock component interacts with both CRY1 and PHYB. *Nature* 410: 487-490
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M. & Cossart, P. (2002) An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110: 551-561

- Kikis, E.A., Khanna, R. & Quail, P.H. (2005) ELF4 is a phytochrome-regulated component of a negative feedback loop involving the central oscillator components CCA1 and LHY. *The Plant Journal* 44: 300-313
- Khanna, R., Kikis, E.A., and Quail, P.H. (2003) EARLY FLOWERING 4 functions in phytochrome B-regulated seedling de-etiolation. *Plant Physiol.* 133: 1530-1538
- Koini, M.A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C.A., Harberd, N.P., Whitelam, G.C., and Franklin, K.A. (2009) High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Current Biology* 19: 408-413
- Kozma-Bognár, L., Hall, A., Adam, E., Thain, S.C., Nagy, F. & Millar, A.J. (1999) The circadian clock controls the expression pattern of the circadian input photoreceptor, phytochrome B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14652-14657
- Larkindale, J., Hall, J.D., Knight, M.R. & Vierling, E. (2005) Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol.* 138: 882-897
- Lee, J., He, K., Stolc, V., Lee, H., Figueroa, P., Gao, Y., Tongprasit, W., Zhao, H., Lee, I. & Deng, X.W. (2007) Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *Plant Cell* 19: 731-749
- Leivar, P., Monte, E., Oka, Y., Liu, T., Carle, C., Castillon, A., Huq, E. & Quail, P. (2008) Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Curr. Biol.* 18: 1815-1823
- Lin, C. & Shalitin, D. (2003) Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 469-496
- Liu Y-G. & Huang, N. (1998) Efficient amplification of insert end sequences from bacterial artificial chromosome clones by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant Mol. Biol.* 16: 175-181
- Liu, X.L., Covington, M.F., Fankhauser, C., Chory, J., & Wagner, D.R. (2001) ELF3 encodes a circadian clock regulated nuclear protein that functions in an *Arabidopsis* PHYB signal transduction pathway. *Plant Cell* 13: 1293-1304
- Locke, J.C., Millar, A.J., & Turner, M.S. (2005) Modeling genetic networks with noisy and varied experimental data: the circadian clock in *Arabidopsis thaliana*. *J. Theor. Biol.* 234: 383-393
- Locke, J.C., Kozma-Bognár, L., Gould, P.D., Fehér, B., Kevei, É., Nagy, F., Turner, M.S., Hall, A. & Millar, A.J. (2006) Experimental validation of a predicted

- feedback loop in the multi-oscillator clock of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Sys. Biol.* 2: 59
- Mansilla, M.C., Cybulski, L.E., Albanesi, D. & de Mendoza, D. (2004) Control of membrana lipid fluidity by molecular thermosensors. *J. Bacteriol.* 186: 6681-6688
- Más, P., Kim, W.Y., Sommers, D.E. & Kay, S.A. (2003) Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 426: 567-570
- Martinez-García, J.F., Huq, E. & Quail, P.H. (2000) Direct targeting of Light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288: 859-863
- Mazzella, M.A., Bertero, D. & Casal, J.J. (2000) Temperature-dependent internode elongation in vegetative plants of *Arabidopsis thaliana* lacking phytochrome B and cryptochrome 1. *Planta* 210: 497-501
- Mazzella, M.A. & Casal, J.J. (2001) Interactive signaling by phytochromes and cryptochromes generates de-etiolation homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Env.* 24: 155-161
- McWatters, H.G., Bastow, R.M., Hall, A. & Millar, A.J. (2000) The *ELF3 zeitnehmer* regulates light signaling to the circadian clock. *Nature* 408: 716-720
- Millar, A.J. (2004) Input signals to the plant circadian clock. *J. Exp. Bot.* 55: 277-283
- Millar, A.J. & Kay, S.A. (1996) Integration of circadian and phototransduction pathways in the network controlling CAB gene expression in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15491-15496
- Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y., Wright, L. Mizoguchi, M. Song, H.R., Carré, I.A & Coupland, G. (2002) *LHY* and *CCA1* are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* 2: 629-641
- Mizuno, T & Nakamichi, N. (2005) Pseudo response regulators (PRRs) or true oscillators components (TOCs). *Plant Cell Physiol.* 46: 677-685
- 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
- Nozue, K., Covington., M.F., Duek, P.D. Lorrain, S., Fankhauser, C., Harmer, S.L. & Maloof, J.N. (2007) Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* 448: 358-361
- Nozue, K. & Maloof, J.N. (2006) Diurnal regulation of plant growth. *Plant, Cell & Env.* 29: 396-408

- Osterlund, M.T., Hardtke, N.W. & Deng, X.W. (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* 405: 462-466
- Oyama, T. Shimura, Y. & Okada, K. (1997) The *Arabidopsis* HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes & Dev.* 11: 2983-2995
- Parks, B.M., Folta, K.M. & Spalding E.P. (2001) Photocontrol of stem growth. *Curr. Op. Plant. Biol.* 4: 436-440
- Penfield, S. (2008) Temperature perception and signal transduction in plants. *New Phytol.* 179: 615-628
- Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., 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
- Reed, J.W., Nagatani, A., Elich, T.D., Fagan, M. & Chory, J. (1994) Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in *Arabidopsis* development. *Plant Physiol.* 104: 1139-1149
- Rosenzweig, M., Brennan, K.M., Tayler, T.D., Phelps, P.O., Patapoutian, A. & Garrity P.A. (2005) The *Drosophila* ortholog of vertebrate TRPA1 regulates thermotaxis. *Genes Dev.* 19: 419-424
- Salomé, P.A. & McClung, C.R. (2005) PRR7 and PRR9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 17: 791-803
- Salomé, P.A., Xie, Q., McClung, C.R. (2008) Circadian timekeeping during early *Arabidopsis* development. *Plant Physiol.* 147: 1110-1125
- Salter, M.G., Franklin, K.A. & Whitelam G.C. (2003) Gating of the rapid shade avoidance response by the circadian clock in plants. *Nature* 426: 680-683
- Scopel, A.L., Ballaré, C.L. & Sanchez, R.A. (1991) Induction of extreme light sensitivity in buried weed seeds and its role in the perception of soil cultivations. *Plant, Cell & Env.* 14: 501-508
- Sellaro, R., Hoecker, U., Yanovsky, M., Chory, J. & Casal, J.J. (2009) Synergism of Red and Blue Light in the Control of *Arabidopsis* Gene Expression and Development. *Curr. Biol.* In Press, Corrected Proof, Available online
- Shin, J., Park, E. & Choi, G. (2007) PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in *Arabidopsis*. *Plant J.* 49: 981-994

- Smith, H. (2000) Phytochromes and light signal perception by plants-an emerging synthesis. *Nature* 407: 585-591
- Song, H.R. & Carré, I.A. (2005) DET1 regulates the proteasomal degradation of LHY, a component of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Mol. Biol.* 57: 761-771
- Sorina, C., Bussellb, J.D., Camusa, I., Ljungb, K., Kowalczykb, M., Geissb, G., McKhanna H., Garciona, Ch., Vauchereta, H., Sandbergb, G. & Bellinia, C. (2005) Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require *ARGONAUTE1*. *The Plant Cell* 17: 1343-1359
- Stavang, J.A., Lindgard, B., Erntsen, A., Lid, S.E., Moe, R. & Olsen, J.E. (2005) Thermoperiodic stem elongation involves transcriptional regulation of gibberellin deactivation in pea. *Plant Physiol.* 138: 2344-2353
- Toh, S., Imamura, A., Watanabe, A., Nakabayashi, Okamoto, M., Jikumaru, Y., Hanada, A., Aso, Y., Ishiyama, K., Tamura, N. et al. (2008) High temperatura-induced abscisic acid biosintesis and its role in the inhibition of gibberelin action in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol.* 146: 1368-1385
- Tóth, R., Kevei, É., Hall, A., Millar, A.J., Nagy, F. & Kozma-Bognár, L. (2001) Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127: 1607-1616
- Vierling, E. (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 579-620
- Volkov, R.A., Panchuk, I.I., Mullineaux, P.M. & Schöffl, F. (2006) Heat stress – induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock factors in *Arabidopsis*. *Plant Mol.Biol.* 61: 733-746
- Wang, Z.Y. & Tobin, E.M. (1998) Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 93: 1207-1217
- Zagotta, M.T., Hicks, K.A., Jacobs, C.I, Young, J.C, Hangarter, R.P. & Meeks-Wagner, D.R. (1996) The *Arabidopsis* ELF3 gene regulates vegetative photomorphogenesis and the photoperiodic induction of flowering. *Plant J.* 10: 691-702