

Tesis Doctoral

# Integración dinámica de señales ambientales en Arabidopsis thaliana

Sellaro, Romina

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sellaro, Romina. (2009). Integración dinámica de señales ambientales en Arabidopsis thaliana. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sellaro, Romina. "Integración dinámica de señales ambientales en Arabidopsis thaliana". 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  
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

# INTEGRACIÓN DINÁMICA DE SEÑALES AMBIENTALES EN *Arabidopsis thaliana*

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

**ROMINA SELLARO**

*Director de tesis: Dr. Jorge Casal*

*Consejero de Estudios: Dra. Viviana Confalonieri*

Lugar de trabajo: IFEVA, Facultad de  
Agronomía Universidad de Buenos Aires  
Buenos Aires, 2009

# ÍNDICE

---

	Página
PÁGINA DEL JURADO .....	1
RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
INTRODUCCION.....	5
Las plantas y la percepción de la luz.....	5
Los fitocromos.....	6
Los criptocromos.....	8
Interacción entre fotorreceptores.....	9
Sinergismo entre phyB y cry1 .....	10
Elementos de las vías de señalización de los fotorreceptores .....	10
Respuestas desencadenadas por la presencia de plantas vecinas .....	13
Implicancia de los PIFs en respuestas de escape al sombreado .....	15
Conexión entre las vías de señalización de hormonas y las respuestas de escape al sombreado .....	16
OBJETIVOS.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Tratamientos lumínicos .....	20
Acción sinérgica entre luz roja y luz azul.....	20
Señales fluctuantes de sombreado vegetal .....	21
Material vegetal.....	21
Mediciones del largo final del hipocotilo y ángulo entre los cotiledones .....	22
Mediciones de la tasa de crecimiento del hipocotilo.....	22
Tratamiento con Picloram .....	23
Extracción de ADN genómico de plantas .....	23
Clonado de la mutante277F y genotipeado .....	24
Extracción de ARN y cuantificación de la expresión por RT-PCR .....	24
Expresión global de genes.....	24
Acción sinérgica entre luz roja y luz azul.....	25
Señales fluctuantes de sombreado vegetal .....	26
Extracción de proteínas y western blotting de HY5 .....	27
RESULTADOS PARTE 1: Interacción sinérgica entre phyB y cry1 .....	28
El sinergismo entre phyB y cry1 genera histéresis en la expresión de genes.....	28

El sinergismo entre phyB y cry genera histéresis en la inhibición del crecimiento del hipocotilo .....	31
La activación de cry1 recluta nuevos genes para el control de phyB.....	33
La inhibición del hipocotilo en el sinergismo entre phyB y cry requiere de SPA1 y HY5/HYH.....	34
phyB no es necesario par la estabilización de la proteína HY5.....	38
El sinergismo induciría la transición a la fotoautotrofia.....	39
RESULTADOS PARTE 2: Integración de la información provista por períodos alternados de luz solar plena o sombra.....	41
Respuesta fisiológica a señales fluctuantes de sombreado vegetal .....	41
Análisis global de cambios de expresión génica en condiciones fluctuantes de sombreado vegetal .....	44
Regulación de hormonas en la integración de la información recibida en condiciones fluctuantes de sombra y luz solar plena.....	46
Regulación transcripcional en la integración de la información recibida en condiciones fluctuantes de sombra y luz solar plena.....	49
Búsqueda de mutantes que afectan en la integración temporal .....	54
DISCUSIÓN.....	58
Interacción sinérgica entre phyB y cry1 .....	58
El sinergismo entre phyB y cry1 genera histéresis en la expresión de genes y los procesos fisiológicos .....	58
cry refuerza la señalización mediada por phyB.....	59
HY5 y HYH actúan en conjunto para mediar la respuesta sinérgica entre phyB y cry1 .....	60
Nueva función para los genes SPA durante el sinergismo entre phyB y cry1 .....	60
Ausencia de histéresis en la expresión de HY5, HYH, SPA1 y SPA4 durante el sinergismo entre phyB y cry1 .....	61
La respuesta sinérgica entre phyB y cry1 no se debe a un aumento en la estabilidad de la proteína HY5 .....	62
El sinergismo entre phyB y cry1 induce la transición y permanencia a la autotrofia.....	62
Integración de la información provista por períodos alternados de luz solar plena o sombra.....	63
Señales fluctuantes de sombra y luz plena .....	63
El papel de las hormonas .....	64
El papel de las proteínas PIF .....	66
El papel de HY5 .....	67
El papel de LHY .....	69
La convergencia adecuada de las señales determina la correcta integración .....	70
REFERENCIAS .....	73
ANEXO .....	81

## **PÁGINA DE JURADO**

---

## RESUMEN

---

### **Integración dinámica de señales ambientales en *Arabidopsis thaliana***

Las plantas han desarrollado complejos sistemas que les permiten percibir el ambiente lumínico. Los resultados expuestos en este trabajo proponen mecanismos por los cuales la compleja red de señalización regula el crecimiento de las plántulas integrando señales lumínicas. El primero se refiere a la acción sinérgica de la luz azul y la luz roja. En plántulas de *Arabidopsis* cultivadas en luz roja (condición que activa a phyB), un corto suplemento de luz azul activa a cry1 generado así una respuesta sinérgica. En esta tesis encontré que el mecanismo de integración implica la activación de reguladores positivos como HY5, HYH, SPA1 y SPA4 por medio de los criptocromos al percibir una señal transitoria de luz azul. Luego de esta señal, los genes *HY5*, *HYH*, *SPA1* y *SPA* refuerzan la señalización mediada por phyB. Como phyB se mantiene activo en oscuridad, el sinergismo permite la persistencia de los procesos que llevan a la autotrofia durante la noche. En la segunda parte, investigué la integración de señales fluctuantes de sombreado vegetal. Cuando una plántula crece en sombra, distintos genes de respuesta a hormonas y genes involucrados en la señalización de la luz como *PIF4*, *PIF5* (que promueven el alargamiento del hipocotilo) aumentan su expresión. Cuando una plántula que estaba creciendo en sombra percibe luz no filtrada por plantas vecinas, aumentan los niveles de expresión de *HY5*. *HY5* podría regular negativamente la señalización de auxinas e inhibir la expresión de reguladores positivos del crecimiento como son *PIF4*, *PIF5*, *HAT2*, *PKS4*, *LHY* y *CCA1* evitando que se genere la respuesta máxima a la sombra. En ambos casos se observa como las plantas integran señales ambientales mediante la conexión de distintas vías de señalización.

Palabras claves: vías de señalización, fitocromo, criptocromo, sombreado, factores de transcripción, integración

## ABSTRACT

---

### **Dynamic integration of environment signals in *Arabidopsis thaliana***

Plants have developed complex systems that allow them to perceive the light environment. The results presented in this work proposes mechanisms by which the complex signaling network regulates the seedlings growth integrating light signals. The first relates to the synergistic action of blue light and red light. In *Arabidopsis* seedlings grown under red light (condition that activate phyB), a short supplement of blue light activate cry1 and generated a synergistic response. In this thesis I found that the mechanism of integration involves the activation of positive regulators such as HY5, HYH, SPA1 and SPA4 through the perception of transient signal of blue light by cryptochrome. After this signal, genes *HY5*, *HYH*, *SPA1* and *SPA* reinforce the phyB-mediated signaling. Because phyB is active in darkness, synergism allows the persistence of the processes that lead to autotrophy during night. In the second part, I researched the integration of shade fluctuating signals. When a seedling grows in shade, several hormone-response genes and genes involved in signaling of light as *PIF4*, *PIF5* (that promote hypocotyl elongation) increase their expression. When a seedling that was growing in shade perceived unfiltered light by neighboring plants, increase the expression levels of *HY5*. *HY5* could negatively regulate auxin signaling and inhibit the expression of positive regulators of growth such as *PIF4*, *PIF5*, *HAT2*, *PKS4*, *LHY* and *CCA1* preventing shade maximal response. Both cases shows how plants integrate environmental signals by connecting different signaling pathways.

Keywords: signaling pathways, phytochrome, cryptochrome, shade, transcription factor, integration

## AGRADECIMIENTOS

---

A Jorge por ser un excelente guía y sobretodo por contagiarme su pasión por la fotomorfogénesis.

A Marcelo por sus aportes y consejos.

A Roberto Stanelloni por toda la ayuda brindada en los experimentos realizados en el Instituto Leloir.

A mis compañeros del lab, a los que se fueron y a los que están Lu, Santi, Pipa, Leo, Steve, Martin, Carlos, Paulita, Hernan, Costi y especialmente a María, Andre y Ogui por hacer que los días de trabajo sean más divertidos.

Ani por la maldad compartida, ja!, Pau por su sano equilibrio, Sil porque gracias a su capacidad de estar en dos lugares a la vez, quedan las mejores anécdotas y Ely mi “co-equipar” cuya ayuda ha permitido que esta tesis llegara a su versión final. Con ellas compartí los mejores momentos en el IFEVA.

A mis amigas de la facu Majo, Noe y Pets por los inolvidables momentos compartidos

A Gaby por tus consejos y porque junto a Nico y Benja me hacen sentir en familia

A mis amigas de toda la vida Flo, Caro, Maru y Paz, gracias por estar siempre.

A mi familia por el cariño y el apoyo que me brindaron en todo momento

A mi hermanita Naty porque sé que cuento con ella siempre.

A Caro por hacerme tan feliz...



# INTRODUCCIÓN

---

## *Las plantas y la percepción de la luz*

La luz es una de las señales ambientales más importantes en el control que afecta el desarrollo de las plantas durante todo su ciclo de vida, desde la germinación, pasando por el desarrollo de plántula hasta el establecimiento de la planta madura y la transición al desarrollo reproductivo (floración). Al germinar, la plántula que emerge monitorea su ambiente, y dependiendo de la ausencia o presencia de luz, sigue el patrón escoto o fotomorfogénico, respectivamente (Chen et al., 2004). En *Arabidopsis thaliana* las principales características de la escotomorfogénesis son la promoción de la elongación del hipocotilo y el mantenimiento del gancho apical que contiene los cotiledones cerrados. Éste proceso ayuda a la plántula a emerger, minimizando los efectos desfavorables de atravesar el suelo. La luz en cambio, gatilla la fotomorfogénesis mediante la des-etiolación de la plántula. Ésta involucra cambios morfológicos como la inhibición de la elongación del hipocotilo, la estimulación del desarrollo de los cotiledones, desarrollo de una maquinaria fotosintética funcional y el crecimiento de la raíz (Chory et al., 1989; Deng et al., 1991). Gran parte de estos cambios los realiza mediante un rearrreglo masivo de expresión de genes que incluye la inducción de genes que codifican para la maquinaria de fotosíntesis y protección de los efectos nocivos de la luz, entre otras funciones (Tepperman et al., 2001).

Las plantas han desarrollado complejos sistemas que les permiten percibir fluctuaciones en calidad, cantidad, dirección y duración del estímulo lumínico (Chen et al., 2004). Gracias a su gran plasticidad pueden modular su crecimiento y desarrollo en respuesta a estas señales externas. El primer paso de la señalización lumínica es la percepción de la luz por fotorreceptores específicos. Estudios genéticos, bioquímicos y moleculares, en particular en el modelo de *Arabidopsis thaliana*, han permitido la identificación y caracterización de los fotorreceptores y los genes que los codifican. Existen cuatro grupos de fotorreceptores capaces de percibir las señales lumínicas: los fitocromos que absorben principalmente luz correspondiente a las longitudes de onda del rojo (R, 600- 700 nm) y del

rojo lejano (RL, 700- 800nm) y los criptocromos, zeitlupe (ZTL) y fototropinas que absorben la luz correspondiente a las longitudes de onda del azul (A) al UV- A (315- 400 nm) (Cashmore et al., 1999; Deng y Quail, 1999; Koorneef et al., 1980; Kim et al., 2007). Estos fotorreceptores han sido durante años el objeto de estudio de diversos equipos de investigación y en los últimos tiempos se ha logrado una visión más precisa de los mecanismos moleculares mediante los cuales los fotorreceptores informan a la célula de la señal luminosa recibida.

### ***Los fitocromos***

Los fitocromos son cromoproteínas (moléculas que combinan una parte proteica o apoproteína y un cromóforo) homodiméricas conformadas por dos polipéptidos de aproximadamente 125 Kda. Cada monómero posee dos dominios estructurales: el carboxi terminal que media la dimerización y el amino terminal que está unido covalentemente a un cromóforo tetrapirrólico que es el responsable de la absorción de la luz. El cromóforo absorbe principalmente R o RL, modificando su conformación. La excitación del cromóforo altera la conformación de la apoproteína y, por ende, su capacidad de acción biológica (Quail, 1991).

Los fitocromos existen en dos formas fotointerconvertibles: el Pr, con un máximo de absorción a 660 nm, es decir en el R y el Pfr con un máximo de absorción a 730 nm, es decir en el RL (Quail et al., 1995; Frankhauser & Chory, 1997). Los fitocromos son sintetizados en el citoplasma en la forma Pr que es biológicamente inactiva y al absorber rojo pasan a su conformación activa (Pfr) y migran al núcleo (Nagy et al., 2001). Ambas formas son interconvertibles entre sí de modo reversible por absorción de luz. En plántulas etioladas todo el fitocromo se encuentra en la forma Pr. Al exponer las plántulas etioladas a la luz, el Pr se fotoconvierte en Pfr. El Pfr también puede destruirse (Marmé et al., 1971) o convertirse en Pr mediante una reacción independiente de la luz (reversión) (Kendrick et al., 1971).

Dado que los espectros de absorción de las dos formas están parcialmente solapados, al irradiar una planta se establece un fotoequilibrio dinámico entre el Pr y Pfr. La proporción de Pfr respecto al fitocromo total (Pfr/P) establecida por cada tratamiento lumínico dependerá de la composición espectral del mismo. La luz monocromática de 660 nm

convierte una alta proporción del fitocromo a la forma Pfr, mientras que luz monocromática de 730 nm establece menos del 5% de Pfr/P. Cuando se expone a las plántulas a la radiación solar que es policromática, el Pfr/P estará determinado principalmente por la proporción de R y RL de la luz incidente (Mancinelli, 1994). Cuanto mayor sea la relación R/RL de luz incidente, mayor será el Pfr/P.

Las plantas poseen distintos fitocromos, en *Arabidopsis thaliana* han sido aislados y secuenciados 5 fitocromos diferentes, fitocromo A, B, C, D y E. Los roles fisiológicos y fotosensoriales de cada fitocromo han sido definidos a través del análisis de mutantes deficientes en los distintos fitocromos (Whitelam y Devlin, 1997; Qin et al., 1997; Devlin et al., 1998; Smith, 2000). Los fitocromos mejor caracterizados de *A. thaliana* son el fitocromo A (phyA) y el fitocromo B (phyB) que además son los más importantes desde el punto de vista funcional.

El phyA es inestable en la forma Pfr y su vida media es de 1 a 2 horas, de tal modo que la acción biológica compite con el proceso de destrucción. Éste fitocromo se acumula en plantas etioladas, pero sus niveles disminuyen drásticamente luego de la exposición a la luz debido a su degradación proteolítica. En ambientes ricos en RL, la destrucción del phyA no es tan marcada ya que la proporción que se encuentra como Pfr es baja. En condiciones de radiación natural bajo canopeos densos, ricos en RL, el phyA es crucial para producir la des-etiolación y los mutantes de *phyA* mueren prematuramente (Yanovsky et al., 1995). El phyA estaría también involucrado en la detección temprana de plantas vecinas, indirectamente modulando la actividad del phyB (Casal, 1996; Yanovsky et al., 1995).

Mientras que el phyA es el principal fotorreceptor que media la repuesta de des-etiolación a bajos y altos flujos de RL, la respuesta de des-etiolación a altos flujos de luz R es mediada por phyB. phyB se expresa en todos los tejidos y a diferencia de phyA es fotoestable y es el más abundante en las plantas verdes (Somers y Quail, 1995). Las plántulas deficientes en phyB presentan hipocotilos alargados y cotiledones poco desarrollados cuando crecen en luz roja o blanca (Nagatani et al., 1991; Reed et al., 1993; Somers et al., 1991). La presencia de plantas vecinas, que absorben el R y que reflejan y transmiten el RL provoca una disminución en R/RL y por lo tanto el desplazamiento del fotoequilibrio hacia la forma inactiva Pr. phyB, es el principal fotorreceptor implicado en

las percepción de las variaciones en las relaciones R/RL del ambiente y por lo tanto juega un rol fundamental en la detección de plantas vecinas (Ballaré et al., 1987).

### ***Los criptocromos***

Los criptocromos son fotorreceptores que absorben en el rango de la luz azul y UV-A del espectro lumínico. En *Arabidopsis* existen dos criptocromos bien caracterizados criptocromo 1 y 2 (cry1, cry2) (Ahmad and Cashmore, 1993) y un tercer criptocromo (cry3) cuya función biológica todavía no está bien definida (Kleine *et al.*, 2003). En su secuencia de DNA tienen una gran similitud con enzimas de reparación fotoliasas y comparten los mismos cofactores del cromóforo, pero esta homología es solo estructural y no es funcional para cry1 y cry2. Recientemente se ha observado que cry3 tendría actividad de fotoliasa (Selby and Sancar, 2006).

cry1 y cry2 tienen un rol importante en la fotomorfogénesis, como es la inhibición de la elongación del hipocotilo, la apertura de los cotiledones, la síntesis de antocianinas y flavonoides por luz azul y la regulación de la floración a través del fotoperíodo, teniendo cry2 un rol fundamental en este último proceso. cry1 cumple un papel preponderante en altas irradiancias de luz azul, mientras que cry2 es importante a bajas irradiancias de luz azul (Lin et al., 1998). Esta sensibilidad distinta de los dos criptocromos es en parte explicada por la naturaleza lábil de cry2 en contraste con cry1, que permanece estable en luz (Lin, 2002).

La reversión de cry1 por la luz verde fue sugerida por Lin et al. (1995) luego de identificar un estado de flavo semiquinona de este fotorreceptor que absorbe luz verde. Más recientemente un estado semi-reducido similar ha sido identificado en cry2 (Banjeree et al., 2007). Se ha observado que la activación por luz azul de los criptocromos pueden ser inhibida por luz verde *in vivo*, esto es consistente con el cambio de estado redox del fotorreceptor. La respuesta de los criptocromos a la luz azul puede ser parcialmente revertida mediante el agregado de luz verde en irradiancias altas. En las plantas, ésta fotoreversión del criptocromo podría contribuir a las respuestas de escape al sombreado bajo un canopy (Bouly et al., 2007).

### *Interacción entre fotorreceptores*

La radiación natural activa simultáneamente a más de un fotorreceptor. Si bien se conocen los papeles que juegan los fotorreceptores bajo condiciones lumínicas controladas, es difícil determinar que fotorreceptor o vía de señalización lumínica posee mayor jerarquía bajo los distintos contextos ambientales. Las distintas longitudes de onda (rojo, azul, rojo lejano) activan selectivamente distintos fotorreceptores y estos activan un gran número de genes que se solapan, indicando la presencia de componentes de señalización compartidos. Un óptimo funcionamiento celular requiere la integración eficiente de estas señales. Las vías por las cuales se integran las distintas señales son complejas debido a distintos factores. Por un lado, una respuesta fisiológica es controlada por numerosas señales que son percibidas por diferentes receptores (Janknecht y Hunter, 1999). Por otro lado, la activación de un receptor puede desencadenar numerosas vías, así como las vías activadas por un receptor pueden armar una red de interacciones entre ellas y con demás vías iniciadas por otros receptores activados simultáneamente o sucesivamente. La acción de un fotorreceptor puede estar fuertemente afectada por la presencia de otros. Es así como se han encontrado interacciones sinérgicas entre el phyB y cry1, entre el phyA y phyB, así como también interacciones antagonistas entre estos últimos fotorreceptores y phyB con cry2 (Casal, 2000).

Dependiendo de las condiciones de luz la interacción entre el phyA y phyB puede ser antagonista o sinérgica. Por ejemplo, en plántulas etioladas de *Arabidopsis* expuestas a luz roja continua o a pulsos de luz roja, la inhibición del crecimiento del hipocotilo, la expansión de los cotiledones y la síntesis de clorofila son principalmente mediadas por phyB. A pesar de la falta de contribución por parte de phyA a la inhibición del crecimiento del hipocotilo, la mutante de *phyA* suele ser de menor estatura que la planta de genotipo salvaje en luz roja continua o pulsos de luz roja. Cuando las semillas etioladas son expuestas a un solo pulso de luz roja o a varios pulsos de luz roja por día, la des-etiolación es observada en el mutante *phyA* y no en el doble mutante *phyAphyB*. Esto indica que la actividad del phyB de algún modo está afectada por la actividad de phyA y que la mutación de *phyA* elimina esta regulación negativa. El efecto de phyB es más fuerte en la ausencia de phyA (Neff y Chory, 1998). Esto indica que bajo luz roja, el phyA afecta la des-etiolación y antagoniza con la des-etiolación mediada por phyB. Por otro lado, cuando se produce una

corta exposición de luz roja lejana terminada por un pulso de luz roja, ocurre la des-etiolación. Este efecto no se observa en el mutante *phyB* indicando que el pulso de luz roja es percibido por este fitocromo. El mutante de *phyA* muestra la misma respuesta al pulso de luz roja con o sin el pretratamiento de luz roja lejana indicando que la percepción de luz roja lejana esta dada por *phyA*. En plántulas etioladas, cuando el *phyA* es activado con RL continua, produce la amplificación de la respuesta a un pulso mediado por el Pfr del *phyB*. Es decir que *phyA* y *phyB* interactúan sinérgicamente, en esas condiciones. (Casal, 1995; Casal y Boccalandro, 1995).

### ***Sinergismo entre phyB y cry1***

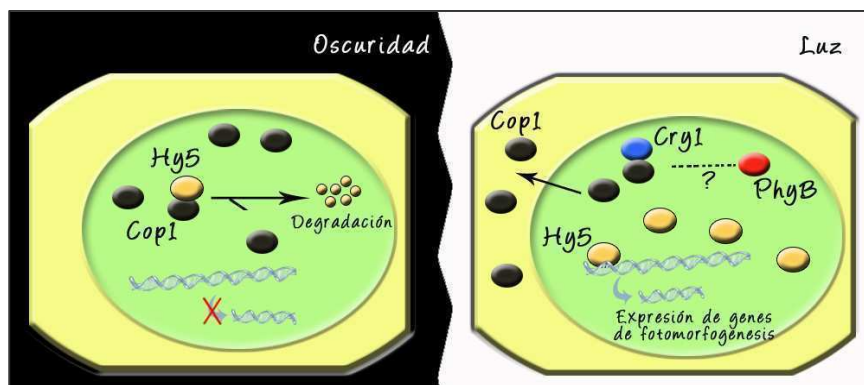
Hace un tiempo considerable que se conoce la interacción sinérgica de la luz azul y la luz roja en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Oelmüller y Mohr, 1985). Nuestro grupo de trabajo comenzó a investigar sobre la interacción entre los fotorreceptores que median esta respuesta utilizando herramientas genéticas en combinación con tratamientos de luz. Casal y Boccalandro (1995) observaron que bajo condiciones no saturantes de luz *phyB* y *cry1* operan sinérgicamente. En plántulas de *Arabidopsis* expuestas a cortos fotoperíodos (3 h) de luz roja mas luz azul, se vio que la acción de *cry1* es mayor con la presencia de *phyB* en su forma activa. Complementariamente, la acción de *phyB* es mayor con la presencia de *cry1* activo. La interacción entre *phyB* y *cry1* es sinérgica, pero este sinergismo es condicional: si las plántulas son expuestas a rojo y azul continuo, la actividad de *phyB* y *cry1* se torna independiente y aditiva. El sinergismo entre *phyB* y *cry1* solo es observado en bajos flujos de luz como por ejemplo en cortos foto períodos (Casal y Mazzella, 1998). Si bien se conocen varias respuestas fisiológicas que muestran co-acción entre *phyB* y *cry1*, el mecanismo de integración aún no ha sido dilucidado.

### ***Elementos de las vías de señalización de los fotorreceptores***

Luego de la percepción de la luz, los fotorreceptores inician la respuesta mediante una cadena de transducción que incluye tanto eventos nucleares como citoplasmáticos. Estudios genómicos recientes han revelado que las respuestas tempranas a la luz están enriquecida de factores de transcripción (Tepperman, 2001; Jiao et al., 2007). Diversos estudios

genéticos y moleculares han permitido la identificación de importantes factores de regulación y su posición en la red transcripcional.

COP1 es una proteína reguladora que reprime la fotomorfogénesis en oscuridad, actuando río abajo de las cadenas de señalización de los fitocromos y criptocromos (Deng et al., 1991). Las plántulas mutantes *cop1* son des-etioladas en oscuridad y el patrón de expresión de su transcriptoma en oscuridad es muy similar al del genotipo salvaje (WT) cultivado bajo luz. COP1 es una proteína de ubicación núcleo-citoplasmática. En oscuridad, la importación al núcleo de COP1 es mediada por una señal de localización nuclear (NLS, del inglés Nuclear Localization Signal) ubicada en el dominio central de COP1 (Stacey et al., 1999). A nivel molecular COP1 actúa como ligasa de ubiquitina, del tipo E3, confiriendo especificidad de sustrato por reconocimiento directo de las proteínas sustrato, dentro del núcleo (Saijo et al., 2003). El efecto represor de COP1 sobre la fotomorfogénesis en oscuridad, resulta de una interacción directa con reguladores positivos de la fotomorfogénesis tales como HY5, y su homólogo HYH, los cuales, como resultado de esta interacción quedan etiquetados (ubiquitinados) para degradación por el proteasoma 26S (Holm et al., 2002; Osterlund, 2000). Luego de la percepción lumínica, fitocromos y criptocromos inducen la re-localización de COP1 hacia el citosol (Osterlund y Deng, 1998), incrementando de este modo la abundancia de factores de transcripción que promueven la fotomorfogénesis en el núcleo. Consecuentemente, en la luz la abundancia de los factores de transcripción como HY5 y HYH aumentan en el núcleo, gatillando las respuestas inducidas por luz e induciendo la fotomorfogénesis (Fig. 1). COP1 no sólo juega un papel en oscuridad, regulando negativamente la fotomorfogénesis, COP1 también modula las respuestas a la luz (Yamamoto et al., 1998).



**Fig. 1: Modelo del efecto represor de COP1 sobre la fotomorfogénesis**

SPA1 es un regulador negativo de la señalización de phyA (Hoecker et al. 1999) que pertenece a una familia de 4 miembros (SPA2, SPA3 y SPA4). El cuádruple mutante *spa1 spa2 spa3 spa4* tiene un fuerte fenotipo des-etiolado en oscuridad. Este fenotipo extremo solo se observa cuando todos los genes *SPA* son mutados, evidenciando así la redundancia funcional entre ellos. Se han observado contribuciones distintas de cada gen dependiendo del proceso y las condiciones de luz. *SPA1* y *SPA2* tienen un rol más predominante en plántulas crecidas en oscuridad, mientras que *SPA3* y *SPA4* tienen mayor importancia en la elongación de plantas adultas (Laubinger, et al., 2004). SPA1 modula la actividad E3 ubiquitin ligasa de COP1. Diversas señales lumínicas actúan a través de distintos componentes del complejo COP1, SPA1 es el principal componente responsable de mediar las respuestas de la actividad de COP1 en RL. La interacción directa entre COP1 y SPA1 proporciona las bases moleculares para la convergencia de la señalización mediada por phyA y COP1, y explicaría en parte cómo la luz RL regula la actividad de factores de transcripción positivos de la fotomorfogénesis como HY5 (Saijo et al., 2003).

Uno de los reguladores positivos centrales de la fotomorfogénesis es el factor de transcripción bZIP HY5. Este factor de transcripción afecta simultáneamente las respuestas a varias longitudes de onda y estaría ubicado río abajo en la cadena de transducción de varios fotorreceptores (Koornneef et al., 1980). El mutante *hy5* presenta características etioladas en luz, la más importante es la pérdida de inhibición del hipocotilo. HYH que también es un factor de transcripción bZIP posee una alta identidad de secuencia con HY5. Mientras el mutante *hy5* tiene fenotipo bajo todas las condiciones de luz, el mutante *hyh* presenta un fenotipo similar pero más débil solo bajo luz azul. HY5 y HYH actúan de un modo redundante y en conjunto sobre un mismo set de genes así como también lo hacen en forma independiente (Holm et al., 2002). Debido a que estos factores de transcripción son parcialmente redundantes, el doble mutante *hy5 hyh* generalmente presenta un fenotipo más fuerte que el observado en las simples mutantes. Sin embargo, esto no ocurre para todas las respuestas, Sibout y colaboradores (2006) han observado que el doble mutante *hy5 hyh* presenta una disminución en el crecimiento del sistema radicular mientras que el simple mutante *hy5* aumenta el crecimiento de las raíces. Los autores han determinado que estos cambios morfológicos en el simple mutante *hy5* y en el doble mutante *hy5 hyh* se vinculan a respuestas fisiológicas a auxinas. Este ejemplo indica que la inactivación de



genes que afectan el balance de un proceso fisiológico en el mismo sentido puede manifestarse en cambios morfológicos muy distintos (Sibout et al., 2006).

Los miembros de la familia de factores de transcripción llamados PIFs (phytochrome-interacting factor) son uno de los principales nexos entre los fitocromos y la activación de genes. Estas proteínas están involucradas en distintos procesos regulados por los fitocromos como la des-etiolación en luz R o RL, la germinación, y las respuestas de escape al sombreado (Castillon et al., 2007). Éstos Interactúan con la forma activa de phyB (PIF1, PIF3, PIF4, PIF5 y PIF7) o phyA (PIF1 y PIF3) a través de un dominio localizado en la parte N-terminal de phyB o phyA respectivamente (Khanna et al., 2004). Con la excepción de PIF7, la percepción de la luz R induce la fosforilación de los PIF de modo dependiente de fitocromo y su subsiguiente degradación a través del proteosoma 26S (Lorrain et al., 2008). Ha sido propuesto que los PIFs son reguladores negativos de las respuestas mediadas por fitocromo al ser etiquetados para su degradación cuando percibe la luz en un proceso dependiente de fitocromo. Por ejemplo, los fitocromos inducen la degradación de PIF1 promoviendo la germinación y liberando la acción inhibitoria en la biosíntesis de clorofila (Huq et al., 2004). De acuerdo con esta idea, los múltiples PIFs reprimen redundantemente la fotomorfogénesis en oscuridad, mientras que los fitocromos la activan etiquetando a los PIFs para su degradación (Leivar et al., 2008). Las proteínas PIF4 y PIF5 son abundantes en la oscuridad y en condiciones que imitan el sombreado vegetal, pero son rápidamente degradados en respuesta a altas relaciones R/RL. Los cambios percibidos en la calidad de luz por los fitocromos regulan rápidamente la abundancia de reguladores positivos de escape al sombreado como son PIF4 y PIF5 (Lorrain et al., 2008).

### ***Respuestas desencadenadas por la presencia de plantas vecinas***

Bajo una vegetación densa, la luz es un factor limitante. La competencia por luz puede determinar el éxito evolutivo de una planta. Las plantas han desarrollado sofisticados mecanismos que les permiten detectar plantas vecinas e iniciar una apropiada respuesta de crecimiento. Las alteraciones más significativas en la relación R/RL ocurren cuando la luz del día es reflejada o transmitida por la vegetación verde. La absorción preferentemente de la luz roja y la luz azul por la clorofila y los carotenos resulta en un enriquecimiento selectivo de regiones del espectro lumínico menos absorbidas. Estas últimas incluyen a la

luz verde y en mayor medida RL, esta situación combinada con la sensibilidad visual hacen que las plantas se vean verdes al ojo humano. Aunque no es detectable por la visión humana, el mayor enriquecimiento ocurre en la longitud de onda del rojo lejano, reduciendo así la relación R/RL. La baja relación R/RL de la luz reflejada puede proveer advertencias tempranas de la presencia y proximidad de plantas vecinas (Ballaré et al., 1987), permitiendo la iniciación de estrategias de desarrollo adaptativas para tolerar o evitar el sombreado antes que el canopeo se cierre (Franklin, 2008). Éste cambio en el espectro de la luz percibida genera cambios en la proporción de fitocromo activo (Pfr) e inactivo (Pr), lo que conduce a un grupo de respuestas conocido como síndrome de escape al sombreado. Entre estas respuestas se encuentran la elongación de tallos y pecíolos, la ubicación de las hojas en posición erecta y la aceleración de la floración.

En *Arabidopsis* phyB es el principal fitocromo que media esta respuesta ya que mutantes deficientes en phyB muestran un fenotipo de síndrome de escape al sombreado constitutivo (Somers et al., 1991; Reed et al., 1993). Sin embargo la participación de otros fotorreceptores también ha sido observada, la pérdida de phyD o phyE en la ausencia de phyB, resulta en una elongación de las hojas en altas relaciones R/RL, efecto que no es exacerbado en tratamientos con baja relación R/RL (Franklin et al., 2003). Además, la triple mutante *phyB phyD phyE* no acelera la floración en tratamientos con baja relación R/RL. Éstos datos sugieren que en *Arabidopsis* la supresión de las respuestas de síndrome de escape al sombreado en altas relaciones R/RL es mediada exclusivamente por phyB, phyD y phyE y los mismos actúan de un modo redundante (Franklin, 2008).

Cuando se cultivan mutantes *phyA* con una relación R/RL baja continua, las mismas desarrollan hipocotilos más largos que los controles del genotipo salvaje. (Johnson et al., 1994). El mismo estudio muestra que dobles mutantes *phyA phyB* tienen hipocotilos más largos que el simple mutante *phyB*, apoyando la idea que phyA cumple un rol en la inhibición del crecimiento del hipocotilo. La importancia de phyA como antagonista de la respuesta de escape al sombreado fue demostrado por Yanovsky y colaboradores (Yanovsky et al., 1995) quienes observaron respuestas de extrema elongación en plántulas germinadas bajo la sombra de una vegetación densa. Una significativa proporción de las plántulas fallaron al establecerse y murieron. Este dato sugiere un rol importante de phyA

en ambientes lumínicos naturales, que sería el de limitar la excesiva elongación, lo cual terminaría siendo letal para la planta (Whitelam y Halliday, 2007).

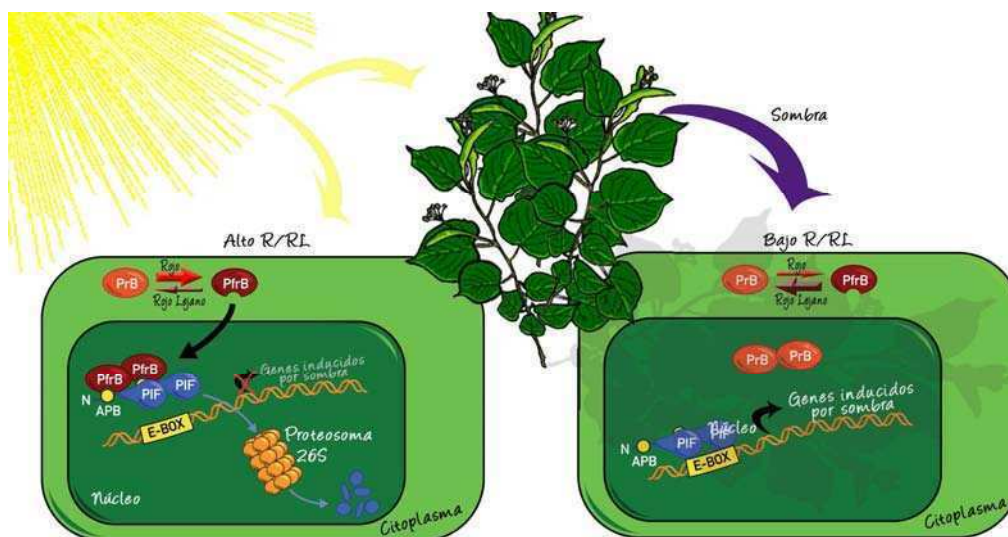
A nivel fisiológico, las respuestas de escape al sombreado son caracterizadas por una relocalización de los recursos en la elongación del tallo que incrementan las probabilidades que la planta pueda alcanzar luz solar directa (Lorraine et al., 2008). Observaciones detalladas indican que la elongación del hipocotilo ocurre a los 10 minutos de iniciar la suplementación de la luz blanca con RL (Morgan et al., 1980). Estas respuestas producirían cambios rápidos en la expresión de genes o a la acción de proteínas preexistentes en la planta. En los últimos años se identificaron múltiples genes que son rápidamente regulados por cambios en las relaciones R/RL como por ejemplo: *ATHB-2* (Carabelli et al., 1993), *PIL1* (Salter et al., 2003) y *HFR1* (Sessa et al., 2005).

Hasta hace poco, las respuestas morfológicas de las plantas a la sombra eran principalmente estudiadas como una función de la calidad de luz, en particular la relación R/RL que afecta la actividad del fitocromo. Sin embargo, cambios en la cantidad de luz también son importantes para las respuestas de escape al sombreado ya que las plantas deben ajustarse a una reducción en la cantidad de energía que les llega (Vandenbussche, et al., 2003). La intensidad de luz afecta el posicionamiento de los cloroplastos, permitiendo un óptimo aprovechamiento de la luz. De este modo, los fotorreceptores actúan no solo como detectores de la calidad de luz sino también como contadores de fotones (Ballaré, 1999).

### ***Implicancia de los PIFs en respuestas de escape al sombreado***

Lorrain y colaboradores (2008) proponen un mecanismo por el cual la estabilidad de PIF4 y PIF5 regula las respuestas de escape al sombreado (Fig. 2). Bajo luz solar (la alta relación R/RL), el fitocromo se convierte en su conformación activa Pfr e interactúa con PIF4 y PIF5 (y otros miembros de la familia PIF) desencadenando la fosforilación y subsiguiente degradación de estos factores de transcripción bHLH. Esto conduce a la reducción de los niveles de expresión de genes inducidos por baja relación R/RL como PIL1, ATHB2 y HFR, resultando en la supresión del síndrome de escape al sombreado. En condiciones de baja relación R/RL, el fotoequilibrio del fitocromo pasa a la forma inactiva Pfr, la cual deja de interactuar con PIF4 y PIF5. Esto conduce a la estabilización de estas

proteínas, que permiten un aumento en la expresión de los genes inducidos por sombra, resultando en el crecimiento de tallo y pecíolo (Lorrain et al., 2008).



**d**  
e regulación del escape al sombreado a través de la estabilidad de PIF4 y PIF5.

### ***Conexión entre las vías de señalización de hormonas y las respuestas de escape al sombreado***

Las respuestas de escape al sombreado están fuertemente coordinadas por la interacción entre las señales lumínicas y hormonales. Las auxinas son fitohormonas que afectan casi todos los aspectos del desarrollo de la planta incluyendo embriogénesis, el crecimiento de tallos, el crecimiento de las raíces y el establecimiento de la dominancia apical. Las auxinas funcionan activando o reprimiendo la transcripción de genes promoviendo la degradación de proteínas AUX/IAA (auxin permease/indole-3-acetic acid) que se unen y reprimen las proteínas ARF (auxin response factor). Estas proteínas ARF son factores de transcripción que se unen a elementos de respuesta a auxinas dentro de los promotores de genes de respuesta a auxinas. Existen muchos genes AUX/IAA y ARF en *Arabidopsis*, que explican como un regulador tan general como las auxinas que afecta casi todos los procesos del desarrollo puede tener una actividad tan específica en tiempo y espacio (Chandler, 2009).

El efecto promotor de las auxinas en la elongación celular ha sugerido que esta hormona podría estar involucrada en las respuestas a las reducciones de la relación R/RL. La aplicación exógena de auxina en plantas de genotipo salvaje provoca la elongación del

hipocotilo, de pecíolos y un incremento en la dominancia apical, fenotipos comparables a los vistos en el síndrome de escape al sombreado (Smalle *et al.*, 1997; Sawa *et al.*, 2002). Por otro lado, se han reportado distintos análisis de transcriptoma de plantas de *Arabidopsis* cultivadas con bajas relaciones R/RL y a bajas intensidades de luz en donde hay un aumento de los niveles de transcritos de un gran número de genes relacionados a las auxinas (Devlin *et al.*, 2003; Vandebussche *et al.*, 2003; Roig-Villanova *et al.*, 2007). En conjunto, estas observaciones sugieren fuertemente que las auxinas están involucradas en la señalización de la percepción de la sombra.

El factor de transcripción HY5, que está involucrado en promover la transcripción por luz, también promueve la expresión de genes de la vía de señalización de las auxinas, uniendo así la vía de señalización entre las hormonas y la luz (Cluis *et al.*, 2004). Un trabajo reciente sobre el doble mutante *hy5 hyh* reveló un estado constitutivo de expresión de genes inducidos por auxinas, sugiriendo que un mecanismo por el cual HY5 actúa es mediante la represión de genes inducidos por auxinas (Sibout *et al.*, 2006). Estudios de sitios de pegado de HY5 en el genoma de *Arabidopsis*, evidenciaron que HY5 se pega a promotores de múltiples genes de respuesta a auxinas, incluyendo Aux/IAAs y miembros de la familia de los factores de transcripción ARF (Lee *et al.*, 2007).

Otras hormonas esenciales para las respuestas de escape al sombreado son las giberelinas (GA) (Halliday y Fankhauser, 2003). Las GAs son un factor de crecimiento clave en las plantas, pueden estimular tanto la división celular como la elongación celular, inducir la germinación y el cuajado del fruto. La aplicación exógena de GA promueve la elongación del hipocotilo solo en luz ya que en oscuridad la respuesta a las GA están cerca de la saturación y por lo tanto tiene poco efecto (Cowling y Harberd, 1999). En *Arabidopsis*, tratamientos con bajas relaciones de R/RL promueven la expresión de genes relacionados con GA (Devlin *et al.*, 2003). También se observó que la ausencia de la vía de señalización de GA provoca de una fuerte supresión de la elongación del hipocotilo en respuesta a bajas relaciones de R/RL (Pierik *et al.*, 2004). El mecanismo por el cual se regula este sistema es a través de las proteínas DELLA. Las DELLA son una familia de proteínas represoras del crecimiento que se encuentran río abajo de las vías de señalización de las GAs (Alvey y Harberd, 2005). La familia DELLA en *Arabidopsis* consiste de 5 miembros: GAI (GA-insensitive), RGA (represor of *gal*) y RGA-like (RGL1, RGL2 y

RGL3) (Fleet y Sun, 2005). Estas proteínas localizan en el núcleo donde suprimen la expresión de genes de respuesta a GA. En presencia de GA, sin embargo, las proteínas DELLA son etiquetadas para su degradación vía ubiquitin proteasoma (Alvey y Harberd, 2005). La estabilidad de las proteínas DELLA y el rompimiento mediado por GA esta afectado por otras señales, como son las hormonas auxina y etileno (Achard et al., 2003; Fu y Harberd, 2003), que también son esenciales para el escape al sombreado. Esto ha sugerido que las proteínas DELLA actuarían como integradores moleculares de varias vías de regulación del crecimiento.

Parte del mecanismo molecular que coordina la regulación del desarrollo de la planta por luz y GA es a través de la interacción entre las proteínas DELLA y PIF4 (de Lucas et al., 2008). Se ha observado que las interacciones entre PIF4 y sus genes blanco están fuertemente reducidas en plántulas que acumulan las proteínas DELLA (tratadas con el inhibidor de la síntesis de GA, Paclobutrazol), en cambio esta interacción se ve aumentada en plántulas tratadas con GA para desestabilizar a las DELLA (de Lucas et al., 2008). La sobre-expresión de PIF4 rescata el crecimiento inducido por la acumulación de DELLA. Por lo tanto, en luz, phyB regula negativamente la actividad transcripcional de PIF4 etiquetándolo para su degradación. En ausencia de GA, las proteínas DELLA interactúan con las proteínas PIF4 previniendo el pegado y consecuentemente la regulación de sus genes blanco. Por el contrario, en presencia de GA, las proteínas DELLA son degradadas y la elongación celular mediada por PIF4 puede ocurrir. La función de los PIFs como nodos integradores de la luz y la vía de señalización de las GA, proveen un mecanismo regulatorio por el cual las plantas adaptan su crecimiento a los cambios de las condiciones ambientales (de Lucas et al., 2008).

Las evidencias fisiológicas y moleculares sugieren que las respuestas de crecimiento en plantas están basado en una compleja red de múltiples interacciones donde la planta debe integrar las distintas señales externas e internas como son la luz y los niveles hormonales.

## OBJETIVOS

---

Las plantas están expuestas a un ambiente luminoso cambiante y estas modificaciones pueden constituirse en señales. Sin embargo, no todo cambio es una señal y algunos cambios pueden ser señales en un contexto y no en otro (Casal, 2000). Las modulaciones de la sensibilidad y la robustez ante señales imperfectas se alcanza en buena medida gracias a la integración de las señales de distintos fotorreceptores (Casal et al., 2004).

El objetivo general de esta tesis, es comprender los mecanismos de integración de distintas señales lumínicas percibidas por fotorreceptores en *Arabidopsis thaliana*. Los objetivos específicos son: a) estudiar los mecanismos de la interacción sinérgica que ocurre entre los fotorreceptores phyB y cry1 en ambientes lumínicos sub-óptimos y b) estudiar los mecanismos de la integración de la información en plantas expuestas a períodos alternados de luz solar plena o sombra vegetal.

La estrategia que utilizaremos intentará identificar componentes moleculares de los sistemas de integración y explorar los patrones de integración a escala genómica. A tal efecto utilizaremos una combinación entre el análisis de respuestas fisiológicas (crecimiento del hipocotilo, ángulo de apertura de los cotiledones, tasas de crecimiento, etc.), con genética directa (búsqueda de mutantes e identificación de los genes mutados), genómica funcional (análisis de expresión de genes a nivel global con microarreglos) seguida de genética reversa (análisis fisiológico de plantas mutantes deficientes en genes que cambian su expresión). Aunque algunos aspectos serán estudiados en mayor detalle, el interés está en encontrar los patrones generales de los componentes moleculares y el modo en que ellos explican la fisiología de la planta. Por ejemplo, la interacción podría deberse a caminos nuevos generados por la activación conjunta y/o refuerzo por un fotorreceptor de caminos ya activados por otro y el análisis a nivel genómico permitirá evaluar si una de estas alternativas predomina.

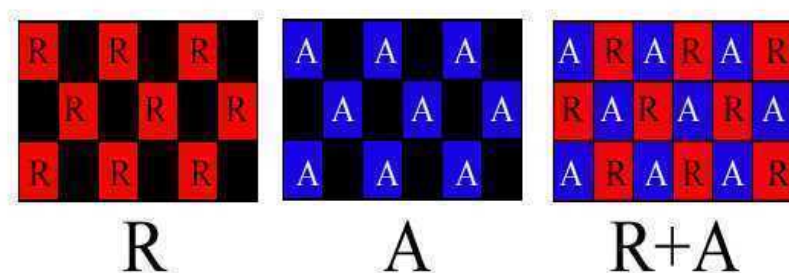
## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### *Tratamientos lumínicos*

#### *Acción sinérgica entre luz roja y luz azul*

Los tratamientos de expresión global y des-etiolación a largo plazo se realizaron en cámaras con condiciones reguladas de temperatura y la luz fue provista por tubos fluorescentes (Osram L30W/10). Para el tratamiento con luz roja (R) ( $11 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) se utilizaron filtros de acetato de color rojo, amarillo y naranja superpuestos (números 106, 101 y 105 respectivamente de la Central de las lámparas, Buenos Aires). Para el tratamiento de luz azul (A) ( $5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) se utilizaron filtros de acetato de color azul (número 363) y para el pulso de RL una lámpara incandescente y un filtro de RG9, Schott, Maintz. El rojo+azul (R+A) ( $16 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) se realizó mediante una combinación de cuadrados ( $3 \times 1,5 \text{ cm}$ ) de acetatos rojo+amarillo+naranja con cuadraditos ( $3 \times 1,5 \text{ cm}$ ) de acetato azul. Para que la intensidad del tratamiento de R y de A sean iguales a la obtenida en el tratamiento R+A, se utilizaron cuadrados de acetatos del color correspondientes en combinación con cuadrados negros (Fig. 2).



**Fig. 2: Esquema de las combinaciones de acetato de los distintos tratamientos.**

Para los tratamientos de respuesta del crecimiento y de la expresión de la proteína HY5 se utilizó una fuente con diodos rojos y azules intercalados, que se pueden prender por separado o en conjunto. Para la luz verde ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) se utilizó un tubo fluorescente en combinación con filtros de acetato amarillo y azul (números 101 y 363, respectivamente)



*Señales fluctuantes de sombreado vegetal*

Todos los tratamientos de sombra y luz solar se realizaron en el campo experimental del IFEVA. Los tratamientos de sombra se realizaron bajo el canopeo de Laurentino (*Viburnum tinus*) con una relación entre el rojo y el rojo lejano (R/RL) de 0,24 medida mediante un sensor (Skye Instruments Ltd,) que mide R y RL y una radiación fotosintéticamente activa (PAR) de 45 ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) que fue medida con un radiómetro Li-188B (Lincoln, NE). Los tratamientos de luz solar plena se realizaron en un lugar sin la incidencia directa del sol (sombreado por un edificio) y lejos de la presencia de plantas vecinas con una relación R/RL de 1.09 y un PAR de 620 ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

**Material vegetal**

En los experimentos realizados en esta tesis se empleó como material vegetal plantas de *Arabidopsis thaliana* de los siguientes genotipos:

En el fondo genético de Landsberg *erecta* (*Ler*):

- Plantas de genotipo salvaje *Ler*
- *cry1-1 (hy4-2.23n)* y *phyB-5* (Koornneef et al., 1980).

En el fondo genético de Columbia:

- Plantas de genotipo salvaje Columbia (Col 0 y Col 2)
- *cop1-6* (McNellis et al., 1994).
- *phyB-9* (Reed et al., 1993).
- *phyA-211* (Reed et al., 1994).
- *phyA-211 phyB-9* (Reed et al., 1994).
- *cry1-304, cry2-1* y *cry1-304 cry2-1* (Guo et al., 1999).
- *spa4-1* (Laubinger et al., 2003)
- *hys-221, HY5-myc* en HY5 OX1 (Shin et al., 2007).
- *axr3-1* (Rouse et al., 1998)
- *arf2-8* (Okushima et al., 2005)
- *nph4-1 arf6-2* (Wilmoth et al., 2005)
- *pif4 101* y *pif4 pif5* (Lorrain et al., 2008) , *pif5* (Fujimori et al., 2004)
- *pks4-1* (Lariguet et al., 2006)
- *sav3.1* (Tao et al., 2008)

En el fondo genético de Wassilewskija (WS):

- Plantas de genotipo salvaje WS
- *hy5-KS50*, *hyh* y *hy5KS50-hyh* (Holm et al., 2002).
- *lhy-21*, *cca1-11* y *lhy-21 cca1-11* (Hall et al., 2003).

En el fondo genético de RLD:

- Plantas de genotipo salvaje RLD.
- *spa1-2*, *phyA-101* y *spa1-2 phyA-101* (Hoecker et al., 1999).

En una combinación entre el fondo genético de Columbia y de RLD:

- *spa 4-1 phyA-101* (Laubinger et al., 2003).

### ***Mediciones del largo final del hipocotilo y ángulo entre los cotiledones***

Para los experimentos de des-etiolación se sembraron 15 semillas de cada mutante junto con el genotipo salvaje en cajas transparentes de plástico con 0,8 % de agar-agua. Para reducir la dormición de las semillas las cajas fueron incubadas en oscuridad a 4° C durante 4 días y posteriormente fueron expuestas a 3 horas de R seguido de 24 horas de oscuridad a 22 ° C. Luego, durante 3 días seguidos las cajas se expusieron a los distintos tratamientos lumínicos o fueron mantenidas en oscuridad como control. El largo del hipocotilo se midió con regla con una precisión de 0,5 mm y se promediaron los valores de las 10 plántulas más altas. El ángulo formado entre los cotiledones fue medido con la ayuda de un transportador. Cada tratamiento de luz se hizo como mínimo por triplicado y el promedio de cada caja fue tomado como una repetición (Fankhauser & Casal, 2004).

### ***Mediciones de la tasa de crecimiento del hipocotilo***

Para la medición de la tasa de crecimiento del hipocotilo, se utilizaron plántulas cultivadas en agar en forma vertical. Las plántulas fueron fotografiadas con una cámara Canon Power Shot A520. Las imágenes de cada plántula fueron alineadas utilizando el programa Photoshop 7.0, y se midió el incremento en el largo del hipocotilo entre los tiempos sucesivos. La tasa de crecimiento del hipocotilo fue normalizada al crecimiento de la plántula antes del tratamiento de luz A. En los experimentos donde las plántulas de oscuridad fueron expuestas a luz R+A por 12 h y luego volvieron a oscuridad, el largo del

hipocotilo fue fotografiado al comienzo de las 12 h de luz R+A, al final de la luz R+A y 12 h después de ser transferidas a oscuridad. Los controles de oscuridad fueron fotografiados en simultáneo debajo de una luz verde tenue.

### ***Tratamiento con Picloram***

Se sembraron 15 semillas del genotipo salvaje Col 2 para cada replica sobre papel de filtro cortado en cuadrados de 2 x 2 cm sobre 0,8 % agar-agua en cajas de plástico. Las cajas conteniendo las semillas fueron incubadas en oscuridad a 4° C durante 4 días y para homogeneizar la germinación las cajas fueron expuestas a 3 horas de R seguido de 24 horas de oscuridad a 22 ° C. Luego los papeles conteniendo las semillas fueron transferidos a bandejas que contenían agua o una solución de Picloram 5µM con un sistema de burbujeo. Los distintos tiempos de exposición en Picloram (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 16 h) se realizaron transfiriendo los papeles de la bandeja de agua hacia la que contenía la solución de Picloram durante las horas correspondientes y luego vueltas a poner en agua. Este procedimiento se realizó durante 3 días. El tiempo 0 corresponde a plántulas que fueron cultivadas todo el tiempo en la bandeja que contenía agua y el tiempo 24 corresponde a plántulas que fueron cultivadas todo el tiempo en la bandeja que contenía Picloram.

### ***Extracción de ADN genómico de plantas***

Se utilizó tejido foliar joven de *Arabidopsis thaliana*, al cual se le realizó el siguiente procedimiento. Se pulverizó con nitrógeno líquido el tejido foliar joven recién cortado, colocándolo en un tubo eppendorf de 1,5. Se resuspendió con 750 µl de buffer CTAB (2X), (2% de CTAB, 100 mM de tris base pH 8,0, 10 mM de EDTA, 0,7 M de NaCl y 30 µl de 2-β mercaptoetanol llevando a volumen final de 500 µl con H<sub>2</sub>O) agitando suavemente. Se incubó por 30 minutos a 65 °C. Luego se agregaron 300 µl de cloroformo, mezclando suavemente. Se centrifugó 5 min a 10.000 g y se trasvasó la fase superior en un tubo con 500 µl de isopropanol para precipitar el ADN. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 min y se centrifugó 15 min a 10.000 g. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet de ADN dos veces con 500 µl de Etanol al 70%. Luego de aproximadamente 30 min (cuando se secó el ADN) se resuspendió con 50 µl de H<sub>2</sub>O.

### ***Clonado de la mutante 277F y genotipado***

La secuencia flanqueante de la inserción de T-DNA en el mutante 277F fue identificada siguiendo el protocolo de TAIL-PCR descrito por Liu y colaboradores (1995). La inserción en la mutante 277F fue confirmada por PCR utilizando un par de *primers* diseñados específicamente: 277F-FW: 5'-AAACGAATCCACCGCAGCCA -3' y 277F-RV: 5'-CTACATGCTTCGGTAAAGA-3', la ausencia de la inserción en las plantas del genotipo salvaje fue confirmada también por PCR utilizando el *primer* 277F-RV junto con el *primer* LB3 (5'- GCTGGTGAAGTCTACTGACA -3'). En una población segregante F2, producto de la cruce entre 277F y el genotipo salvaje Col2, se observó la co-segregación entre la presencia del inserto de T-DNA y el fenotipo mutante.

### ***Extracción de ARN y cuantificación de la expresión por RT-PCR***

Para cuantificar los niveles de expresión de ARN se llevo a cabo la extracción total de ARN utilizando el RNeasy Miniprep kit (Quiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizó 1ug de ARN previamente tratado con DNasa RNasa- Free (Promega) (Incubándolo por 30 min con 1 unidad de Dnasa), para la síntesis de cDNA. Mediante una reacción de retro transcripción (RT) con la enzima transcriptasa inversa (RT SuperScript III, Invitrogen) se sintetizó el nuevo cDNA siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras se colocaron en un termociclador y los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa 1.5% y transferidos a una membrana Hybon H+ (Amersham). La preparación de las sondas y la hibridación y los lavados de las membranas fueron seguidos según los pasos descritos en el protocolo del kit AlkPhos Direct (Amersham). Para la generación y la detección de la señal por quimioluminiscencia se utilizó la solución CDP-Star (Amersham). Las membranas fueron expuestas a placas radiográficas Kodak y el revelado se realizó siguiendo el protocolo estándar. Para medir los niveles del gen *LHY* en la mutante 277F, se utilizó el siguiente par de *primers*: 277-FW:5'-AATCCGCCTCCTCGTCCTA-3' 277-RV:5'-CCTGTGAATGACAAGCTGGA-3'.

### ***Expresión global de genes***

La semillas de los distintos genotipos fueron esterilizadas superficialmente y sembradas en placas de Petri que contenían medio MS- agar 1.5%. Las cajas fueron colocadas en oscuridad a 4 °C durante 4 días y luego expuestas al tratamiento lumínico correspondiente

durante 4 días. Luego las plántulas fueron cosechadas y extraído su ARN utilizando el RNeasy Miniprep kit (Quiagen). Mediante el servicio de procesamiento de microarreglos del IFEVA se realizó la hibridación de los microchips desarrollados por la compañía affymetrix que contienen oligonucleótidos de ADN que representan aproximadamente 24000 genes diferentes.

#### *Acción sinérgica entre luz roja y luz azul*

Se utilizaron semillas de los genotipos *cry1-1*, *phyB-5* y genotipo salvaje (*Ler*), en el fondo genético de *Ler*. Se cultivaron las plántulas durante 3 días en luz roja, y al cuarto día se suplemento con 3 h de luz azul y luego retornaron a la luz roja. Se tomaron muestras a tiempo 0, 3, 6 y 9 h. del suplemento de luz azul (el punto 0 h nunca recibió luz azul, es el control de luz roja). Para cada punto, se obtuvieron 3 muestras del genotipo salvaje y dos muestras de la mutante *phyB* y de la mutante *cry1* como réplicas biológicas independientes.

Los datos de expresión fueron normalizados con la suma de cada microarreglo. El análisis de los genes de expresión fue restringidos a aquellos genes que mostraban tres P o dos P y una M (presencia en el software Affymetrix) en al menos una de las condiciones en *Ler*, quedando así 13866 genes. Estos genes fueron utilizados para un ANOVA de dos vías (tres genotipos y cuatro puntos) y la suma de cuadrados de cada tratamiento fue particionada para calcular los efectos de la mutación de *cry1* comparada con *Ler* (para efectos principales e interacciones).

Para investigar la dependencia a la respuesta de la luz azul por *phyB* la naturaleza persistente o transitoria en la respuesta a la luz azul utilizamos contrastes de medias basada en la partición de la suma de cuadrados del ANOVA siguiendo los criterios establecidos a priori. Los genes con respuesta a la luz azul mediada por *cry1* reducidos significativamente por la mutación de *phyB* fueron aquellos que mostraron efectos significativos (efecto principal o interacción) en la mutación de *phyB* comparada con *Ler* y mayor respuesta a la luz azul (suma de la respuesta en 3, 6 y 9 h) en *Ler* que en el mutante *phyB*. Por otro lado, un gen fue considerado afectado por la luz azul en forma permanente y percibido por *cry1* si para *Ler* muestra diferencias significativas entre el control de luz roja y la combinación de los datos cosechados en el tiempo 6 y 9 h o si muestra diferencias significativas entre el control de luz roja y la combinación de los datos cosechados en el tiempo 3, 6 y 9 h y sin diferencias significativas entre 3 h *versus* 6 y 9 h. Los genes que no mostraron efectos

persistentes a la luz azul fueron considerados como transitorios si para *Ler* mostraban diferencias significativas entre el control de luz roja y el tiempo de cosecha 3 h.

La combinación de estos dos criterios define 4 grupos de genes que fueron agrupados en *clusters* siguiendo el procedimiento descrito por De Smet y colaboradores (2002), usando una probabilidad de 0.9 que un gen pertenezca a un *cluster*. Para concentrarnos en la respuesta a la luz azul, cada gen fue relativizado al promedio de expresión que tenía en el control de luz roja.

Para definir los genes afectados por *phyB* en plántulas que no fueron expuestas a la luz azul, usamos ANOVA entre *Ler* y el mutante *phyB* en el control de luz roja. A partir de este ANOVA calculamos el valor *q*.

#### *Señales fluctuantes de sombreado vegetal*

Se utilizaron semillas del genotipo salvaje Col y se cultivaron con un fotoperíodo de 10 h (de 8 a 18 h local) en los siguientes tratamientos: **LL**: 10 h de luz solar plena, **LS**: las primeras 8 h en luz solar y las últimas 2 h del fotoperíodo debajo de la sombra de un canopeo, **SL**: las primeras 8 h en sombra y las últimas 2 h en luz solar y **SS**: 10 h de sombra. Al tercer día de tratamiento se realizó la cosecha de las muestras a las 17 h., momento en el que había transcurrido una hora del cambio de condición lumínica en los tratamientos de LS y SL. Para cada punto, se obtuvieron 2 muestras como réplicas biológicas independientes.

Los datos de expresión fueron normalizados con la suma de cada microarreglo. El análisis de los genes de expresión fue restringido a aquellos genes que mostraban dos P en al menos uno de los tratamientos (SS, SL, LS y LL). Estos genes fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores, seleccionando los genes que tenían efecto significativo entre tratamiento con un  $P < 0.01$ , quedando así 4922 genes. Con estos genes se calculó el efecto de interacción entre los tratamientos que recibían luz (LL y LS) o sombra (SS y SL) al principio del día de los que recibían luz (LL y SL) o sombra (SS y LS) al final del día. Se seleccionaron 1190 genes cuya expresión mostró interacción entre la condición actual (L o S) y la condición previa (L o S) con efecto significativo con  $P < 0.05$  y un valor de  $q < 0.05$  (Storey and Tibshirani, 2003). Estos genes los denominamos genes “con interacción”. Los genes que no mostraron una interacción significativa, son aquellos que

dependen de la condición actual (L o S) y de la previa (L o S) de manera aditiva. Así quedaron 3732 genes que denominamos “con respuesta aditiva”. Estos dos grupos de genes se clasificaron en *clusters* usando el método descrito por De Smet et al. 2002.

Para analizar aquellos genes cuya expresión está alterada significativamente en la mutante de *hy5* respecto del genotipo salvaje, se utilizaron semillas del genotipo salvaje Col y la mutante *hy5-221*. Se realizó el mismo procedimiento descrito arriba, pero sólo en el tratamiento de SL. Para cada genotipo, se obtuvieron 2 muestras como réplicas biológicas independientes. Se normalizaron los datos con la suma de cada microarreglo y se restringió el análisis con aquellos genes que mostraban dos P en al menos uno de los genotipos. Luego se realizó un ANOVA y se seleccionaron los genes que tenían efecto significativo entre ambos genotipos con un  $P < 0.05$ , quedando así 2714 genes que muestran diferencias significativas afectadas por la mutación de *hy5*.

#### ***Extracción de proteínas y western blotting de HY5***

Para analizar la abundancia de HY5 utilizamos plántulas HY5 OX1 sobreexpresando HY5-myc. Para realizar la extracción proteica se pulverizaron las plántulas con nitrógeno líquido, se colocó el material vegetal pulverizado en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se resuspendió en un buffer desnaturante con: 50 nM Tris/HCL pH 7.5, 100 nM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% TritonX100 y Protease Inhibitor Cocktail 1X (Roche). Luego se centrifugó por 20 min a 10.000 g a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a otro tubo.

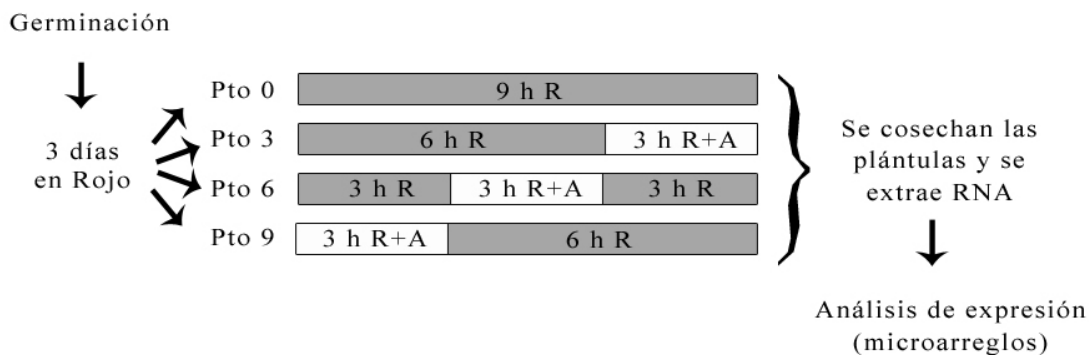
Para el western blot, se sembró el sobrenadante en un gel de SDS-poliacrilamida 15%, y las proteínas separadas se transfirieron por electroblotting desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Biosciences). Para la detección de HY5-myc, la membrana fue incubada con el anticuerpo anti-myc-HRP (Invitrogen) en un buffer de PBS que contenía 0.05% de Tween-20. Las bandas fueron visualizadas con un *kit* de quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences), de acuerdo con el protocolo del fabricante. La intensidad de la banda de HY5-myc se relativizó a la intensidad de una banda inespecífica presente en todos los tratamientos incluso en el control de plántulas no transgénicas. La intensidad de las bandas fue cuantificada utilizando la herramienta de Histograma del Photoshop 7.0.

## RESULTADOS PARTE 1

### Interacción sinérgica entre *phyB* y *cry1*

#### *El sinergismo entre phyB y cry1 genera histéresis en la expresión de genes*

Para investigar los mecanismos moleculares que generan la interacción sinérgica entre *phyB* y *cry1* en condiciones sub-óptimas de luz realizamos un análisis de expresión global con microarreglos. Cultivamos plántulas de genotipo salvaje (WT), del mutante de *cry1* y de mutante de *phyB* de *Arabidopsis thaliana* por 3 días bajo luz roja (R), un tratamiento que activa al *phyB* pero no a *cry*. En el tercer día, suplementamos con luz azul (R+A) por 3 horas para activar a *cry*, y luego las plántulas volvieron a luz roja (Fig. 3). Las plántulas fueron cosechadas y el ARN extraído se hibridizó con microarreglos de Affymetrix ATH1. Como control se utilizaron plántulas que nunca recibieron luz azul (punto 0).



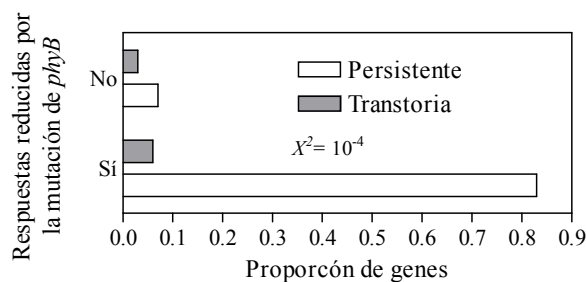
**Fig. 3: Protocolo de cosecha para el análisis de expresión global.**

La expresión de los genes fue analizada mediante un ANOVA de dos vías (tres genotipos y cuatro puntos) y la suma de cuadrados de cada tratamiento fue particionada para calcular los efectos de la mutación de *cry1* comparada con *Ler* (para efectos principales e interacciones). Se seleccionaron 462 genes con un efecto principal significativo en *cry1* con  $P < 0.05$  y un valor de  $q < 0.1$  (Storey and Tibshirani, 2003). Ninguno de los genes que no fueron seleccionados por un efecto principal en *cry1* mostró interacción significativa entre *cry1* y el tiempo de cosecha. Las diferencias significativas



entre *Ler* y *cry1* podrían deberse a una mayor respuesta a la luz azul en un genotipo o en el otro, por ello eliminamos los genes que mostraban mayor respuesta en el mutante de *cry1*. Así seleccionamos los genes que son específicamente controlados por *cry1* en respuesta a la luz azul, obteniendo 324 genes que muestran una respuesta al tratamiento de luz azul que está reducida significativamente en el mutante de *cry1* (Tabla 1, Anexo).

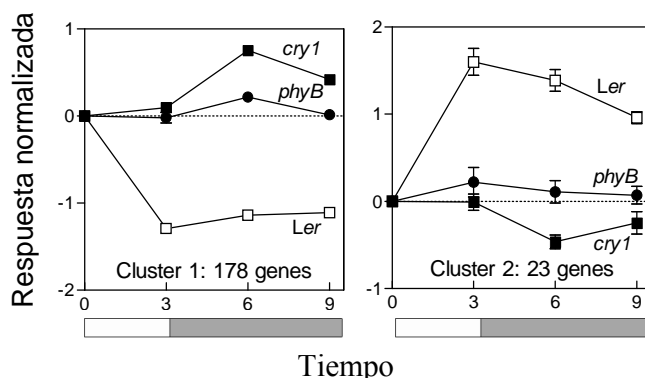
Dentro de los genes con respuesta a la luz azul mediada por *cry1*, aquellos que además mostraron respuesta significativamente reducida por la mutación de *phyB* fueron los que mostraron efectos significativos (efecto principal o interacción) de la mutación de *phyB* comparada con *Ler* y mayor respuesta a la luz azul (suma de la respuesta en 3, 6 y 9 h) en *Ler* que en el mutante *phyB*. De los 324 genes con respuesta a la luz azul mediada por *cry1*, 240 entran en esta categoría, es decir, también requieren *phyB* para responder. Un set de 26 genes muestran una respuesta a la luz azul no reducida en la mutación de *phyB* (esto incluye genes con respuesta significativamente mayor en el mutante de *phyB* que en *Ler*). Los 58 genes restantes no pudieron ser clasificados porque mostraban efecto no significativo en la mutación de *phyB* pero la suma de la respuesta a 3, 6 y 9 h fue mayor en *Ler*. Por este motivo, los genes fueron reducidos de 324 a 266. Estos genes fueron clasificados usando dos criterios: a) la respuesta a la luz azul mediada por *cry1* desaparece o persiste luego de la duración del tratamiento de luz, y b) la respuesta mediada por *cry1* es reducida o no en la ausencia de *phyB* activo (en el mutante de *phyB*). La combinación de estos dos criterios define 4 grupos de genes (Fig. 4). De los 266 genes, 238 mostraron una respuesta persistente y 28 una respuesta transitoria: 221 con un efecto persistente a la luz azul reducido en el mutante de *phyB*, 19 con un efecto transitorio reducido por la mutación de *phyB*, 17 con un efecto persistente a la luz azul que no se encontraba reducido en el mutante de *phyB*, y 9 con un efecto transitorio no reducido en el mutante de *phyB*. Entonces, la mayoría de los genes que muestran una respuesta mediada por *cry1* pertenecen al grupo en donde la respuesta persiste más allá del tratamiento de luz azul y requiere de *phyB* (Fig. 4). Los cuatro grupos de genes fueron a su vez agrupados en *clusters* siguiendo el procedimiento descrito por De Smet y colaboradores (2002).



**Fig. 4: Proporción de genes que muestran respuestas persistentes o transitorias a la luz azul percibida por cry1 dependiendo o no de la presencia de phyB.**

Los genes del grupo que responden a la luz azul percibida por cry1 en los cuales dicha respuesta es persistente y requiere phyB, forman dos *clusters* principales (Fig. 5). El *cluster* 1, en donde la expresión es reprimida por la luz azul, encontramos genes que tienen una función conocida en la regulación del desarrollo y podrían estar involucrados en el modelamiento y función de la planta en respuesta a la luz azul como son *CULLIN4*, *ARGONAUTA1*, *AINTEGUMENTA*, *CYCLIN-DEPENDENT KINASE C2*, *SYNTAXIN 23* (Nole-Wilson et al., 2006, Sorin et al., 2005, Cui et al., 2007, Chen et al., 2006, Ohtomo et al., 2005). En el *cluster* 2, cuya expresión es promovida por la luz azul, encontramos varios genes relacionados a los cloroplastos, incluyendo dos genes de proteasas FtsH (Zaltsman et al., 2005), sugiriendo que la luz azul transitoria percibida por cry1 podría inducir la aclimatación del aparato fotosintético.

Debido a que 3 horas de luz azul generan cambios que persisten aún 6 horas después de la finalización del tratamiento de azul, podemos concluir que el sinergismo entre phyB y cry1 genera histéresis en la expresión de genes.



**Fig. 5: Los dos clusters principales del grupo donde la respuesta persiste más allá del tratamiento de luz azul y requiere de phyB.**

### *El sinergismo entre phyB y cry genera histéresis en la inhibición del crecimiento del hipocotilo*

A partir de los resultados del estudio de transcriptoma, decidimos utilizar el mismo protocolo de luz para investigar respuestas en el crecimiento del hipocotilo. Estos experimentos fueron realizados en el fondo genético de Columbia (Col) y se utilizó el doble mutante *cry1 cry2* porque en Col el *cry2* tiene una contribución a las respuestas de luz azul que no es evidente en *Ler*. Así vemos que en el genotipo salvaje, Col, la luz azul reduce la tasa de crecimiento durante la aplicación del tratamiento (tiempo 3) y esta reducción se mantiene aún cuando se termina el tratamiento con luz azul suplementada y las plántula vuelven a estar solo en luz R (tiempo 6 y 9) (Fig. 6). En el mutante de *phyB* y el doble mutante *cry1 cry2*, la tasa de crecimiento se mantiene constante incluso durante el tratamiento de luz R+A (tiempo 3) (Fig. 6). Cuando observamos que ocurre en el control de plántulas que crecen todo el tiempo en luz R, vemos que la tasa de crecimiento no decae en ningún momento. Las plántulas mostraban una tasa de crecimiento constante y la disminución de la tasa de crecimiento en el genotipo salvaje se debe al suplemento de luz azul (Fig. 6). Podemos concluir entonces, que el sinergismo entre *phyB* y *cry1-cry2* genera histéresis en la inhibición del crecimiento del hipocotilo.

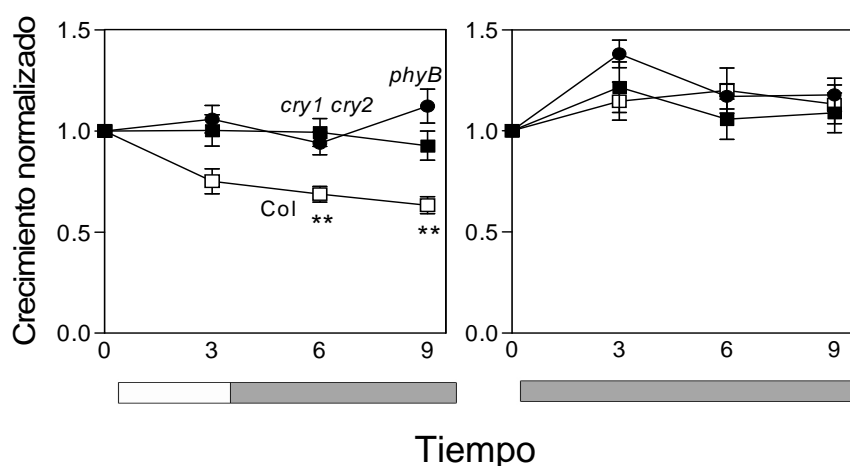
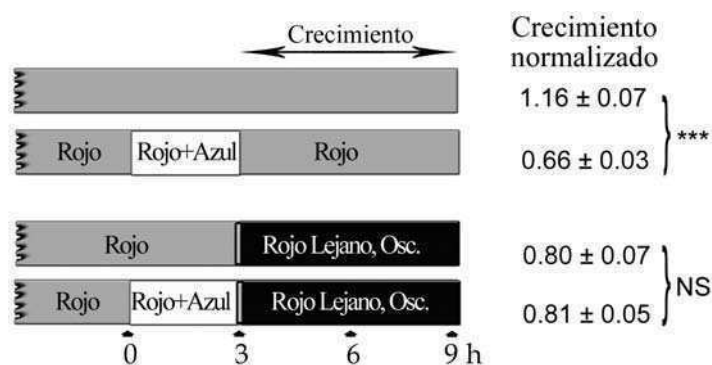


Fig. 6: Crecimiento normalizado de plántulas del genotipo salvaje, la mutante de *phyB* y la mutante de *cry1* en plántulas cultivadas en luz R continua suplementada o no con luz A (R+A).

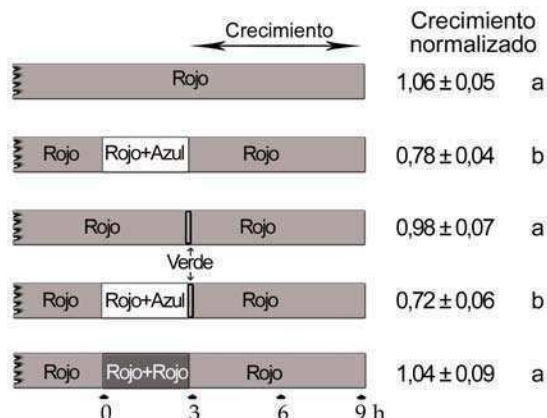
También utilizamos una variación en el protocolo mostrado en la Fig. 4, en donde luego de la luz azul (tiempo 3 h) las plántulas recibieron un pulso de RL seguido de oscuridad para reducir la cantidad de phyB activo al mínimo. Al aplicar luz azul a plántulas que estaban en luz R observamos que ocurre una inhibición del crecimiento que persiste mas allá de la luz azul ( $0.66 \forall 0.03$ ) que no ocurre en el control de luz R, nunca expuestos a la luz azul ( $1.16 \forall 0.07$ ). En cambio, si las plántulas reciben un pulso de RL seguido de oscuridad luego del suplemento de luz azul, no ocurre la inhibición del crecimiento (Fig. 7). Esto indica que aunque phyB este activo por luz R antes y durante el tratamiento de luz azul, también es necesario que este activo luego de la activación de cry.



**Fig. 7: Crecimiento normalizado de plántulas del genotipo salvaje, cultivadas en luz R expuestas o no a 3 h de luz A (R+A) y luego transferidas a luz R o a oscuridad con un pulso previo de RL.**

La duración de la señalización de cry luego de la finalización de la luz azul no ha sido establecida. La luz verde podría retornar a cry a su estado inactivo (Bouly et al., 2007). Por este motivo decidimos dar un pulso de luz verde luego del tratamiento de luz azul para bajar los niveles de cry activo luego del suplemento de luz azul. Cuando aplicamos luz verde luego del suplemento de luz azul observamos que ésta no redujo el sinergismo en el tratamiento de R+A (Fig. 8). Para descartar la posibilidad de que el sinergismo se debiera a un efecto en el aumento de la irradiancia y no por el suplemento de luz azul probamos el mismo protocolo pero en vez de agregar 3 h de luz azul al fondo de R, agregamos 3 h de R (R+R) (con la misma tasa de flujo que en el caso de luz azul). En este tratamiento no observamos el sinergismo que si observamos al suplementar con luz A (Fig. 8). Así

podemos establecer una secuencia en donde *cry* aumenta la señalización mediada por *phyB* y no viceversa.

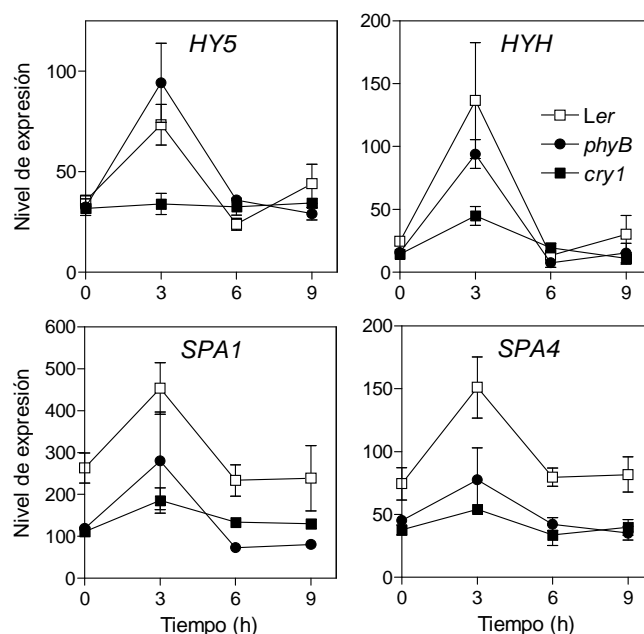


**Fig. 8:** Crecimiento normalizado de plántulas del genotipo salvaje, cultivadas en luz roja expuestas o no a 3 h de luz azul o 3 h de luz roja más intensa con la aplicación o no de un pulso de luz verde al final de las 3 h.

### ***La activación de *cry1* recluta nuevos genes para el control de *phyB****

En la comparación de la expresión de los controles del genotipo salvaje versus el mutante de *phyB* en luz R, se obtuvieron 551 genes que tienen la expresión afectada por *phyB* ( $P < 0.005$ ,  $q < 0.1$ ) (Tabla 2, Anexo). Sin embargo, solo el 6 % de los genes que muestran sinergismo entre *cry1* y *phyB* tienen niveles de expresión que ya estaban afectados por *phyB* en luz R. Esta baja superposición sugiere que la activación de *cry1* recluta nuevos genes para el control de *phyB*, que no eran afectados por *phyB* en la ausencia de actividad de *cry1*.

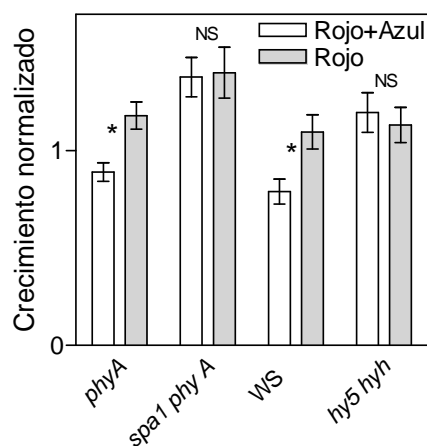
Consistentemente con reportes previos, la luz azul promovió la expresión de varios genes con función fotomorfogénica conocida, incluyendo a *SPA1*, *SPA4*, *HY5* y *HYH*. (Hoecker et al. 1999; Holm et al., 2002) (Fig. 9). La inducción de estos genes no muestran sinergismo entre *phyB* y *cry1* porque la promoción por luz azul esta reducida en el mutante de *cry1* pero no en el de *phyB* (Fig. 9).



**Fig. 9:** Nivel de expresión de los genes *HY5*, *HYH*, *SPA1* y *SPA4* promovidos por la luz azul percibida por *cry1*.

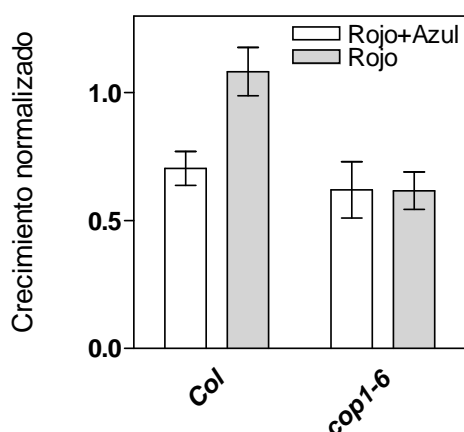
***La inhibición del hipocotilo en el sinergismo entre phyB y cry requiere de SPA1 y HY5/HYH.***

La falta de histéresis en la expresión de estos genes es consistente con la ausencia de sinergismo, sin embargo, el producto de estos genes podría estar involucrado en la generación de co-acción. Para ello medimos la tasa de crecimiento con el mismo protocolo de luz que el utilizado anteriormente en la mutante de *spa1* (en el fondo genético de la mutante de *phyA* para evitar los efectos mediados por *phyA*) y en la doble mutante *hy5 hyh*. El mutante de *phyA* presenta una inhibición en el largo del hipocotilo al suplementar luz A, en cambio en el doble mutante *spa1 phyA* no ocurre esta inhibición. La doble mutante *hy5 hyh* tampoco presenta la inhibición del hipocotilo que se observa en el genotipo salvaje (WS) luego del tratamiento de luz azul (Fig. 10). Esto indica que la histéresis en la inhibición del hipocotilo generada por la acción combinada de *phyB* y *cry* requiere de *SPA1* y *HY5/HYH*.



**Fig. 10:** Crecimiento normalizado de plántulas de la mutante *phyA*, la doble mutante *spa1 phyA*, la doble mutante *hy5 hyh* y el genotipo salvaje (WS) cultivadas en luz roja continua suplementada o no con luz azul.

Las proteínas SPA interactúan con COP1 (Hoecker y Quail, 2001), por eso decidimos observar que ocurría con mutantes de *cop1* en el mismo tratamiento (Fig. 11). Así obtuvimos que las mutantes de *cop1* también fallan en el sinergismo entre *phyB* y *cry*.



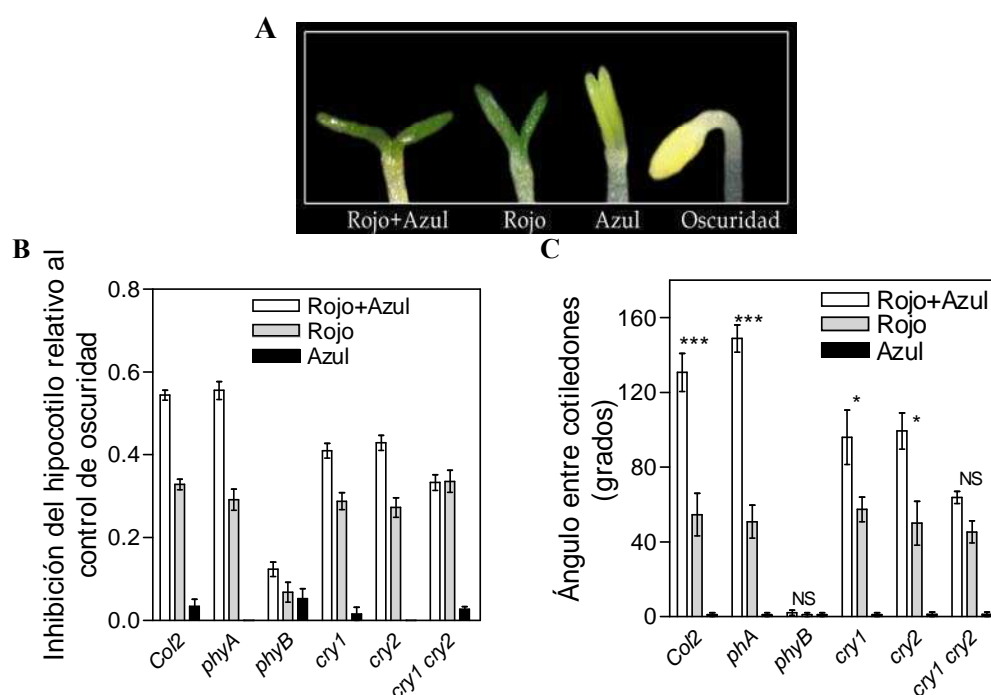
**Fig. 11:** Crecimiento normalizado de plántulas de la mutante *cop1-6*, y el genotipo salvaje (Col) cultivadas en luz roja continua suplementada o no con luz azul.

Para estudiar las consecuencias del sinergismo a largo plazo, usamos un protocolo de luz similar al que veníamos usando repetido por tres días e incluyendo controles de oscuridad y controles que eran expuestos por 3 horas diarias de luz A terminado con un pulso de RL seguido de oscuridad para activar a *cry* sin activar a *phyB* (Fig.12).



**Fig. 12:** Protocolo de luz para estudiar el sinergismo a largo plazo.

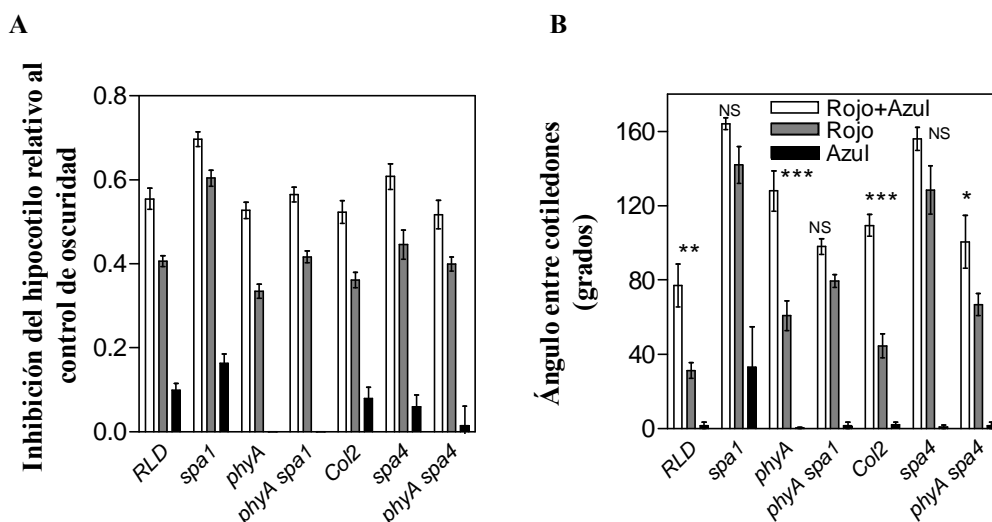
En el genotipo salvaje la luz A no tiene efectos significativos en la apertura de cotiledones ni en la inhibición del hipocotilo cuando no se encuentra en un fondo de luz roja que activa al phyB. Sin embargo cuando las 3 h de luz A son suplementadas en luz R continua que activa al phyB (R+A), se promueve la apertura de cotiledones y la inhibición del hipocotilo (Fig. 13). El mutante de *phyB* y el doble mutante *cry1 cry2*, fallan en la respuesta al suplemento de luz azul ya que en el tratamiento R+A no presenta diferencias significativas con el tratamiento de R ni en la inhibición del hipocotilo ni en el ángulo entre los cotiledones (Fig. 13 B y C).



**Fig. 11:** A) Foto de la apertura de los cotiledones en el genotipo salvaje (Col2) en los tratamientos: Rojo+Azul, Rojo, Azul y Oscuridad. B) Inhibición del hipocotilo relativo al control de oscuridad en los tratamientos Rojo+Azul, Rojo y Azul en plántulas del genotipo salvaje (Col2), mutante *phyA*, mutante *phyB*, mutante *cry1*, mutante *cry2* y la doble mutante *cry1 cry2*. C) Ángulo entre los cotiledones en los mismos genotipos y tratamientos.



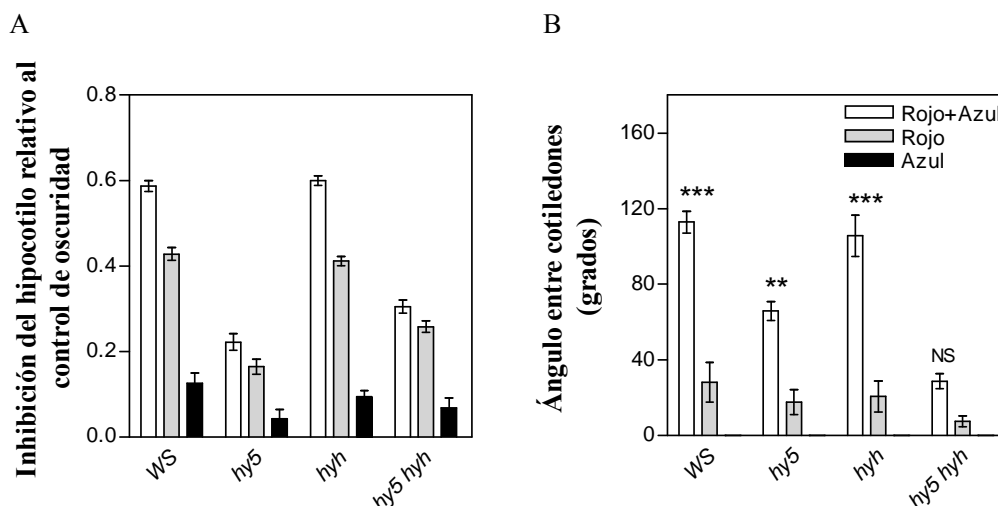
Realizamos los mismos experimentos con mutantes de *spa1*, *spa1 phyA*, *spa4*, *spa4 phyA*, *hy5*, *hyh* y *hy5 hyh*. Las mutantes de *spa1* y *spa4* fallan en la respuesta a la luz azul y esta falla también se observa en el fondo genético de la mutante de *phyA* (Fig. 14). Por este motivo podemos decir que SPA1 y SPA4 aumentan las respuestas de phyB de un modo independiente de la vía de señalización de phyA cuando las plántulas son expuestas a la luz. Esta es una nueva función para los genes SPA. Las proteínas SPA trabajan con COP1 (Hoecker y Quail, 2001; Saijo et al., 2003), y en nuestro tratamiento habíamos observado que las mutantes de *cop1* fallan en el sinergismo entre phyB y cry (Fig. 11). Esto sugiere que COP1 también actúa como un regulador positivo de la fotomorfogénesis mediada por phyB.



**Fig. 14:** A) Inhibición del hipocotilo relativo al control de oscuridad en los tratamientos Rojo+Azul, Rojo y Azul en plántulas de los genotipos salvajes (RLD y Col2), mutante *spa1*, mutante *phyA*, mutante *spa4*, la doble mutante *phyA spa1* y la doble mutante *phyA spa4*. B) Ángulo entre los cotiledones en los mismos genotipos y tratamientos.

La mutante *hy5* muestra reducida la respuesta en luz R en comparación con el genotipo salvaje y al suplementar con luz A (R+A) presenta un largo de hipocotilo similar al que presenta en el tratamiento de R, o sea falla en la respuesta al suplemento de luz azul. En cambio, en la apertura de los cotiledones responde bien al suplemento de luz A (Fig. 15).

El mutante de *hyh* muestra una apertura de los cotiledones y una inhibición del hipocotilo normal en luz R y aparentemente mayor sinergismo en luz roja con luz azul comparado con el genotipo salvaje. Sin embargo la doble mutante *hy5 hyh* falla en la respuesta al suplemento de luz A (Fig. 15). Esto indica que HY5 y HYH actúan en forma redundante y ambos son requeridos para la co-acción entre phyB y cry.



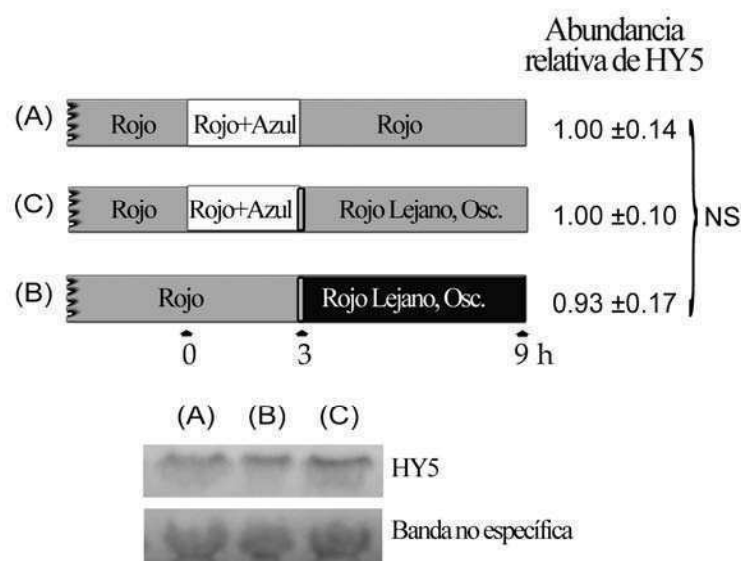
**Fig. 15: A) Inhibición del hipocotilo relativo al control de oscuridad en los tratamientos Rojo+Azul, Rojo y Azul en plántulas del genotipo salvaje (WS), mutante *hy5*, mutante *hyh* y la doble mutante *hy5 hyh*. B) Ángulo entre los cotiledones en los mismos genotipos y tratamientos.**

### ***phyB no es necesario par la estabilización de la proteína HY5***

Como se sabe que cry controla la expresión de *HY5* y la luz regula la degradación mediada por COP1 de la proteína *HY5* en el proteosoma (Holm et al, 2002) quisimos investigar si *phyB* era necesario para estabilizar a *HY5* en el momento en que *phyB* es necesario para la respuesta persistente por la excitación de cry. Cultivamos plantas transgénicas que sobreexpresan *HY5* con un tag Myc en luz R, luego las expusimos a 3 horas de luz A (R+A) y un grupo retorno a la luz R mientras el otro recibió un pulso de RL y fue a oscuridad. Un tercer grupo nunca recibió la luz A, fue transferido de la luz R a oscuridad luego de un pulso de RL.

Cuando las plántulas que se les aplicaba un pulso de RL luego de suplementar con luz A (R+A) no se observa la inhibición del crecimiento ya que pasar a *phyB* a su estado inactivo

elimina el efecto persistente de la luz A en el crecimiento del hipocotilo (Fig. 7). Cuando evaluamos en las mismas condiciones la abundancia relativa de HY5 al aplicar un pulso de RL luego del suplemento de luz A, vemos que no ocurren cambios con respecto a las plántulas que no reciben el pulso de RL (Fig. 16). Podemos concluir que phyB es necesario para la respuesta de HY5 pero no para estabilizar la proteína HY5.

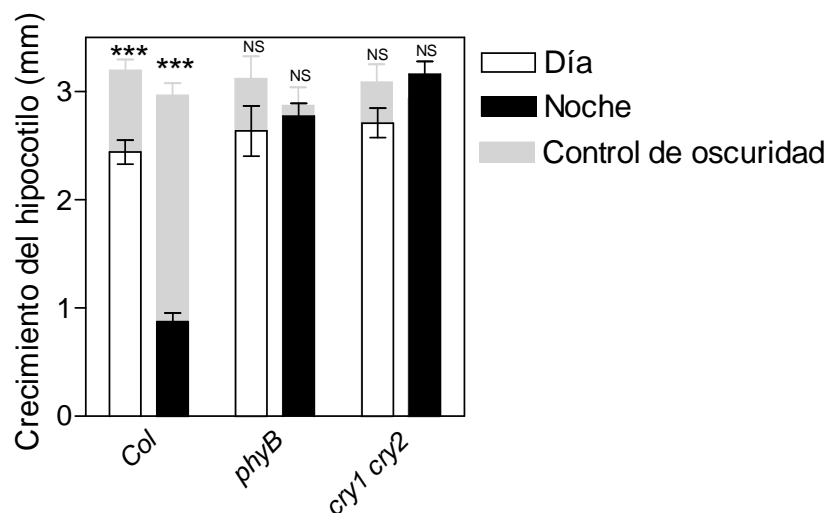


**Fig. 16: Abundancia relativa de la proteína HY5 en plántulas sobre-expresantes de HY5, cultivadas en luz roja expuestas o no a 3 h de luz azul y luego transferidas a luz roja o a oscuridad con un pulso previo de rojo lejano.**

### ***El sinergismo induciría la transición a la fotoautotofía***

La acción combinada de phyB y cry genera histéresis en la respuesta que persiste más allá de la presencia del tratamiento de luz azul requerido para activar a cry. Como phyB permanece activo durante la primera parte de la noche (Casal, 1996) especulamos que el sinergismo podría ayudar a la planta a mantener la inhibición del crecimiento del hipocotilo durante la oscuridad. Por este motivo diseñamos un experimento en donde plántulas de *Arabidopsis* fueron cultivadas en oscuridad por 2 días y luego transferidas a la luz (R+A) por 12 h seguidas de 12 h de oscuridad. En el genotipo salvaje observamos que el crecimiento del hipocotilo fue levemente reducido durante la exposición a la luz y más fuertemente reducido durante la noche siguiente (Fig. 17). La mutación en *phyB* o *cry1 cry2* tuvieron poco efecto durante la exposición a la luz pero fueron suficientes para eliminar la

inhibición persistente del crecimiento del hipocotilo en la noche subsiguiente (Fig. 17). Podemos concluir que el sinergismo entre *phyB* y *cry* es necesario para el desarrollo de la plántula y si uno de los fotorreceptores falta, el crecimiento vuelve a los valores observados antes del estímulo de luz.



**Fig. 17:** Crecimiento del hipocotilo en plántulas de genotipo salvaje (Col2), mutante de *phyB* y la doble mutante *cry1 cry2*, cultivadas en oscuridad por 2 días y luego transferidas a la luz por 12 h seguidas de 12 h de oscuridad y el control de oscuridad que nunca recibió luz.

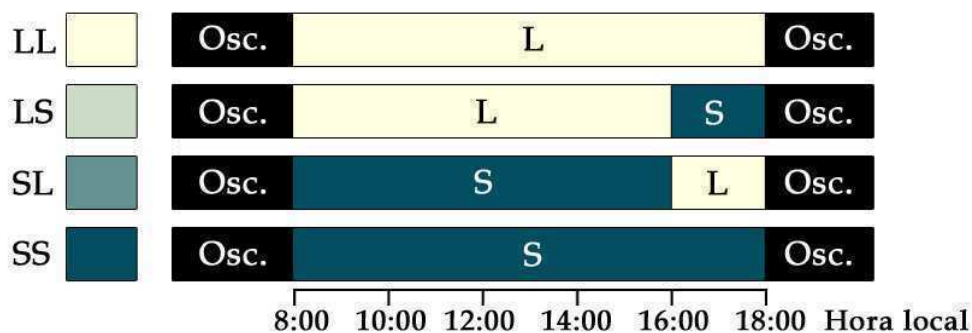
## RESULTADOS PARTE 2

### Integración de la información provista por períodos alternados de luz solar plena o sombra

---

#### *Respuesta fisiológica a señales fluctuantes de sombreado vegetal*

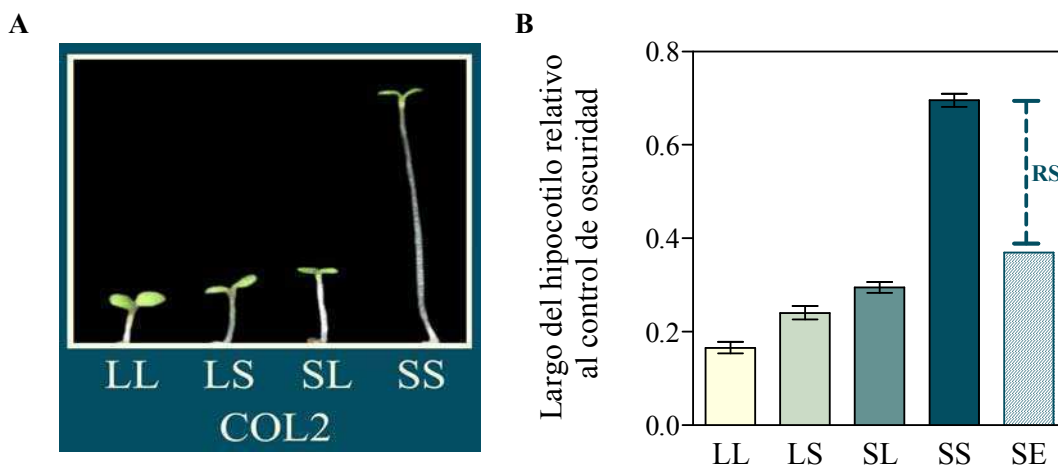
La luz solar directa tiene altas proporciones de luz roja y luz azul, mientras que la luz reflejada o transmitida por plantas vecinas que llega a plantas creciendo debajo de un canopeo denso esta enriquecida en RL. Esto produce una disminución en la relación R/RL y en la radiación total incidente en presencia de plantas vecinas, promoviendo el alargamiento del tallo en una plántula (Ballaré et al., 1987). Para estudiar el modo y los procesos fisiológicos y moleculares que le permiten a una plántula integrar la información recibida en condiciones fluctuantes de sombra y luz solar plena, diseñamos un protocolo donde se cultivan por 3 días plántulas de *Arabidopsis* con un fotoperíodo de 10 h en los siguientes tratamientos: **LL**: 10 h de luz solar plena, **LS**: las primeras 8 h en luz solar y las últimas 2 h del fotoperíodo debajo de la sombra de un canopeo, **SL**: las primeras 8 h en sombra y las últimas 2 h en luz solar y **SS**: 10 h de sombra (Fig. 18).



**Fig. 18: Protocolo para combinar periodos de sombra y periodos de luz solar plena (LL, LS, SL y SS). L: horas en luz solar plena, S: horas en sombra de un canopeo, Osc: oscuridad.**

En el tratamiento SS las plántulas presentaron hipocotilos largos debido a la baja relación R/RL y la baja irradiancia, mientras que en el tratamiento de LL los hipocotilos fueron cortos debido a las altas relaciones R/RL y la alta irradiancia recibida (Fig. 19). En

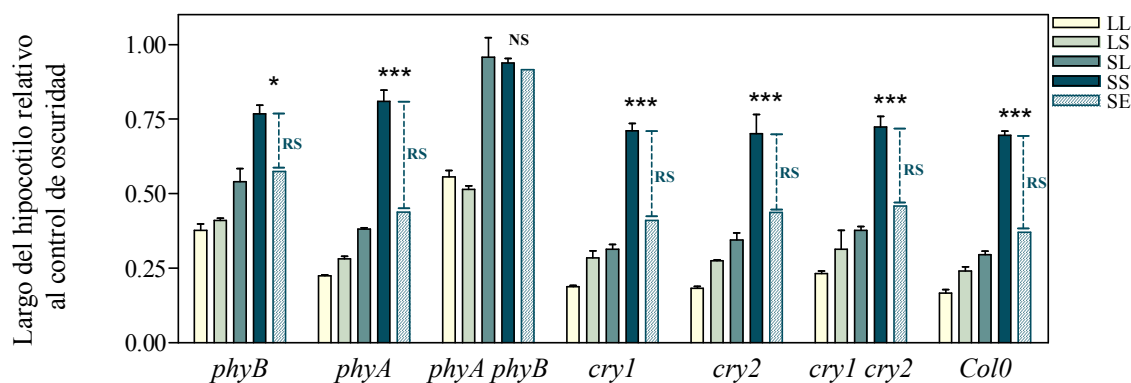
las plántulas cultivadas en el tratamiento de LS, el alargamiento del hipocotilo es un poco mayor al obtenido en el tratamiento de LL. Esto se debe a que estas plántulas a diferencia de las cultivadas en el tratamiento LL, recibieron 2 h de sombra diarias (condición que promueve el alargamiento del hipocotilo). En cambio, cuando analizamos que ocurre en el tratamiento de SL, vemos que las plántulas tienen un largo del hipocotilo mucho menor que en el tratamiento de SS. En el tratamiento de SL, las plántulas recibían solo 2 h de luz solar plena y 8 h de sombra. Si la percepción del tiempo de exposición a la sombra respondiera a un modelo de integración aditivo, sería de esperar que el largo del hipocotilo en LL más el aumento del alargamiento obtenido en el tratamiento de LS más el aumento del alargamiento obtenido en SL (SE), fuese igual al largo del hipocotilo en el tratamiento de SS (Fig. 19 B). Esto no ocurre así, ya que el largo del hipocotilo en el tratamiento de SS es mayor al obtenido con un modelo aditivo (SE), evidenciando la existencia de un efecto sinérgico (RS) en el tratamiento de SS, en que se combina sombra a la mañana y sombra a la tarde.



**Fig. 19: A) Plántulas del genotipo salvaje cultivadas durante tres días en cada tratamiento utilizado (LL, LS, SL y SS). B) Largo del hipocotilo relativo al control de oscuridad en el genotipo salvaje en los cuatro tratamientos y la longitud esperada en sombra según un modelo aditivo (SE). Respuesta sinérgica de la combinación de sombra temprana y sombra tardía.**

Para determinar cuál o cuáles son los fotorreceptores involucrados en este sinergismo entre sombra temprana y sombra tardía realizamos los cuatro tratamientos de luz (LL, LS,

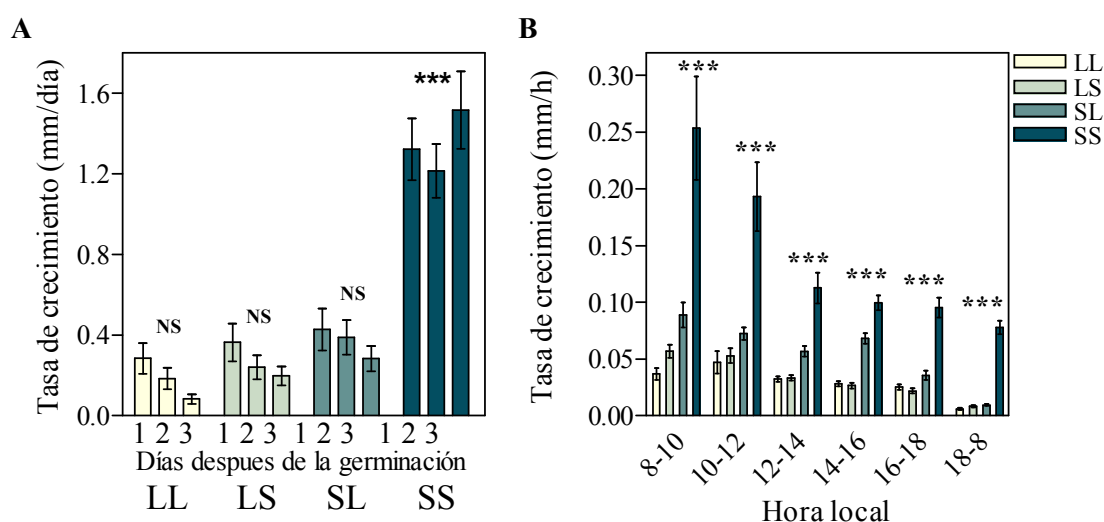
SL y SS) y el control de oscuridad utilizando plantas mutantes de distintos fotorreceptores *phyB*, *phyA*, *cry1*, *cry2* y los dobles mutantes *phyA phyB*, *cry1 cry2* junto con el genotipo salvaje (Col0) como control (Fig. 20). Los mutantes *cry1* y *cry2* presentan un largo del hipocotilo un poco mayor al genotipo salvaje en los tratamientos de LL, LS y SL obteniendo así una SE más cercana al tratamiento de SS o sea un efecto sinérgico (RS) menor. En el doble mutante *cry1 cry2* se observa el mismo patrón pero más acentuado. Las plántulas de *phyB* y *phyA* tienen un largo de hipocotilo mayor en todos los tratamientos obteniéndose un efecto sinérgico menor en la mutante *phyB*. En el doble mutante *phyA phyB* además de tener un largo de hipocotilo mayor en todos los tratamientos no presenta diferencias entre los tratamientos de LL y LS ni entre los de SL y SS. Esto indicaría que ambos fotorreceptores son necesarios para sensar la presencia de luz plena en plantas que permanecen sombreadas el resto del día. Estos datos indican que la integración de la información recibida del tiempo de permanencia bajo sombra o luz solar plena es mediada tanto por los fitocromos como por los criptocromos, teniendo un rol más importante los fitocromos.



**Fig. 20: Largo del hipocotilo relativo al control de oscuridad en el genotipo salvaje (Col0) y en las mutantes *phyB*, *phyA*, *cry1*, *cry2* y las dobles mutantes *phyA phyB* y *cry1 cry2* en LL, LS, SL, SS y SE. Respuesta sinérgica de la combinación de sombra temprana y sombra tardía.**

Para conocer un poco más sobre la fisiología de esta respuesta analizamos en el genotipo salvaje la tasa de crecimiento en los cuatro tratamientos de luz, en cada día de tratamiento (Fig. 21 A). Encontramos que la tasa de crecimiento en los tratamientos de LL,

LS y SL decaen luego del primer día y que son considerablemente menores a la tasa de crecimiento en SS durante todo el experimento. Las tasas de crecimiento del hipocotilo son máximas en distintos momentos del día, dependiendo de factores externos (fotoperíodo, ambiente lumínico) y de factores internos (reloj circadiano) (Michael et al., 2008), por eso también decidimos estudiar la tasa de crecimiento cada 2 horas durante el transcurso del segundo día (Fig. 21 B). La tasa de crecimiento fue máxima al comienzo del día en todos los tratamientos y luego decayó gradualmente, alcanzando los niveles más bajos durante la noche. Si bien durante la noche la tasa de crecimiento decae en el tratamiento de SS, la misma es tan o más alta que en los otros tratamientos al comienzo del día. Estos resultados concuerdan con los del largo del hipocotilo al final del experimento (Fig. 19), en donde la longitud bajo el tratamiento SS es considerablemente mayor que en el resto de los tratamientos.



**Fig. 21:** A) Tasa de crecimiento de plántulas del genotipo salvaje durante cada día en los tratamientos LL, LS, SL y SS. B) Tasa de crecimiento de plántulas del genotipo salvaje cada dos horas durante el segundo día de cada tratamiento: LL, LS, SL y SS.

### *Análisis global de cambios de expresión génica en condiciones fluctuantes de sombreado vegetal*

Para estudiar qué mecanismos están involucrados en la integración de estas señales fluctuantes para las plantas, realizamos un análisis global de la expresión de genes en las



cuatro condiciones (LL, LS, SL, y SS). Los tratamientos se realizaron durante tres días de 8:00 a 18:00. Las plántulas fueron cosechadas al tercer día de tratamiento, una hora después del cambio de condición lumínica S a L (en SL) o L a S (en LS). Se extrajo el ARN que fue utilizado para hibridar con microarreglos de Affymetrix ATH1. Los datos obtenidos a partir de los microarreglos se analizaron mediante ANOVA y se seleccionaron 4922 genes que mostraban valores de  $q$  (Storey and Tibshirani, 2003) menores a 0,05 para efecto de los tratamientos. Estos genes se clasificaron en dos grupos: a) genes cuya expresión mostraba interacción entre la condición actual (L o S) y la condición previa (L o S). En lo sucesivo estos genes son denominados “con interacción” b) genes en los que la expresión dependía de la condición actual (L o S) y de la previa (L o S) de manera aditiva. En lo sucesivo estos genes son denominados genes “con respuesta aditiva”. Estos dos grupos de genes se clasificaron en *clusters* usando el método descrito por De Smet et al., 2002. De este modo obtuvimos 15 *clusters* en el grupo de genes “con respuesta aditiva” y 8 *clusters* en el de genes “con interacción” (Fig. 1, Anexo).

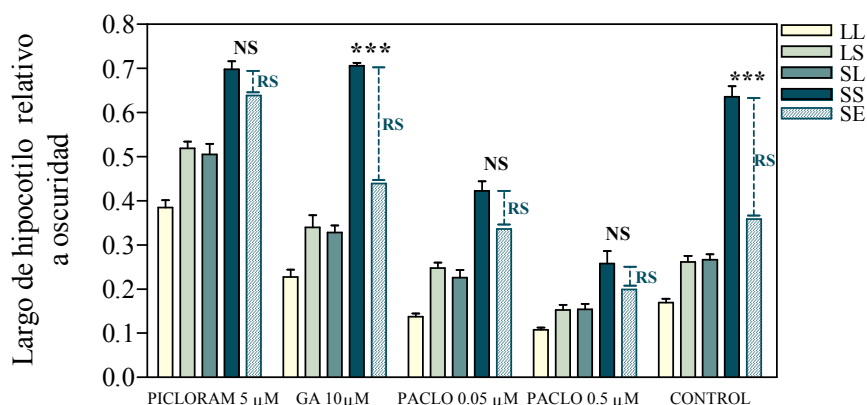
En los últimos años han surgido distintas evidencias que conectan la percepción de plantas vecinas con el crecimiento mediado por vías de señalización de hormonas (Smalle et al., 1997; Sawa et al., 2002; Devlin et al., 2003; Vandenbussche et al., 2003; Roig-Villanova et al., 2007). Por este motivo evaluamos el comportamiento de genes de respuesta a hormonas en nuestras condiciones experimentales. Para ello utilizamos una base de datos con genes que responden positivamente o negativamente a distintas hormonas: auxinas (IAA), giberelinas (GA), etileno (ACC), brasinoesteroides (BL), ácido abscísico (ABA), jasmónico (MJ) y citocininas (Zeatin) (Goda et al., 2008). Así encontramos que los genes que aumentan su expresión en respuesta a la aplicación exógena de IAA, GA, ACC, BL y ABA se encuentran sobre-representados dentro del grupo de genes “con respuesta aditiva” en los *clusters* 2, 5 y 4 (Tabla 3, Anexo). Estos *clusters* (Fig. 1, Anexo), corresponden a genes cuyos niveles de expresión aumentan aditivamente si fueron cosechados en sombra, presentando en el tratamiento de SS el máximo de expresión mientras que el de LL presenta el mínimo. Los genes que aumentan su expresión en respuesta a la aplicación exógena de MJ están sobre-representados en distintos *clusters* sin seguir un patrón claro de expresión y los de respuesta positiva a Zeatin están sobre-representados en el *cluster* 3 (Fig. 1, Anexo).

Por el contrario los genes reprimidos por auxinas, giberelinas, etileno, brasinoesteroides y citocininas no se encuentran sobre-representados en ninguno de los grupos de clasificación (Tabla 4, Anexo). Los genes reprimidos por ácido abscísico y jasmónico están sobreexpresados en distintos grupos sin seguir un patrón claro de expresión (Tabla 4, Anexo).

### ***Regulación de hormonas en la integración de la información recibida en condiciones fluctuantes de sombra y luz solar plena***

Las auxinas y las giberelinas son las fitohormonas que más se han estudiado en respuestas de escape al sombreado, por este motivo decidimos investigar el rol de las mismas en los cuatro tratamientos de luz (LL, LS, SL y SS). Utilizamos una auxina sintética, picloram, que es un herbicida que se utiliza normalmente para analizar respuestas de crecimiento del hipocotilo en plántulas de *Arabidopsis* (Sorin et al., 2005). Los experimentos se realizaron en una solución de picloram 5  $\mu\text{M}$ , que es la concentración en donde se obtiene un largo de hipocotilo máximo (Sorin et al., 2005), en las cuatro condiciones experimentales (SS, SL, LS y LL). De este modo observamos que el largo del hipocotilo aumenta en los cuatro tratamientos cuando lo comparamos con el control sin auxinas, obteniendo un largo de hipocotilo esperado por un modelo aditivo similar al largo del hipocotilo en el tratamiento de SS (Fig. 22).

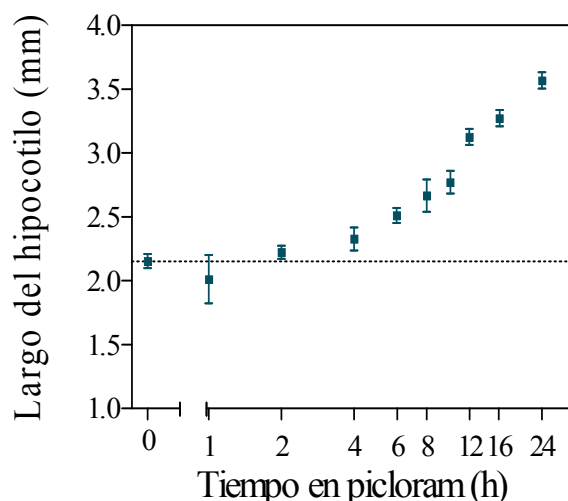
En el tratamiento de giberelinas utilizamos  $\text{GA}_3$  que es una GA activa en *Arabidopsis* y se utiliza comúnmente para evaluar el efecto de dicha hormona sobre el alargamiento del hipocotilo (Feng et al., 2008). En este tratamiento observamos que aunque el largo del hipocotilo aumenta en todos los tratamientos, el genotipo salvaje sigue presentando la respuesta sinérgica en el tratamiento de SS (Fig. 22). Por otro lado, investigamos el rol de las GA utilizando un inhibidor de la síntesis de GA, el paclobutrazol (PACLO). El uso de PACLO permite observar los efectos que producen las giberelinas endógenas en la elongación del hipocotilo (Cowling y Harberd, 1999). Al inhibir las GA endógenas, observamos que el largo del hipocotilo disminuye en todos los tratamientos y en mayor medida en el tratamiento de SS, llegando a eliminar la respuesta sinérgica cuando utilizamos la una concentración de PACLO de 0,5  $\mu\text{M}$  (Fig. 22). Éstos resultados refuerzan la idea que las auxinas y las GA estarían involucradas en la integración de la percepción del tiempo de permanencia en sombra.



**Fig. 22: Largo del hipocotilo relativo al control de oscuridad en los tratamientos LL, LS, SL y SS en plántulas del genotipo salvaje (Col2), en presencia de picloram 5  $\mu$ M, GA3 10  $\mu$ M, PACLO 0,05  $\mu$ M, PACLO 0,5  $\mu$ M.**

.....Respuesta sinérgica

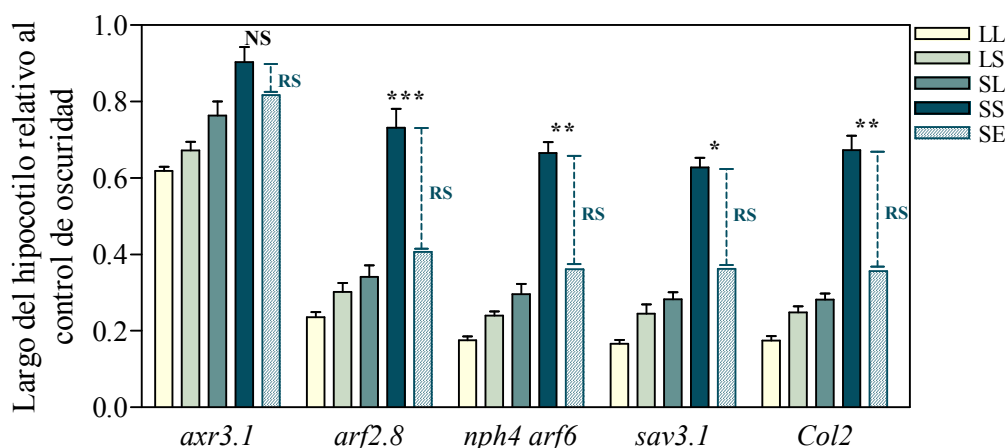
Un modo por el cual las auxinas podrían estar involucradas en esta integración podría ser a través del tiempo de exposición a la sombra, donde aumentan los niveles de genes de respuesta a auxinas. Para corroborar esta hipótesis, investigamos la respuesta del largo del hipocotilo al tiempo de exposición a auxinas. Cultivamos plántulas de *Arabidopsis* por periodos de distinta duración en una solución de picloram 5  $\mu$ M. Así observamos que 4h horas de tratamiento diario con auxinas no genera una respuesta significativa en el largo del hipocotilo, pero que luego esta respuesta aumenta rápidamente sugiriendo que existe un umbral de permanencia de auxinas que debe ser superado para que se genere la promoción del alargamiento del hipocotilo (Fig. 23).



**Fig. 23: Largo del hipocotilo en periodos de distinta duración en una solución de picloram 5  $\mu$ M**

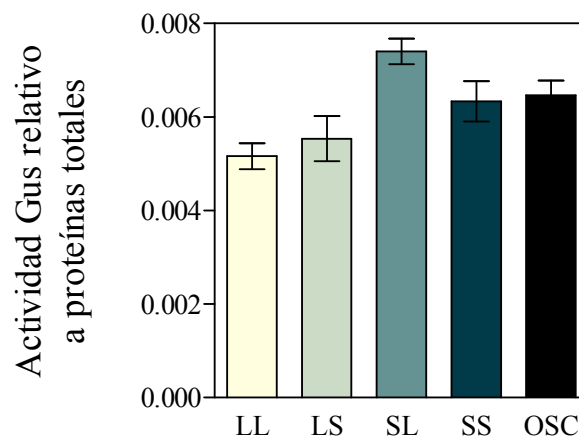
Otro modo de investigar el rol de estas hormonas es mediante la utilización de mutantes de la vía de señalización de las mismas. Si bien sería interesante estudiar en los cuatro tratamientos de sombreado la respuesta de mutantes de la vía de las giberelinas, hasta ahora solo hemos estudiado la respuesta en algunas mutantes de genes involucrados en la señalización de auxinas.

La doble mutante *nph4 arf6* tiene un patrón de respuesta similar al genotipo salvaje. ARF7 (NPH4) y ARF6 son activadores transcripcionales de genes de respuesta a auxinas (Wilmoth et al., 2005). La mutante *arf2.8*, un represor transcripcional de la señalización del crecimiento celular (Okushima et al., 2005) aunque es un poco más alta en todos los tratamientos continua teniendo mayor respuesta en el tratamiento SS que el esperado por un modelo aditivo. *Sav3.1*, que está afectado en la biosíntesis de auxinas (Tao et al., 2008), tiene un largo de hipocotilo a penas menor en el tratamiento de SS obteniendo así menor respuesta sinérgica (RS). En cambio la mutante *axr3.1* que tiene aumentadas las respuestas a auxinas debido a la estabilización de la proteína que codifica (AXR3) (Tanimoto et al., 2007), también es más alta en todos los tratamientos pero presenta un largo de hipocotilo en SS similar al de SE (Fig. 24).



**Fig. 24: Largo del hipocotilo relativo al control de oscuridad en los tratamientos LL, LS, SL y SS en plántulas del genotipo salvaje (*Col2*), mutante *axr3-1*, mutante *arf2-8*, la doble mutante *nph4-1 arf6*. y la mutante *sav3.1*.  
 .....Resposta sinérgica**

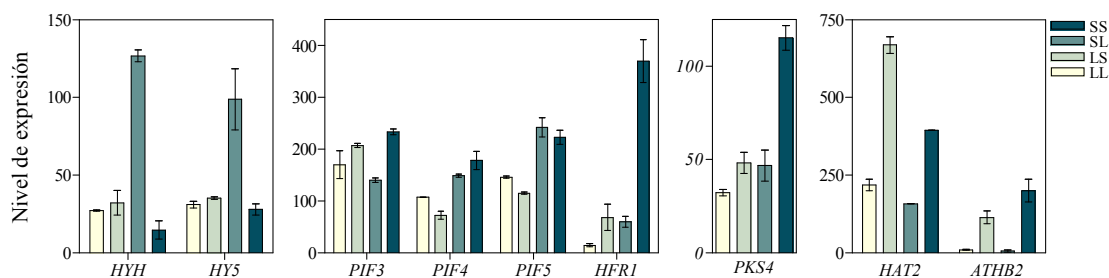
Para estudiar si los niveles de auxina estaban cambiando entre los tratamientos cultivamos plantas transgénicas que expresan DR5::GUS en los cuatro tratamientos y el control de oscuridad. DR5 es un promotor sintético que responde a auxinas y al estar fusionado al gen reportero GUS se utiliza como un estimador de los niveles de auxina activa (Aloni et al., 2003). Al medir la actividad GUS no encontramos diferencias significativas entre los tratamientos lumínicos, sugiriendo que los niveles de auxina no cambian en respuesta a las señales fluctuantes de sombra o luz solar plena (Fig. 25).



**Fig. 25: Medición de la actividad de GUS en plantas transgénicas que expresan DR5::GUS en los cuatro tratamientos lumínicos y el control de oscuridad.**

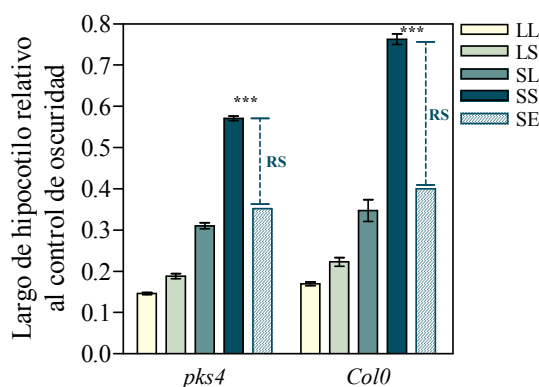
### ***Regulación transcripcional en la integración de la información recibida en condiciones fluctuantes de sombra y luz solar plena***

También analizamos los genes con función fotomorfogénica conocida que cambiaban su expresión de un modo significativo en respuesta de los tratamientos de L y S (Tabla 5, Anexo). Entre estos genes se encuentran 4 factores de transcripción bHLH (*PIF3*, *PIF4*, *PIF5* y *HFR*) (Castillon et al., 2007; Fankhauser y Chory 2000), 2 factores de transcripción bZIP (*HY5* y *HYH*) (Koorneef et al., 1980; Holm et al., 2002), *PKS4* (Schepens, et al., 2008) y *HAT2* y *ATHB2* que son miembros de la familia de genes HD-Zip II que son conocidos por su rápida inducción en respuesta a bajas relaciones de luz R/RL (Roig-Villanova et al., 2006) (Fig. 26).



**Fig. 26:** Nivel de expresión de los genes *HY5*, *HYH*, *PIF3*, *PIF4*, *PIF5*, *HFR1*, *PKS4*, *HAT2* y *ATHB2* provenientes del análisis global de expresión.

*PKS4* es un regulador positivo del crecimiento del hipocotilo en luz R o RL (Schepens, et al., 2008). Este gen presenta un patrón de respuesta similar al patrón de respuesta de crecimiento, ya que en el tratamiento de SS se observa un nivel de expresión bastante mayor al resto de los tratamientos. Cuando estudiamos la respuesta fisiológica del mutante *pks4*, vemos que presenta una inhibición del crecimiento mayor en el tratamiento de SS comparado con el genotipo salvaje. De este modo la respuesta sinérgica que se observa es menor (Fig. 27).

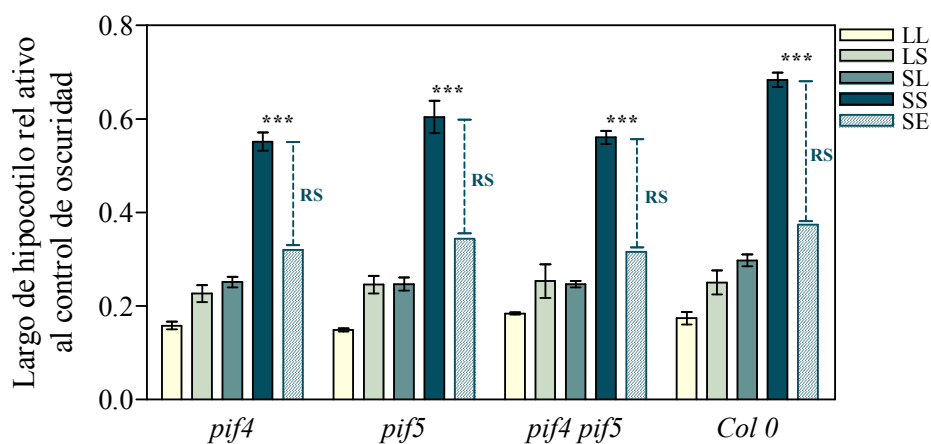


**Fig. 27:** Largo de hipocotilo relativo al control de oscuridad en los tratamientos LL, LS, SL y SS en plántulas del genotipo salvaje (*Col0*) y la mutante *pks4*. ..... Respuesta sinérgica.

Los factores de transcripción *PIF4* y *PIF5* son reguladores negativos en la vía de señalización de los fitocromos y regulan positivamente el escape al sombreado mediado por la baja relación R/RL (Lorrain et al., 2008). En los datos de los microarreglos encontramos

que ambos genes tienen altos niveles de expresión tanto en el tratamiento de SS como de SL. Esto indicaría que estos niveles aumentan en sombra y que el cambio es paulatino ya que en el tratamiento que fue cosechado en luz solar plena (SL) también presenta altos niveles de PIF4 y PIF5 indicando que 1 h de luz no fue suficiente para bajar los niveles de expresión. Por otro lado, el tratamiento de LS tiene bajos niveles de expresión, la permanencia de 1 h en sombra no fue suficiente para aumentar la expresión de este gen. (Fig. 26). *PIF3* no tiene un patrón de expresión tan claro, en el tratamiento de SS se observa el mayor nivel de expresión (Fig. 26).

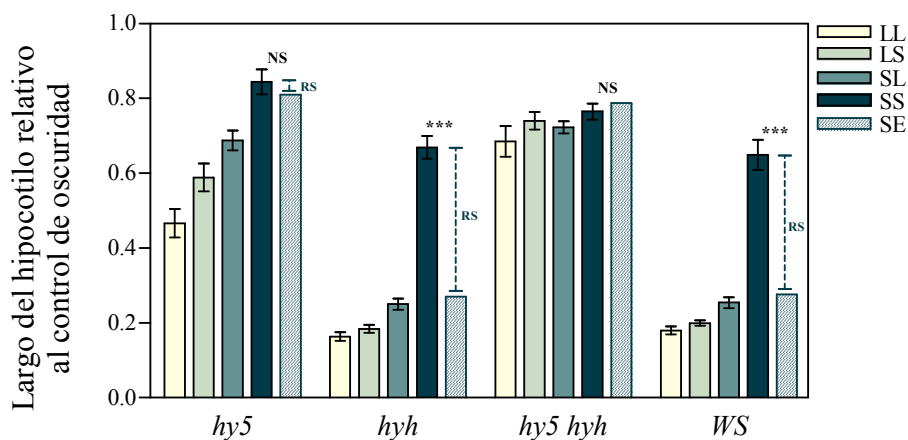
Al realizar la caracterización fisiológica en los cuatro tratamientos, vemos que el mutante de *pif4* y la doble mutante *pif4 pif5* presentan menor elongación del hipocotilo en todas las condiciones lumínicas y principalmente en el tratamiento de SS, resultando así una respuesta sinérgica menor que el genotipo salvaje (Fig. 28). Aunque en menor medida, este patrón también se observa en el mutante *pif5* (Fig. 28).



**Fig. 28:** Largo del hipocotilo relativo al control de oscuridad en los tratamientos LL, LS, SL y SS en plántulas del genotipo salvaje (*Col0*), la mutante *pif4*, la mutante *pif5* y la doble mutante *pif4 pif5*. ..... Respuesta sinérgica.

Los genes *HY5* y *HYH* presentaron niveles de expresión aumentados en el tratamiento de SL con respecto al resto de los tratamientos. Como en el tratamiento de SS los niveles de expresión son bajos, que en SL sean altos indica que la transición entre sombra y luz solar, es lo que provoca el aumento en los niveles de expresión (Fig. 26). Al realizar el análisis

con los mutantes, encontramos que el mutante de *hyh* presenta una respuesta similar al genotipo salvaje en todos los tratamientos, en cambio el mutante *hy5* tiene un largo de hipocotilo mayor en todos los tratamientos y pierde la respuesta sinérgica (Fig. 29). El doble mutante *hy5 hyh* tiene un alargamiento mayor que el simple mutante *hy5* en los tratamientos de LL, LS y SL sugiriendo que *HYH* tiene cierta implicancia en la respuesta a estos ambientes pero que al ser redundante con *HY5* y tener un fenotipo más débil, solo se puede observar la incidencia de la mutación *hyh* en el fondo genético de la mutante *hy5* (Fig. 29).



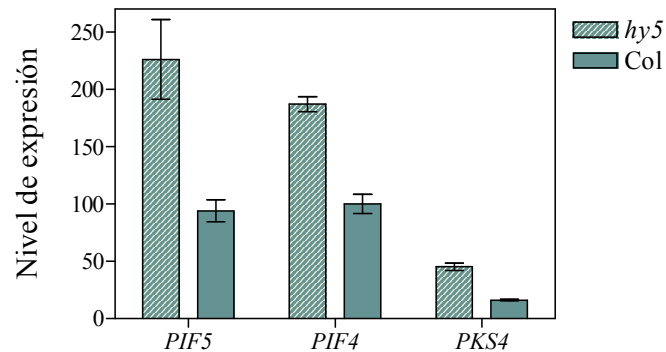
**Fig. 29: Largo del hipocotilo relativo al control de oscuridad en los tratamientos LL, LS, SL y SS en plántulas del genotipo salvaje (WS), mutante *hy5*, mutante *hyh* y la doble mutante *hy5 hyh*. Respuesta sinérgica**

*HY5* es un regulador transcripcional que controla la expresión masiva de múltiples genes durante el desarrollo fotomorfológico (Lee et al., 2007). Por este motivo nos pareció interesante analizar los perfiles globales de expresión en el tratamiento de SL, (en donde habíamos observado que los niveles de expresión de *HY5* aumentaban con respecto al resto de los tratamientos) en la mutante *hy5*. Mediante la técnica de microarreglos realizamos un análisis comparativo de los cambios de expresión globales que ocurren entre la mutante *hy5* y el genotipo salvaje Col, en el tratamiento de SL.

Los niveles de expresión de los genes *PIF4*, *PIF5* y *PKS4* están aumentados en el mutante de *hy5* indicando que en el genotipo salvaje estos genes estarían reprimidos por *HY5* (Fig. 30). Este resultado sugiere que uno de los modos por el cual ocurriría la inhibición del crecimiento del hipocotilo en el tratamiento de LS es a través de *HY5* que al



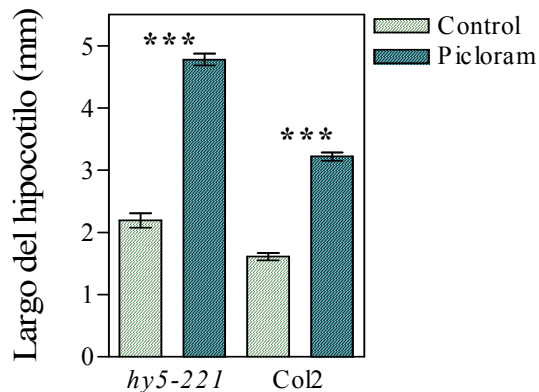
pasar a luz solar plena luego de estar en sombra aumenta sus niveles de expresión reprimiendo entre otros genes a *PIF4*, *PIF5*, *PKS4* que son reguladores negativos de la fotomorfogénesis.



**Fig. 30:** Nivel de expresión de los genes *PIF4*, *PIF5* y *PKS4* en el genotipo salvaje (Col) y la mutante *hy5* en el tratamiento de SL.

En nuestros datos de microarreglos habíamos observado que varios genes de respuesta a auxinas están implicadas en la respuesta a estos ambientes lumínicos y como HY5 tiene un rol importante en la promoción de la transcripción de genes de señalización de auxinas (Cluis et al., 2004) analizamos si había cambios en la expresión de estos genes en la mutante de *hy5*. Al comparar los niveles de expresión de genes relacionados a auxinas entre el genotipo salvaje y *hy5* encontramos que aproximadamente el 20% de ellos está regulado por HY5 (Tabla 6, Anexo).

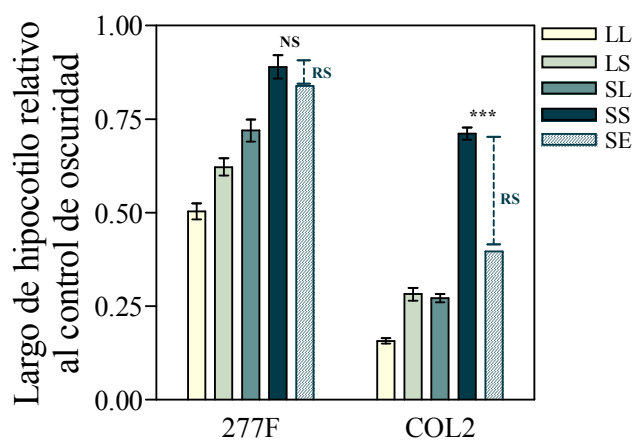
Para explorar la conexión entre HY5 y las auxinas, cultivamos a la mutante *hy5* y al genotipo salvaje en picloram 5  $\mu$ M con un control sin auxina. La mutante de *hy5* tiene una elongación del hipocotilo mayor que el genotipo salvaje en ambos tratamientos, presentando una diferencia considerablemente mayor en presencia de picloram (Fig. 31). En conjunto, estos datos sugieren que el efecto positivo de HY5 en la fotomorfogénesis antagoniza con el efecto de las auxinas. HY5 podría estar regulando negativamente la sensibilidad a las auxinas.



**Fig. 31: Largo del hipocotilo en plántulas del genotipo salvaje (Col2) y en la mutante de *hy5*, con o sin la presencia de picloram 5  $\mu$ M.**

### ***Búsqueda de mutantes que afectan en la integración temporal***

Otro modo por el cual abordamos la búsqueda de genes que participen en la integración temporal de señales del ambiente lumínico fue mediante la búsqueda de mutantes. Para ello utilizamos semillas de líneas transgénicas que llevan una inserción al azar de T-DNA que contiene 3 copias de la secuencia promotora de la transcripción del 35 S del virus del mosaico obtenidas del Arabidopsis Resource Centre en Ohio State University. Las semillas transgénicas se cultivaron durante 3 días en el tratamiento LS (las primeras 8 h bajo luz natural y las últimas 2 h bajo sombra de un canopeo). De aproximadamente 15.000 líneas de mutantes seleccioné 156 plántulas que tenían una respuesta del hipocotilo reducida o exagerada en el tratamiento aplicado. Las mismas se transplantaron y se cultivaron en una cámara de luz continua hasta obtener semillas. Se probaron las semillas de cada línea con el mismo protocolo en el que fueron seleccionadas con un control de oscuridad. De esta segunda selección quedaron 21 mutantes que fueron probadas en los cuatro tratamientos de luz descritos previamente (LL, LS, SL y SS) además del control en oscuridad. De estos tratamientos se seleccionó una mutante que denominé 277F que no muestra el sinergismo observado en el genotipo salvaje (Fig 32).

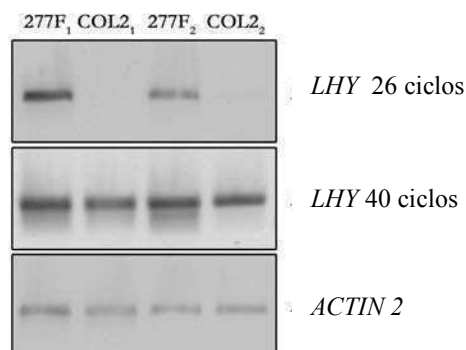


**Fig. 32: Largo del hipocotilo relativo al control de oscuridad en los tratamientos LL, LS, SL y SS en plántulas del genotipo salvaje (Col2) y la mutante 277F.**  
 ..... **Respuesta sinérgica**

La inserción de T-DNA al ser incorporado al genoma de la planta puede interrumpir una secuencia de ADN codificante o provocar la sobreexpresión de genes que se encuentren en la región flanqueante a la inserción debido a la presencia de la secuencia promotora de la transcripción. Se identificó la secuencia de DNA flanqueante al fragmento de T-DNA que podría estar causando el fenotipo observado mediante la técnica de Tail-PCR (Liu et al., 1995). La misma corresponde a una región intergénica que se encuentra entre los genes *at1g01060* y *at1g01070* del cromosoma 1. Como en la transformación de las plantas con el inserto de T-DNA puede ocurrir mas de un evento de inserción, se corroboró que la inserción encontrada en el mutante 277F co-segregaba con el fenotipo mutante. Para ello se realizó una cruce entre el genotipo salvaje (Col2) y el mutante 277F. Mediante reacciones de PCR se observó la perfecta co-segregación entre el fenotipo mutante y la inserción del transgen en 50 plantas analizadas de la población F2.

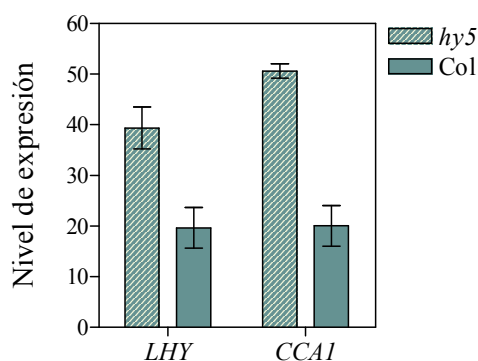
Dado que la inserción se encuentra en una región intergénica y que el T-DNA inserto posee un fuerte promotor de la transcripción el fenotipo mutante podría ser el resultado de la sobreexpresión de alguno de los genes flanqueantes. El gen *At1g01060* codifica para el *LHY*, que participa del reloj circadiano y por ello era un fuerte candidato para ser el causante del fenotipo. Mediante RT-PCR cuantificamos la expresión del gen *At1g01060*

en plántulas del genotipo salvaje y del genotipo mutante y encontramos que en la mutante 277F el mismo está sobre-expresado (Fig. 33).



**Figura 33: Análisis de la expresión por RT-PCR del gen At1g01060 en plántulas de genotipo salvaje (COL2) y la mutante 277F.**

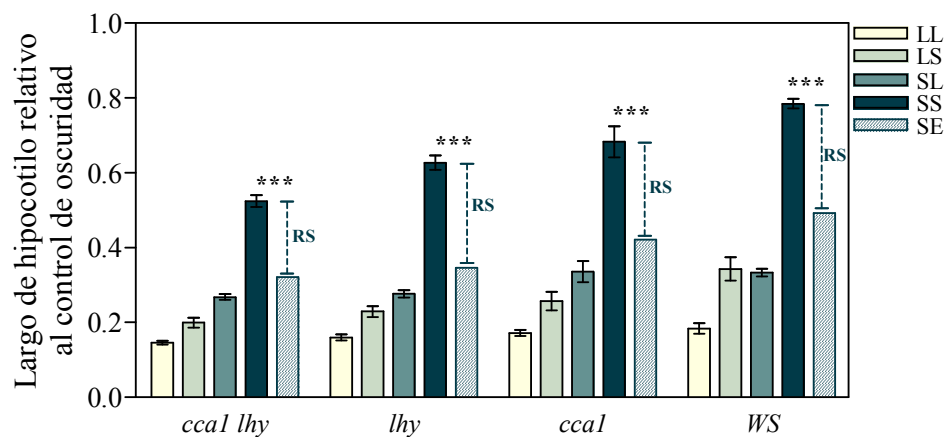
*HY5* es un factor de transcripción que se pega a promotores de osciladores circadianos, entre ellos *LHY* y *CCA1* (Lee et al., 2007), cuando observamos qué ocurre con la expresión de estos genes en la mutante *hy5*, encontramos que ambos genes tienen un nivel de expresión mayor en el mutante *hy5*. Esto sugiere que *HY5* estaría inhibiendo la expresión de *LHY* y *CCA1* en el tratamiento de SL en el genotipo salvaje (Fig. 34).



**Fig. 34: Nivel de expresión de los genes *LHY* y *CCA1* en el genotipo salvaje (Col) y la mutante *hy5* en el tratamiento de SL.**

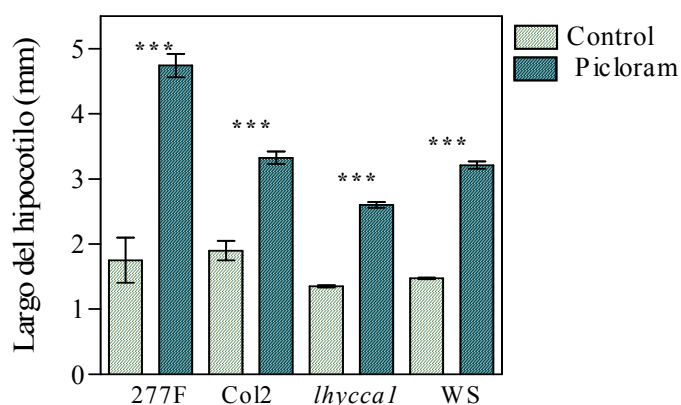
Analizamos la respuesta de las mutantes *lhy* y *cca1* (*CCA1* es un factor de transcripción con alta homología a *LHY*) y la doble mutante *lhy cca1* en los cuatro tratamientos de luz y sombra, obteniendo que las mutantes presentan una inhibición del

hipocotilo mayor en todos los tratamientos, particularmente SS, disminuyendo así la respuesta sinérgica en SS (Fig. 35).



**Fig. 35:** Largo del hipocotilo relativo al control de oscuridad en los tratamientos LL, LS, SL y SS en plántulas del genotipo salvaje (WS), mutante *lhy*, mutante *cca1* y la doble mutante *lhy cca1*. Respuesta sinérgica

Medimos el efecto de la aplicación exógena de auxinas en el doble mutante *lhy cca1*, en nuestra mutante 277F que es un sobre-expresante de *LHY* y en cada genotipo salvaje correspondiente como control. La mutante 277F tiene una elongación del hipocotilo mayor en picloram, mientras que en la doble mutante *lhy cca1* la elongación es menor (Fig. 36). Estos datos sugieren que la interacción entre las auxinas y *LHY* es positiva.



**Fig. 36:** Largo del hipocotilo en plántulas de los genotipos salvajes (Col2 y WS), la mutante de 277F y la doble mutante *lhy cca1* con o sin la presencia de picloram 5 $\mu$ M.

## DISCUSIÓN

---

### *Interacción sinérgica entre phyB y cry1*

#### *El sinergismo entre phyB y cry1 genera histéresis en la expresión de genes y los procesos fisiológicos*

El crecimiento y desarrollo de las plantas está controlado por las interacciones entre fitocromos y criptocromos y bajo condiciones sub-óptimas de luz, phyB y cry1 operan de modo sinérgico (Casal y Boccalandro 1995, Casal y Mazzella, 1998). Algunas de las respuestas fisiológicas de este sinergismo se conocen hace varios años, en esta tesis indagamos sobre los procesos moleculares que están involucrados en esta interacción. Como primera aproximación a los mecanismos moleculares, investigamos la expresión global de genes al aplicarle luz azul a plántulas que tenían a phyB activo y en estado estacionario (cultivadas en luz roja continua). Los genes cuya expresión es sinérgica, son aquellos que responden al tratamiento de luz azul en el genotipo salvaje pero que no lo hacen ni en el mutante *phyB* ni en el mutante *cry1*, o sea, los genes que dependen de ambos fotorreceptores. Así encontramos que la mayor parte (el 90,2%) de los genes que responden al tratamiento de azul y dependen de cry1 son de respuesta sinérgica porque también dependen de la presencia de phyB, mostrando la importancia de la interacción entre ambos fotorreceptores.

También observamos que más del 80% de los genes que responden al suplemento de luz azul mantienen esa respuesta incluso cuando esta señal desaparece (Fig 4). Cuando una respuesta persiste mas allá de la duración de una señal transitoria, ocurre el fenómeno llamado histéresis. Si bien el mecanismo de histéresis en la expresión de genes no se conoce bien, la misma podría tener una particular importancia en la transformación de señales cortas en decisiones de desarrollo (Kramer y Fussenegger 2005). Teniendo en cuenta este concepto, podemos decir que el sinergismo entre phyB y cry1 genera histéresis

en la expresión de genes ya que 6 h después de la finalización de la luz azul los genes que dependen tanto de cry1 como de phyB mantienen la respuesta de expresión (Fig. 4).

El fenómeno de histéresis no sólo lo observamos en la expresión de genes, también lo vemos en la respuesta de crecimiento del hipocotilo, ya que la tasa de crecimiento del hipocotilo se reduce al suplementar luz azul y esta reducción se mantiene aún 6 h después de finalizada la señal (Fig. 5). Esta respuesta a la luz azul es dependiente no solo de cry que es el receptor de luz azul, sino también de phyB ya que los mutantes de ambos fotorreceptores fallan en la inhibición del hipocotilo manteniendo la tasa de crecimiento constante (Fig. 5).

### ***cry refuerza la señalización mediada por phyB***

Sabemos que phyB y cry tienen que estar activos para que se produzca la respuesta sinérgica pero esto no es suficiente. phyB tiene que permanecer activo luego de la activación de cry ya que al terminar el tratamiento de luz azul con un pulso de RL (que inactiva al phyB) seguido de oscuridad, la tasa de crecimiento del hipocotilo es afectada por la exposición previa a la luz azul, es decir, se interrumpe la respuesta sinérgica. Al activarse cry la señal química perdura incluso cuando se finaliza la señalización de la luz azul si el phyB permanece activo. Si bien es necesario que phyB permanezca activo, no pareciera ser necesario que cry se mantenga activo luego de la finalización del tratamiento, ya que al terminarlo con un pulso de luz verde que podría retornarlo a su estado inactivo (Bouly et al., 2007) el sinergismo se mantiene.

Sólo un bajo porcentaje de los genes que son afectados por phyB en rojo (sin azul) muestran sinergismo entre phyB y cry1 cuando se agrega luz azul, sugiriendo que al activarse cry1, este recluta nuevos genes para el control por phyB. Estos resultados en conjunto indican que cry estaría aumentando la señalización mediada por phyB y no viceversa.

Las plantas no sólo sienten las distintas longitudes de onda, también pueden distinguir las diferencias en los cambios de irradiancia total (Chen et al., 2004). Cuando suplementamos con luz azul manteniendo el fondo de luz roja estamos aumentando la irradiancia total pues pasamos de  $11 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  en R a  $16 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  en R+A. Este aumento de irradiancia no es el causante de la respuesta sinérgica ya que al aumentar la irradiancia en la misma magnitud pero sin cambiar la calidad de luz (comparando plántulas en R con las de R+R) no se produce una inhibición adicional en el crecimiento del

hipocotilo. El sinergismo se produce específicamente por la combinación de luz azul y luz roja.

### ***HY5 y HYH actúan en conjunto para mediar la respuesta sinérgica entre phyB y cry1***

El factor de transcripción HY5 controla la expresión de múltiples genes inducidos por luz roja abajo de los fotorreceptores y juega un papel importante en la transición a la fotomorfogénesis (Koorneef et al., 1980). Mientras que HY5 actúa bajo distintas longitudes de onda, su homólogo HYH es específicamente afectado por la luz azul. La pérdida simultánea de HYH y HY5 en plántulas que crecen en luz azul tiene un efecto aditivo y no redundante en el largo del hipocotilo (Holm et al., 2002). En nuestros experimentos la luz azul promovió la expresión de *HY5* y *HYH* (Fig. 9). Si bien la expresión de estos genes no es sinérgica, estos factores de transcripción son necesarios para la respuesta sinérgica ya que el doble mutante *hy5 hyh* falla en todas las respuestas fisiológicas analizadas. *HY5* y *HYH* no siempre actúan en forma redundante, por ejemplo en el crecimiento del sistema radicular la mutante *hy5* aumenta el crecimiento de las raíces mientras que la doble mutante *hy5 hyh* presenta una disminución (Sibout et al., 2006). Además, Alabadi y colaboradores (2008) observaron que en contraste con la mutante *hy5*, la pérdida de la función de *HYH* causa una respuesta hipersensible al tratamiento con altos niveles de giberelinas en la apertura de los cotiledones. Este efecto requiere de *HY5*, mostrando un efecto epistático con la doble mutante *hy5 hyh*. Esto sugiere que *HYH* regula negativamente la actividad de *HY5* en la apertura de los cotiledones al menos en esta respuesta a giberelinas. Nosotros observamos que el mutante de *hyh* aparentemente muestra mayor sinergismo en luz R con luz azul, mientras que la doble mutante *hy5 hyh* no muestra sinergismo en este tratamiento (Fig. 15). Este aumento en el sinergismo en la mutante *hyh* podría deberse a un efecto negativo de *HYH* sobre *HY5*. Nuestros datos indican entonces, que en la respuesta de co-acción entre el *phyB* y *cry1* son necesarios tanto *HY5* como *HYH* y que ambos actúan en forma redundante.

### ***Nueva función para los genes SPA durante el sinergismo entre phyB y cry1***

Las proteínas SPA se conocieron por su función de regulación negativa en la vía de señalización de *phyA* (Hoecker et al. 1999). Hasta el momento las distintas implicancias de



SPA en las respuestas de phyB han sido observadas por la vía indirecta de interacción antagónica entre phyB y phyA, es decir de un modo dependiente de phyA. En la interacción sinérgica entre la luz roja y la luz azul las mutantes de *spa1* y *spa4* fallan en responder al suplemento de luz azul incluso en el fondo genético de la mutante *phyA*. Podemos concluir que el rol de SPA en el aumento de la intensidad de la vía de señalización de phyB es independiente de phyA. Esta es una nueva función para los genes SPA que (teniendo en cuenta que las proteínas SPA interactúan con COP1) podrían incluir la degradación de reguladores negativos de la señalización de phyB.

***Ausencia de histéresis en la expresión de HY5, HYH, SPA1 y SPA4 durante el sineergismo entre phyB y cry1***

La luz azul promovió la expresión de *HY5*, *HYH*, *SPA1* y *SPA4*. Si bien este efecto sobre la expresión no se observa en el mutante *cry1*, si ocurrió en el mutante de *phyB*, indicando que este fotorreceptor no estaría involucrado en la regulación de la expresión de estos genes. La expresión de estos genes no es sinérgica y tampoco presenta histéresis ya que al terminar la señal de luz azul, los niveles de expresión vuelven a ser los mismos que en la condición inicial (control de R) (Fig. 9).

Una importante proporción de los genes de respuesta persistente a la activación de *cry* son blancos directos de HY5 (Lee et al., 2007). El 27 % de los genes promovidos (cluster 2, Fig. 5) y el 11 % de los genes inhibidos (cluster 1) por luz azul en un modo dependiente de phyB son blancos directos de HY5. Estos porcentajes coinciden con los obtenidos en datos de microarreglos comparando al genotipo salvaje con la mutantes de *hy5* donde el 26 % de los genes que son promovidos y el 12 % que son inhibidos por HY5 son blancos directos de HY5 (Lee et al., 2007). Mientras que una proporción significativa de los genes que muestran histéresis en su expresión son blancos directos de HY5, los promotores de *HY5* y *SPA1* no son blancos directos de HY5. *HYH* y *SPA4* son blancos directos pero su expresión no es afectada por la mutación de *hy5* (Holm et al., 2002, Lee et al., 2007). En principio, esta podría ser una de las causas de la falta de histéresis en la expresión de *HY5*, *HYH*, *SPA1* y *SPA4*. Estos genes no muestran histéresis, pero si la generan. En particular HY5 mediante la activación de genes que sí muestran histéresis en su respuesta.

### ***La respuesta sinérgica entre phyB y cry1 no se debe a un aumento en la estabilidad de la proteína HY5***

La floración se induce cuando la expresión de *CONSTANS* que es regulada por el reloj circadiano coincide con la exposición de las plantas a la luz, que estabiliza a la proteína nuclear *CONSTANS* (Valverde et al., 2004). Por otro lado el reloj circadiano regula los niveles de los transcritos *PIF4* y *PIF5*, mientras que la luz regula la abundancia de sus proteínas. La coincidencia de altos niveles de transcritos con la acumulación de su proteína permite la promoción del crecimiento de la plántula al final de la noche (Nozue et al., 2007). Estas señales lumínicas y del reloj circadiano que controlan la floración y el crecimiento del hipocotilo tienen un modelo común de convergencia porque en ambos casos una señal (el reloj) controla los niveles de ARN mensajero y la otra señal (la luz) la estabilidad de proteínas derivadas de esos ARN mensajeros. Como se sabe que *cry* controla la expresión de *HY5* y la luz regula la degradación mediada por *COP1* de la proteína *HY5* en el proteosoma (Holm et al., 2002) nos preguntamos si este también podría ser un modelo de convergencia y que parte de la respuesta sinérgica se deba a que es necesario que *phyB* se mantenga activo luego de la señal de la luz azul para mantener a la proteína *HY5* estable. Sin embargo esto no ocurre, ya que *HY5* se mantiene estable incluso cuando luego de la señal de luz azul aplicamos un pulso de RL seguido de oscuridad (condición que inactiva a *phyB*) (Fig. 16). *Cry* podría aumentar la expresión de *HY5*, *HYH*, *SPA1* y *SPA4* mediante la inactivación de *COP1* y consecuentemente estabilizando factores de transcripción (Osterlund et al., 2000) que actúan río arriba de estos genes. Sin embargo, la luz azul tampoco aumenta la estabilidad de *HY5* durante el tiempo donde el sinergismo es observado, probablemente porque la luz roja es capaz de estabilizar a *HY5* per se (Osterlund et al., 2000).

### ***El sinergismo entre phyB y cry1 induce la transición y permanencia a la autotrofia***

Dentro de los genes que presentan histéresis en su respuesta se encuentran distintos genes involucrados en la regulación del desarrollo como son *AINTEGUMENTA*, *ARGONAUTA1*, *CYCLIN-DEPENDENT KINASE C2*, *CULLIN4* y *SYNTAXIN 2311* (Nole-Wilson et al., 2006, Sorin et al., 2005, Cui et al., 2007, Chen et al., 2006, Ohtomo et al., 2005) que reprimen su expresión con la luz azul. Por otro lado, entre los genes

promovidos por la luz azul, encontramos distintos genes relacionados a los cloroplastos como son dos proteasas FtsH (Zaltsman et al., 2005). La regulación de la expresión de estos genes que se mantiene aún después de terminada la señal, sugiere que la luz azul transitoria sobre un fondo de luz roja genera cambios importantes para el desarrollo de la planta. De este modo la co-acción esta regulando genes involucrados en respuestas que podrían ser necesarias a largo plazo como son la modelación de la planta y la aclimatación del aparato fotosintético preparándola para la transición a la fotoautotrofia.

La co-acción entre phyB y cry1 genera una respuesta que persiste más allá de la señal. En plántulas cultivadas en oscuridad, la exposición a la luz no genera una respuesta rápida en la inhibición del crecimiento durante la primera exposición a la luz pero si una interrupción del crecimiento cuando vuelven a oscuridad en lo que sería la primera noche. Éste efecto no se observa si alguno de los fotorreceptores del sinergismo (phyB o cry) falta (Fig. 17). PhyB se mantiene activo durante la primer parte de la noche (Downs et al., 1957, Casal, 1996) y como es necesario que phyB permanezca activo luego de la activación de cry1 para que se produzca la respuesta sinérgica podemos pensar que en condiciones naturales el sinergismo ayuda a la planta a mantener la inhibición del crecimiento del hipocotilo durante la noche. En base a esto y teniendo en cuenta que distintos genes involucrados en la fotosíntesis y el desarrollo de la planta se inducen y se mantienen activos luego de la co-acción de los fotorreceptores podemos especular que el sinergismo entre phyB y cry1 induce la transición a la autotrofia y la persistencia de este patrón de desarrollo aún cuando ya han desaparecido las señales.

### ***Integración de la información provista por períodos alternados de luz solar plena o sombra.***

#### ***Señales fluctuantes de sombra y luz plena***

El aumento del número de plantas por unidad de área provoca una disminución en la relación R/RL percibida por las plantas y en consecuencia estas desarrollan el síndrome de escape al sombreado (Ballaré, 1999; Smith, 2000). En las plantas, el sombreado vegetal genera un gasto de energía extra en desarrollar una morfología que aumenta la probabilidad de acceder a la fuente de energía lumínica. Por este motivo se ha prestado especial

importancia a los mecanismos involucrados en el crecimiento de plantas en presencia de plantas vecinas o bajo un denso canopeo. Una planta que crece debajo de un canopeo denso probablemente perciba señales lumínicas de sombra todo el tiempo, pero si la misma crece cerca de plantas vecinas o en un canopeo más abierto es probable que durante el día perciba señales fluctuantes de sombra y luz (Stenberg et al., 2001). En esta tesis observamos que una planta que permanece todo el tiempo debajo de sombra vegetal (SS) tiene una respuesta distinta a la que se esperaría si la percepción del tiempo de exposición a la sombra respondiera a un modelo de integración aditivo (SE). En un modelo de integración aditivo, sería de esperar que el largo del hipocotilo en LL más el aumento del alargamiento obtenido en el tratamiento de LS más el aumento del alargamiento obtenido en SL (SE), fuese igual al largo del hipocotilo en el tratamiento de SS. Esto no ocurre, indicando que en SS existe una respuesta sinérgica en las plántulas que permanecen todo el día sombreadas combinado sombra a la mañana y sombra a la tarde. La implicancia biológica de este sinergismo podría deberse a que una planta que esta todo el tiempo en sombra invierte gran parte de los recursos en crecer y escapar al sombreado. Mientras que una planta que percibe en algún momento del día luz solar plena induce las respuestas fotomorfogénicas que le permiten maximizar la utilización de la luz solar que recibe.

### ***El papel de las hormonas***

Entre los genes de respuesta temprana a bajas relaciones R/RL, se encuentran diversos genes que codifican para enzimas metabólicas o componentes de la señalización de distintas fitohormonas, implicando un rol de las hormonas en la respuesta de escape al sombreado (Devlin et al., 2003). En nuestro análisis global de expresión génica encontramos más de un 50 % de genes de respuesta positiva a la aplicación de auxina, GA o etileno, cuyos niveles de expresión aumentan aditivamente si fueron cosechados en sombra (el tratamiento de SS presenta el máximo de expresión mientras que el de LL presenta el mínimo) (Tabla 3, Anexo). Este resultado sugiere que las hormonas estarían jugando un importante rol en las plántulas que permanece sombreadas todo el día.

Las giberelinas han sido vinculadas a respuestas de escape al sombreado en diversos trabajos, por ejemplo, la exposición a bajas relaciones de R/RL regulan positivamente la expresión de genes de biosíntesis de GA (Hisamatsu et al. 2005) y las respuestas mediadas

por GA (Reed et al. 1996). Al aplicar una solución de GA en los tratamientos de LL, LS, SL y SS, no vemos una clara falla en la respuesta sinérgica entre la combinación de sombra temprana y sombra tardía (Fig. 22). Sin embargo, cuando aplicamos un inhibidor de la síntesis de GA, paclobutrazol, se observa una evidente disminución en la respuesta sinérgica a la permanencia en sombra (SS) (Fig. 22). El inhibidor tiene un efecto mucho mayor en las plántulas que se encuentran todo el tiempo en sombra (SS), evidenciando que las GA son necesarias para promover la integración temporal de las señales de sombra.

Las auxinas están involucradas en distintos procesos de desarrollo, en los últimos años han surgido distintas evidencias que las relacionan con la percepción de plantas vecinas (Smalle *et al.*, 1997; Sawa *et al.*, 2002; Devlin *et al.*, 2003; Vandenbussche *et al.*, 2003; Roig-Villanova *et al.*, 2007). La aplicación exógena de Picloram (auxina sintética) en los tratamientos de LL, LS, SL y SS a provoca el alargamiento del hipocotilo en todos los tratamientos, con un impacto mayor en los tratamientos de LL, LS y SL. De este modo prácticamente se pierde toda la respuesta sinérgica a la permanencia en sombra (Fig. 22).

Al medir la actividad GUS en plantas transgénica que expresan DR5::GUS, un promotor sintético que responde a auxinas fusionado al gen reportero GUS que se utiliza como un estimador de los niveles de auxina activa (Aloni et al., 2003), en los cuatro tratamientos lumínicos no encontramos diferencias significativas (Fig. 25). Los cambios en expresión de genes de señalización de auxinas podrían deberse a cambios en la localización, más que cambios en los niveles de esta hormona. La regulación por los fitocromos del transporte de auxinas es un componente crucial en el control del crecimiento del hipocotilo en respuesta a la luz. Los fitocromos inhiben el transporte de auxinas e inducen una distribución asimétrica de las auxinas en el hipocotilo (Nagashima et al., 2008). Para evaluar esta idea, en el futuro sería interesante estudiar la expresión de GUS en distintos órganos de la plántula.

La mutante *sav3.1*, que esta afectada en la biosíntesis de auxinas (Tao et al., 2008), tampoco mostró diferencias importantes con el genotipo salvaje en las cuatro condiciones de luz y sombra (Fig. 24). Este resultado también apoya la idea que la regulación del escape al sombreado mediado por auxinas podría deberse principalmente a un cambio en el transporte de esta hormona y no en los niveles de la misma.

Al analizar las respuestas fisiológicas a señales fluctuantes de sombreado observamos que el patrón de crecimiento no sigue un modelo de integración aditiva, la respuesta del crecimiento del hipocotilo depende de la condición actual y de la condición previa de luz o sombra. Al analizar la expresión global de genes encontramos que muchos de ellos siguen un patrón similar al de crecimiento (“genes con interacción”). En cambio, los genes de respuesta a auxinas tienen niveles de expresión que dependen de la condición actual (L o S) y de la previa (L o S) de manera aditiva, con un máximo de expresión en SS. Este resultado sugiere que las auxinas podrían estar contabilizando el tiempo de permanencia en sombra logrando una respuesta máxima del alargamiento en una plántula que permanece todo el día en sombra.

Muchas respuestas en fisiología vegetal muestran umbrales. En un caso extremo, si un estímulo alcanza un cierto umbral se producirá un cambio hacia un estado alternativo, que luego se mantiene estable incluso si el estímulo cae por debajo del umbral crítico (Ninfa y Mayo, 2004). Al observar la sensibilidad de las plántulas de *Arabidopsis* a distintos tiempos de permanencia en una solución con auxinas, comprobamos que éstas tienen que superar un umbral de permanencia para que se genere la promoción del hipocotilo. La permanencia de la señalización por auxinas en SS parece ser una de las señales claves para la respuesta sinérgica del alargamiento del hipocotilo en el tratamiento de sombra (SS).

### ***El papel de las proteínas PIF***

Los niveles de expresión de *PIF4* y *PIF5* son altos en el tratamiento de SS y de SL. Esto indicaría que la expresión de estos genes aumentan en sombra y que el cambio es paulatino ya que en el tratamiento SL, luego de 1 h de luz solar plena sigue teniendo altos niveles de *PIF4* y *PIF5* (Fig. 26). *PIF4* y *PIF5* son reguladores positivos del alargamiento y su mayor abundancia a bajas relaciones R/RL regulan las respuestas de escape al sombreado (Lorrain et al., 2008). La tasa de crecimiento del hipocotilo en las plántulas que permanecen sombreadas todo el día es alta (Fig. 21), este fenotipo en parte puede atribuirse a los elevados niveles de expresión de *PIF4* y *PIF5* en SS (Fig. 26). Sin embargo, los altos niveles de expresión de *PIF4* y *PIF5* en SL (Fig. 26) no coinciden con la baja tasa de crecimiento en esta condición lumínica (Fig. 21). Esto se podría atribuir a la regulación post-transcripcional de los PIFs. Si bien los niveles de expresión en el tratamiento SL son

altos 1 h después del cambio lumínico (de S a L), la abundancia de las proteínas PIF4 y PIF5 podrían no serlo. En la caracterización fisiológica de los mutantes *pif4*, *pif5* y la doble mutante *pif4 pif5* observamos una respuesta sinérgica a la permanencia en sombra menor que en el genotipo salvaje (Fig. 28). Este resultado sugiere que las proteínas PIF4 y PIF5 son necesarias para este sinergismo de la permanencia en sombra. En el futuro, sería interesante medir la estabilidad de las proteínas PIF4 y PIF5 en distintos momentos del día con el fin de observar si la abundancia de estas proteínas sigue un patrón similar al patrón de crecimiento.

Estudios recientes demostraron que en ausencia de GA, las proteínas DELLA (reguladores negativos de la señalización de las GAs) interactúan con PIF4 y reprimen su habilidad para pegarse al ADN y regular la expresión de genes blanco. En contraste, en la presencia de GA, las proteínas DELLA son degradadas y la elongación mediada por PIF4 puede ocurrir (de Lucas, et al., 2008). Por otro lado, también se encontró que los niveles de DELLA son reducidos en respuestas de escape al sombreado de un modo independiente a las GA (Djakovic-Petrovic et al., 2007). Este podría ser uno de los mecanismos por el cual se integran las vías de señalización de hormonas con la luz en señales fluctuantes de sombreado vegetal.

### ***El papel de HY5***

Los niveles de expresión de *HY5* y *HYH* son altos solo en el tratamiento de SL. En el tratamiento de SS los niveles de expresión son bajos, que en SL sean altos indica que la transición entre sombra y luz solar, es lo que provoca el aumento en los niveles de expresión. Este resultado sugiere que este cambio de expresión al percibir luz solar plena sería una de las señales que indica que la plántula no permanece en sombra. Si bien el factor de transcripción *HY5* ha sido intensamente estudiado el rol que cumple en la percepción de plantas vecinas aún no está claro. Devlin y colaboradores (2003) encontraron que los niveles de expresión de *HY5* disminuyen en respuesta a bajas relaciones de R/RL, principalmente bajo el control de phyB. Por otro lado, Roig-Villanova y colaboradores (2006), sugieren que este factor de transcripción no es necesario para la elongación del hipocotilo en bajas relaciones de R/RL ya que no encontraron que sea necesario para inducir respuestas tempranas de escape al sombreado. Cuando estudiamos la respuesta

fisiológica del mutante *hy5* y el doble mutante *hy5 hyh* vemos estas mutantes tiene un largo de hipocotilo mayor en todos los tratamientos, perdiendo así la respuesta sinérgica a la permanencia en sombra. Esos resultados indican que HY5 es necesario para la correcta integración de las señales fluctuantes de sombreado vegetal. A diferencia del trabajo de Roig-Villanova y col. (2006) en el cual no encontraron una implicancia de HY5 en respuestas de escape al sombreado, nuestros datos sugieren que existe una conexión entre HY5 y las respuestas de sombreado vegetal. Esto podría deberse a que al trabajar en condiciones de sombreado vegetal no solo estamos mirando respuestas a bajas relaciones de R/RL sino también con baja irradiancia total.

HY5 es un regulador central que actúa activando una cascada transcripcional de la fotomorfogénesis, induciendo entre otras cosas factores de transcripción de respuestas tempranas (Lee et al., 2007). Para profundizar sobre el papel que juega HY5 en la integración de la información provista por periodos alternados de luz solar plena y sombra estudiamos los perfiles globales de expresión del mutante *hy5* en el tratamiento de SL

Al comparar la expresión global de genes del mutante *hy5* con el genotipo salvaje, encontramos que *PIF4*, *PIF5*, *HAT2*, *LHY* y *CCAI*, blancos directos de HY5 (lee et al., 2007) y *PKS4* tienen niveles de expresión aumentados en el mutante *hy5* (Fig. 30 y 34), indicando que en el genotipo salvaje estarían regulados negativamente por HY5. Los niveles de expresión de *PIF4*, *PIF5*, *HAT2* y *PKS4* se encuentran aumentados principalmente en plántulas que permanece en sombra y las mutantes *pks4* y las dobles mutantes *pif4 pif5* y *cca1lhy* presentan hipocotilos mas cortos en las cuatro condiciones lumínicas (LL, LS, SL y SS), particularmente en SS. En conjunto estos resultados evidencian la importancia de estos genes en el alargamiento del hipocotilo en las plántulas que permanecen sombreadas todo el día. Al ocurrir la transición hacia la luz solar plena, el aumento de los niveles de HY5 disminuye los niveles *PIF4*, *PIF5*, *HAT2*, *PKS4*, *LHY* y *CCAI*, siendo posiblemente una de las vías de señalización que inhiben el crecimiento del hipocotilo en plántulas que perciben períodos de luz solar plena.

Sibout y col. (2006) han sugerido que HY5 y HYH modulan la expresión de genes relacionados a las vías de señalización de auxinas mediante el control de unos pocos genes centrales de respuesta a auxinas. Al comparar los patrones de expresión de los genes inducidos por auxinas que están sobre-expresados en el tratamiento de SS, entre el genotipo



salvaje y la mutante *hy5*, vemos que solo un 20 % ellos esta regulado por *HY5* (Tabla 6, Anexo). Sin embargo, dentro de estos genes se encuentran distintos reguladores de las vías de señalización de auxinas que tienen una implicancia importante en la fotomorfogénesis, como son *IAA19*, *IAA6* e *IAA7*. Estos resultados apoyan la hipótesis que *HY5* estaría actuando en las vías de señalización de auxinas mediante el control de unos pocos reguladores centrales. Por otra parte, nuestros resultados fisiológicos indican que *HY5* podría estar regulando negativamente la sensibilidad a las auxinas. Al cultivar a la mutante *hy5* en una solución de auxinas ocurre una promoción de la elongación del hipocotilo mucho mayor que el genotipo salvaje, sugiriendo que el efecto positivo de *HY5* en la fotomorfogénesis antagoniza con el efecto de las auxinas (Fig. 34). En conjunto, estos resultados sugieren que la transición a la luz solar plena provoca un aumento en los niveles de expresión de *HY5* generando una disminución en los niveles de auxinas, deteniendo el alargamiento del hipocotilo y evitando la respuesta sinérgica a la permanencia en sombra.

### ***El papel de LHY***

Otro modo por el cual abordamos la búsqueda de genes que participen en la integración temporal de señales fluctuantes de sombreado fue mediante la búsqueda de mutantes. Así encontramos una mutante, *277F*, que sobre-expresa al gen *LHY*. Esta mutante es más alta en todos los tratamientos, principalmente en el de SL, eliminando casi toda la respuesta sinérgica a la permanencia en sombra (Fig. 32). Por otra parte, la doble mutante *lhy cca1* presentan una inhibición del hipocotilo mayor en todos los tratamientos, particularmente en LS y SS, disminuyendo así la respuesta sinérgica en SS (Fig. 35).

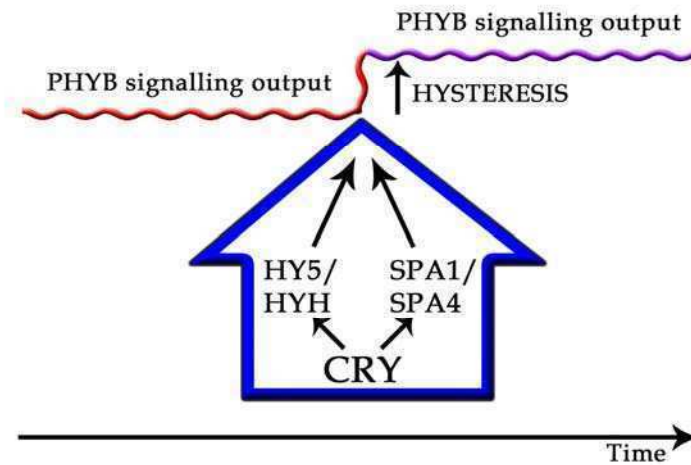
*LHY* y *CCA1* son inducidos por luz pero son expresados rítmicamente con picos de expresión al amanecer (Alabadi *et al.*, 2001). Esta fluctuación en la expresión de *LHY* sugiere que en la integración de las señales fluctuantes de sombreado *LHY* podría cambiar el peso relativo del ambiente lumínico haciendolo menos importante a la mañana (mayores niveles de *LHY*) que a la tarde (menores niveles de *LHY*). Este podría ser el motivo por el cual en la mutante *277F* y en la doble mutante *lhy cca1* vemos mayores cambios en el largo del hipocotilo en los tratamientos que perciben combinaciones de periodos de sombra y luz solar plena (SL o LS).

*HY5* se pega a promotores de osciladores circadianos, entre los que se encuentran *LHY* y *CCA1* (Lee et al., 2007). Ambos genes tienen un nivel de expresión mayor en el mutante *hy5*, sugiriendo que *HY5* inhibe la expresión de *LHY* y *CCA1* en el tratamiento de SL en el genotipo salvaje (Fig. 34). La aplicación exógena de auxinas en el doble mutante *lhy cca1* provoca una menor elongación del hipocotilo comparada al genotipo salvaje, mientras que en la sobre-expresante de *LHY* (277F) la elongación del hipocotilo es mayor (Fig. 36). Estos datos sugieren que la interacción entre las auxinas y *LHY* es positiva. Cuando ocurre la transición hacia la luz solar plena, el aumento de los niveles de *HY5* disminuye los niveles de *LHY* y la sensibilidad a las auxinas inhibiendo así la elongación del hipocotilo.

### ***La convergencia adecuada de las señales determina la correcta integración***

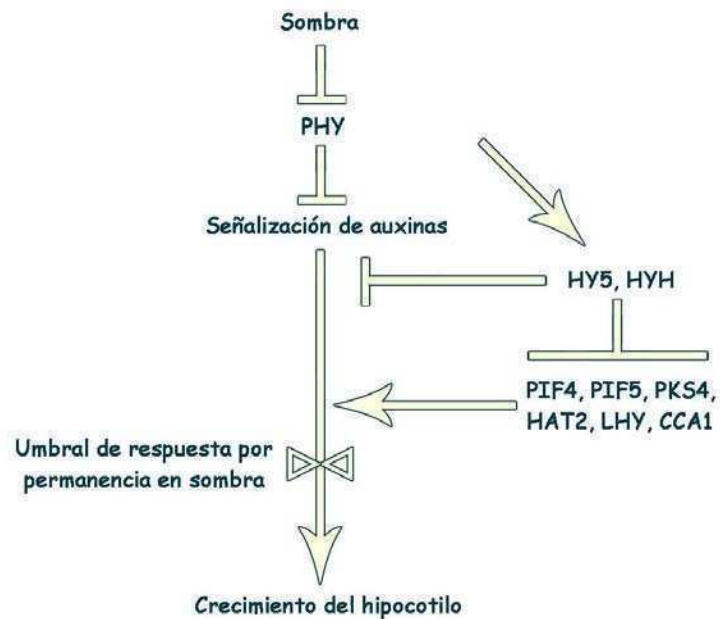
Los resultados expuestos en esta tesis presentan dos situaciones distintas en las cuales complejas redes de señalización regulan el crecimiento de las plántulas integrando señales lumínicas, ya sea señales iniciadas por distintos fotorreceptores o señales fluctuantes en el tiempo. Generalmente, la radiación natural genera la acción simultánea de varios fotorreceptores y muchos procesos fisiológicos están bajo el control de ellos. Consecuentemente, no es sorprendente que la acción de cada fotorreceptor este afectada por la presencia de los otros (Casal, 2000). Las distintas vía de señalización iniciadas por los fotorreceptores en forma independiente todavía son piezas desconectadas que deben ser relacionadas en un sistema dinámico que incluya la acción simultánea de distintas señales.

En altos flujos de luz, *phyB* y *cry1* operan independientemente. De este modo puede ocurrir redundancia si la vía de señalización de un fotorreceptor es suficiente para inducir el máximo o casi el máximo de la respuesta, dejando poco lugar a la contribución del otro fotorreceptor. La interacción entre *phyB* y *cry1* solo se observa cuando la planta se encuentra en condiciones de luz subóptima (Casal y Boccacandro, 1995, Casal y Mazzella, 1998). De este modo la planta logra mediante la integración de ambas vías de señalización, maximizar una respuesta que no lograría en condiciones subóptimas de luz, mediante la interacción de dichas vías. Este mecanismo de integración se genera gracias a la activación de reguladores positivos de la vía de señalización del *phyB* como *HY5*, *HYH*, *SPA1* y *SPA4* por medio de los criptocromos (Fig. 37).



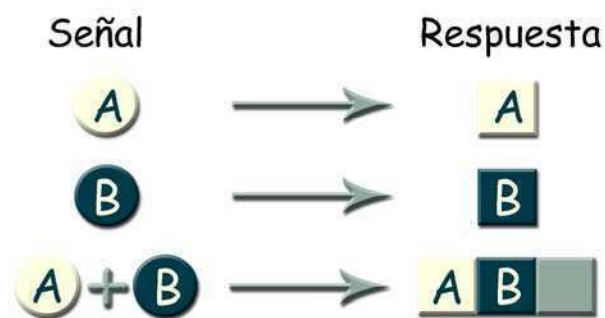
**Fig. 37: Modelo de convergencia entre la señalización de cry1 y phyB.**

Cuando una planta permanece en sombra, se favorece el alargamiento del hipocotilo pero periodos breves de exposición a la luz solar causa caídas en la tasa de crecimiento del tallo proporcionalmente mayores a la permanencia de esta condición lumínica. En este trabajo encontramos que este patrón de respuesta estaría desencadenado por la acción de distintas vías de señalización. Por un lado la regulación hormonal, principalmente las auxinas y GA y por otro lado la señalización a través de factores de transcripción centrales como son PIF4 y PIF5 que promueven el alargamiento del hipocotilo. La permanencia de la señalización por auxinas en sombra, permitiría pasar un umbral de tiempo y lograr una respuesta máxima en una plántula que crece totalmente sombreada. En cambio, al ocurrir la exposición hacia la luz solar plena, los niveles de HY5 aumentan y esta señal podría regular negativamente la señalización de auxinas e inhibir la expresión de reguladores positivos del crecimiento como son *PIF4*, *PIF5*, *HAT2*, *PKS4*, *LHY* y *CCA1* inhibiendo de ese modo el crecimiento del hipocotilo. Genes como *LHY* regularían el impacto de la condición de luz solar plena o sombra en distintos momentos del día (Fig. 38). La correcta integración de estas señales le permite a una plántula que recibe condiciones fluctuantes de sombra y luz solar plena, redistribuir los recursos de un modo distinto al que hace una plántula que permanece todo el tiempo en sombra. En consecuencia, podría optimizar la captación de luz durante el corto tiempo en que percibe luz plena.



**Fig. 38: Modelo de la integración de señales fluctuantes de sombreado vegetal**

En conclusión, en ambos casos se observa que las plantas integran las distintas señales del ambiente mediante la interconexión de distintas vías de señalización, generando una respuesta distinta a la que se alcanza mediante las vías independientes en esas condiciones lumínicas (Fig. 39). El patrón general sería entonces el de integración sinérgica de las vías de transducción de señales.



**Fig. 39: Esquema representativo de la integración sinérgica entre distintas vías de transducción de señales.**

## REFERENCIAS

---

- Achard, P., Vriezen, W. H., Van Der Straeten, D., Harberd, N. P.** (2003). Ethylene regulates Arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell* 15:2816–2825
- Ahmad, M. and Cashmore, A.R.** (1993) HY4 gene of *A. Thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 366:162–166.
- Alabadi, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Mas, P. y Kay, S.A.** (2001). Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. *Science*, 293: 880-883.
- Aloni, R., Schwalm, K., Langhans, M., Ullrich, C.I.** (2003). Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in Arabidopsis. *Planta*, 216:841–853.
- Alvey, L., Harberd, N.** (2005). DELLA proteins: integrators of multiple plant growth regulatory inputs? *Physiol. Plant.* 123:153–160.
- Ballaré, C.L., Scopel, A.L., Ghera, C.M., Sánchez, R.A.** (1987) The population ecology of *Datura ferox* in soybean crops. A simulation approach incorporating seed dispersal *Agriculture, Ecosystems and Environment* 19:177-188
- Ballaré, C.** (1999). Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signalling mechanisms. *Trends Plant Sci*, 4:97-102.
- Banjeree R, Schleicher E, Meier S, Munoz VR, Pokorny R, Ahmad M, Bittl R, Batschauer A.** (2007). The signalling state of Arabidopsis cryptochrome 2 contains flavin semiquinone. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 14916–14922
- Bouly, J.P., Schleicher, E., Dionisio-Sese, M., Vandenbussche, F., Van Der Straeten, D., Bakrim, N., Meier, S., Batschauer, A., Galland, P., Bittl, R. y Ahmad, M.** (2007). Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. *J Biol Chem.*, 282(13):9383-91.
- Carabelli, M., Sessa, G., Baima, S., Morelli, G., Ruberti, I.** (1993). The Arabidopsis *Athb-2* and *-4* genes are strongly induced by far-red-rich light. *Plant Journal* 4:469-479
- Carre, I.A. y Kim, J.Y.** (2002). MYB transcription factors in the Arabidopsis circadian clock. *Journal Exp Bot.*, 53:1551-1557.
- Casal JJ** (1995) Coupling of phytochrome B to the control of hypocotyl growth in Arabidopsis. *Planta* 196:23-29.
- Casal JJ, Boccalandro H** (1995) Co-action between phytochrome B and HY4 in Arabidopsis thaliana. *Planta* 197:213-218.

- Casal, J.J.** (1996). Phytochrome A enhances the promotion of hypocotyl growth caused by reductions of phytochrome B Pfr levels in light-grown *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 112:965-973
- Casal, J.J., Mazzella, M.A.** (1998). Conditional synergism between cryptochrome 1 and phytochrome B is shown by the analysis of phyA, phyB, and hy4 simple, double, and triple mutants in *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* 118, 19-25.
- Casal JJ** (2000) Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants. *Photochemistry and photobiology* 71:1-11.
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu Y-J, Liu, D** (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284:760-765.
- Castillon, A., Shen, H., and Huq, E.** (2007). Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci.* 12:514-521.
- Chandler, J. W.** (2009). Local auxin production: a small contribution to a big field. *BioEssays*, 31:60-70.
- Chen, M., Chory, J., Frankhauser, C.** (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annu Rev. Genet.*, 38:87-117.
- 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
- Cluis, C. P., Mouchel C. F., Hardtke, C. S.** (2004). The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. *The Plant Journal*, 38: 332-347 .
- Covington, M. F. y Harmer, S. L.** (2007). The circadian clock regulates auxin signaling and responses in *Arabidopsis*. *Plos Biology*, 5:1773-1784
- Cowling, R. y Harberd, N.** (1999). Gibberellins control *Arabidopsis* hypocotyl growth via regulation of cellular elongation). *Journal of Exp. Bot.* 50:1351-1357
- de Lucas M, Davière JM, Rodríguez-Falcón M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blázquez MA, Titarenko E, Prat S.** (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature.* 24:480-484.
- Deng XW, Caspar T, Quail PH** (1991) cop1: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 5:1172-1182.
- Deng XW, Quail PH** (1999) Signalling in light-controlled development. *Semin Cell Dev Biol* 10: 121-129
- Devlin P, Patel SR, Whitelam GC** (1998) Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1479-1488.
- Devlin, P.F., Yanovsky, M.J., Kay, S.A.** (2003). A genomic analysis of the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 133:1617-1629.
- Djakovic-Petrovic T, de Wit M, Voeselek LA, Pierik R.** (2007). DELLA protein function in growth responses to canopy signals. *Plant J.* 51:117-26.

- Dowson-Day M.J. and Millar A.J.** (1999). Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 17, 63-71.
- Feng S, Martinez C, Gusmaroli G, Wang Y, Zhou J, Wang F, Chen L, Yu L, Iglesias-Pedraz JM, Kircher S, Schäfer E, Fu X, Fan LM, Deng XW.** (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature*, 24:475-479
- Fleet, C.M. and Sun, T.** (2005). A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:77–85.
- Frankhauser, C., Chory, J.** (1997). Light control of plant development *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13:203-229
- Fankhauser C, Chory J.** (2000). RSF1, an *Arabidopsis* locus implicated in phytochrome A signaling. *Plant Physiol*, 124:39-45.
- Franklin KA, Praekelt U, Stoddart WM, Billingham OE, Halliday KJ, Whitelam GC** (2003) Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131:1340-1346
- Franklin, K. A.** (2008). Shade avoidance. *New Phytologist*, 179: 930–944
- Fu, X., Harberd, N.P.** (2003) Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* 421:740–743
- Fujimori, T., Yamashino, T., Kato, T., Mizuno, T.** (2004). Circadian-Controlled Basic/Helix-Loop-Helix Factor, PIL6, Implicated in Light-Signal Transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 45:1078-1086.
- Goda H, Sasaki E, Akiyama K, Maruyama-Nakashita A, Nakabayashi K, Li W, Ogawa M, Yamauchi Y, Preston J, Aoki K, Kiba T, Takatsuto S, Fujioka S, Asami T, Nakano T, Kato H, Mizuno T, Sakakibara H, Yamaguchi S, Nambara E, Kamiya Y, Takahashi H, Hirai MY, Sakurai T, Shinozaki K, Saito K, Yoshida S, Shimada Y.** (2008). The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *Plant Journal*, 55:526-542.
- 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.
- Halliday, K.J., Fankhauser, C.** (2003) Phytochrome-hormonal signalling networks. *New Phytol.* 157:449–463
- Hisamatsu, T., King, R.W., Helliwell, C.A., Koshioka, M.** (2005). The involvement of gibberellin 20-oxidase genes in phytochromeregulated petiole elongation of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 138:1106–1116.
- Hoecker, U., Tepperman, J.M., and Quail, P.H.** (1999). SPA1, a WD-repeat protein specific to phytochrome A signal transduction. *Science*, 284:496–499.
- Hoecker, U., and Quail, P.H.** (2001). The phytochrome A-specific signaling intermediate SPA1 interacts directly with COP1, a constitutive repressor of light signaling in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, 276:38173–38178.

- 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.
- Huq E, Al-Sady B, Hudson M, Kim C, Apel K, Quail PH.** (2004). Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science*, 24:1937-1941.
- Janknecht, R., Hunter, T.** (1999). Nuclear fusion of signaling pathways. *Science* 284(5413):443-444
- Jiao Y, Lau OS y Deng XW.** (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet*, 8:217-230.
- Johnson E, Bradley M, Harberd P, Whitelam GC** (1994) Photoresponses of light-grown *phyA* mutants of *Arabidopsis*. *Phytochrome A* is required for the perception of daylength extensions. *Plant Physiology* 105:141-149.
- Kendrick, R.E., Hillmann, W.S.** (1971). Aspects of phytochrome decay in etiolated seedlings under continuous illumination. *Am. J. Bot.*, 58:424–428.
- Khanna R, Huq E, Kikis EA, Al-Sady B, Lanzatella C, Quail PH.** (2004). A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Cell*, 16:3033-3044.
- Kim, W.Y., Fujiwara, S., Suh, S.S., Kim, J., Kim, Y., Han, L., David, K., Somers, D.E.** (2007). ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature*, 449: 356-360
- Kleine T, Lockhart P, Batschauer A.** (2003). An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *Plant Journal*, 35:93–103
- Koornneef M, Rolf E, Spruit CJP** (1980) Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie* 100:147-160.
- Lariguet, P., Schepens, I., Hodgson, D., Pedmale, U.V., Trevisan, M., Kami, C., de Carbonnel, M., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Liscum, E., Fankhauser, C.** (2006). PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 is a phototropin 1 binding protein required for phototropism. *PNAS*, 103:134-139.
- Laubinger, S., Fittinghoff, K., Hoecker1, U.** (2004). The SPA Quartet: A Family of WD-Repeat Proteins with a Central Role in suppression of Photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16:2293–2306.
- 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. *The Plant Cell*, 19: 731–749.
- Leivar P, Monte E, Oka Y, Liu T, Carle C, Castillon A, Huq E, Quail PH.** (2008). Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Curr Biol*, 18:1815-1823.



- Lin C, Robertson DE, Ahmad M, Raibekas AA, Jorns MS, Dutton PL, Cashmore AR.** (1995). Association of flavin adenine dinucleotide with the Arabidopsis blue light receptor CRY1. *Science*, 269: 968–970.
- Lin, C., Yang, H., Guo, H., Mockler, T., Chen, J. and Cashmore, A.R.** (1998). Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95:2686–2690.
- Lin, C.** (2002). Blue light receptors and signal transduction *Plant Cell* 14:S207-S225
- Lorrain, S., Trevisan, M., Pradervand, S., Fankhauser, C.** (2008). Phytochrome interacting factors 4 and 5 redundantly limit seedling de-etiolation in continuous far-red light. *Plant Journal*, 53:312-323.
- Mancinelli AL** (1994) The physiology of phytochrome action. En: Kendrick RE, Kronenberg GHM (eds) *Photomorphogenesis in plants*, 2 edn, pp 211-269. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Marme, D., Marchal, B., Schafer, E.** (1971). A detailed analysis of phytochrome decay and dark reversion in mustard cotyledons. *Planta*, 100:331-336.
- Michael, T. P., Breton, G., Hazen, S. P., Priest, H., Mockler, T. C., Kay, S. A., Chory, J.** (2008) A Morning-Specific Phytohormone Gene Expression Program underlying Rhythmic Plant Growth. *Plosbiology*, 6:e225 1887
- Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y., Wright, L., Mizoguchi, M., Song, H.R., Carre, I.A. y Coupland G.** (2002). LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in Arabidopsis. *Dev. Cell*, 2: 629-641.
- Morgan DC, O'Brien T, Smith H.** (1980). Rapid photomodulation of stem extension in light- grown *Sinapis alba* L. Studies on kinetics, site of perception and photoreceptor. *Planta*, 150:95–101
- Nagatani A, Chory J, Furuya M** (1991) Phytochrome B is not detectable in the hy3 mutant of Arabidopsis, which is deficient in responding to end-of-day far- red light treatments. *Plant Cell Physiol.* 32:1119-1122.
- Nagy F, Kircher, S, Schäfer, E** (2001) Intracellular trafficking of photoreceptors during light-induced signal transduction in plants. *Journal of Cell Science* 114:475-480.
- Neff M, Chory J** (1998) Genetic interactions between phytochrome a, phytochrome b and cryptochrome 1 during Arabidopsis development. *Plant Physiology* 118:27-36.
- Ninfa, A.J., Mayo, A.E.** (2004). Hysteresis vs. Graded responses: the connections make all the difference. *Sci STKE*, 232:pe20.
- Oelmüller, R. y Mohr, H.** (1985). Mode of coaction between blue/UV light and light absorbed by phytochrome in light-mediated anthocyanin formation in the milo (*Sorghum vulgare* Pers.) seedling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82:6124-6128.
- Okushima, Y., Mitina, I., Quach, H.L., Theologis, A.** (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *Plant J.*, 43:29-46.
- Osterlund MK, Deng X-W** (1998) Multiple photoreceptors mediate the light induced reduction of GUS-COP1 from Arabidopsis hypocotyl nuclei. *Plant Journal* 16:201-208.

- Osterlund MT, Hardtke, NW, Deng, X-W** (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* 405:462-466.
- Pierik R, Cuppens M, Voeselek L., Visser E.** (2004). Interactions between ethylene and gibberellins in phytochrome-mediated shade avoidance responses in tobacco. *Plant Physiol* 136 2928–2936
- Pierik, R., Djakovic-Petrovic, T., Keuskamp, D. H., de Wit, M. And Voeselek, L.** (2009). Auxin and ethylene regulate elongation responses to neighbour proximity signals independent of gibberellin and DELLA proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149:1701-1712.
- Qin, M., Kuhn, R., Moran, S., Quail, P.H.** (1997). Overexpressed phytochrome C has similar photosensory specificity to phytochrome B but a distinctive capacity to enhance primary leaf expansion. *Plant Journal* 12:1163-1172
- Quail PH** (1991) Phytochrome: a light-activated molecular switch that regulates plant gene expression. *Annu. Rev. Genet.* 25:389-409.
- Quail PH, Boylan MT, Parks BM, Short TW, Xu Y, Wagner D** (1995) Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* 268: 675-680
- Reed JW, Nagpal P, Poole DS, Furuya M, Chory J** (1993) Mutations in the gene for the Red/Far-Red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 5:147-157.
- 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.
- Reed, J.W., Foster, K.R., Morgan, P.W., Chory, J.** (1996). Phytochrome B affects responsiveness to gibberellins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 112:337–342.
- Roig-Villanova, I., Bou, J., Sorin, C., Devlin, P. F., Martínez-García, J. F.** (2006). Identification of primary target genes of phytochrome signaling. Early transcriptional control during shade avoidance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 141:85-96.
- Roig-Villanova, I., Bou-Torrent, J., Galstyan, A., Carretero-Paulet, I., Portolés, S. Rodríguez-Concepción, M. y Martínez-García, J. F.** (2007). Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins. *The EMBO Journal*, 26: 4756–4767.
- 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
- Saijo, Y., Sullivan, J.A., Wang, H., Yang, J., Shen, Y., Rubio, V., Ma, L., Hoecker, U., and Deng, X.W.** (2003). The COP1–SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes Dev*, 17:2642–2647.
- Sawa, S., Ohgishi, M., Goda, H., Higuchi, K., Shimada, Y., Yoshida, S., Koshiba, T.** (2002). The HAT2 gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 32(6):1011-1022.

- Schepens, I., Boccalandro, H., Kami, C., Casal, J.J., Fankhauser, C.** (2008). PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE4 Modulates Phytochrome-Mediated Control of Hypocotyl Growth Orientation. *Plant Physiol.*, 147: 661–671.
- Selby, C.P. and Sancar, A.** (2006) A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 103:17696–17700.
- Sessa, G., Carabelli, M., Sassi, M., Ciolfi, A., Possenti, M., Mittempergher, F., Becker, J., Morelli, G., Ruberti, I.** (2005) A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Genes & Dev*, 19(23): 2811–2815.
- Sibout, R., Sukumar, P., Hettiarachchi, C., Holm, M., Muday, G.K. y Hardtke, C. S.** (2006). Opposite Root Growth Phenotypes of *hy5* versus *hy5 hyh* Mutants Correlate with Increased Constitutive Auxin Signaling. *Plos Genetics*, 2(11): e202.
- Smalle, J., Haegman, M., Kurepa, J., Van Montagu, M., Van Der Straeten, D.** (1997). Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(6):2756-2761
- Smith, H.** (2000). Phytochromes and light signal perception by plants-an emerging synthesis. *Nature*, 407:585-590.
- Somers DE, Sharrock RA, Tepperman JM, Quail PH** (1991) The *hy3* long hypocotyl mutant of *Arabidopsis* is deficient in phytochrome B. *Plant Cell* 3:1263-1274.
- Somers, D. E., Quail, P.H.** (1995). Temporal and spatial expression patterns of *PHYA* and *PHYB* genes in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 7:413-427.
- Sorin, C., Bussell, J.D., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G., McKhann, H., Garcion, C., Vaucheret, H., Sandberg, G., and Bellini, C.** (2005). Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require *ARGONAUTE1*. *Plant Cell*, 17:1343–1359.
- Stacey MG, von Arnim, A.G.** (1999) A novel motif mediates the targeting of the *Arabidopsis* COP1 protein to subnuclear foci. *J. Biol. Chem.* 274: 27231-27236.
- Stenberg, P., Palmroth, S., Bond, B.J., Sprugel, D.G., Smolander, H.** (2001). Shoot structure and photosynthetic efficiency along the light gradient in a Scots pine canopy. *Tree Physiol.*, 21:805-814.
- Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T.F., Raman, R., Somers, D.E., Mas, P., Panda, S., Kreps, J.A. y Kay, SA.** (2000). Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science*, 289: 768-771.
- Tanimoto, M., Jowett, J., Stirnberg, P., Rouse, D., Leyser, O.** (2007). *pax1-1* partially suppresses gain-of-function mutations in *Arabidopsis* *AXR3/IAA17*. *BMC Plant Biol.*, 7:20.
- Tao, Y., Ferrer, J.L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J.A., Li, L., Moreno, J.E., Bowman, M.E., Ivans, L.J., Cheng, Y., Lim, J., Zhao, Y., Ballaré, C.L., Sandberg, G., Noel, J.P., Chory, J.** (2008), Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, 133:164-176.

- 
- Tepperman J. M , Zhu, T., Chang, H. S., Wang, X., Quail, P. H.** (2001) Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98:9437-9442.
- Wilmoth, J.C., Wang, S., Tiwari, S.B., Joshi, A.D., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Reed, J.W.** (2005). NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *Plant J.*, 43:118-130.
- Whitelam, G.C. y Devlin, P.F.** (1997). Roles of different phytochromes in Arabidopsis photomorphogenesis. *Plant Cell and Environment*, 20:752-758
- Whitelam, G. C. y Halliday, K. J.** (2007). *Light and plant development*. 1st edn. Blackwell Publishing, Oxford
- Vandenbussche F, Vriezen WH, Smalle J, Laarhoven LJ, Harren FJ, Van Der Straeten D.** (2003). Ethylene and auxin control the *Arabidopsis* response to decreased light intensity. *Plant Physiol*, 133:517-527.
- Vandenbussche, F., Pierik, R., Millenaar, F.F., Voesenek, L. y Van Der Straeten, D.** (2005). Reaching out of the shade. *Current Opinion in Plant Biology*, 8:462–468.
- Yamamoto, Y., Matsui, M., Ang, L. H., Deng, X. W.** (1998). Role of a COP1 interactive protein in mediating light-regulated gene expression in arabidopsis. *Plant Cell*, 10: 1083–1109
- Yanovsky MJ, Casal JJ, Whitelam GC** (1995) Phytochrome A, phytochrome B and HY4 are involved in hypocotyl growth responses to natural radiation in Arabidopsis: weak de-etiolation of the phyA mutant under dense canopies. *Plant, Cell & Environment* 18:788-794.

## ANEXO

**Tabla 1:** Lista de 324 genes que muestran una respuesta al tratamiento de luz azul y que están reducidos significativamente en el mutante de *cry1* ( $P < 0.005$ ,  $q < 0.1$ ). Los genes han sido clasificados en cuatro grupos de acuerdo a si la respuesta mediada por *cry1* es reducida o no en la ausencia de *phyB* activo y el efecto transitorio o persistente a la luz azul. Cada uno de estos grupos fueron clasificados en *clusters*.

A) 240 genes con una respuesta mediada por <i>cry1</i> que depende de <i>phyB</i>	
221 genes con una respuesta persistente mediada por <i>cry1</i> que depende de <i>phyB</i>	
<b>Cluster 1 (178 genes)</b>	
ATCG00750	ribosomal protein S11
ATCG00760	ribosomal protein L36
AT2G26430	putative cyclin ;supported by full-length cDNA: Ceres:22595,
AT2G39750	unknown protein ; supported by cDNA: gi_15450748_gb_AY053416,1_
AT4G14385	Expressed protein ; supported by cDNA: gi_13877886_gb_AF370206,1_AF370206
AT4G17730	syntaxin ; supported by cDNA: gi_2149379_gb_U85036,1_ATU85036
AT4G16845	Expressed protein ; supported by cDNA: gi_14334421_gb_AY034902,1_
AT4G16100	hypothetical protein ; supported by cDNA: gi_15450995_gb_AY054578,1_
AT4G16830	nuclear antigen homolog ;supported by full-length cDNA: Ceres:118826,
AT4G17150	hypothetical protein
AT1G26260	bHLH transcription factor GBOF-1, putative similar to bHLH transcription factor GBOF-1
AT5G20620	polyubiquitin (UBQ4) identical to GI:17677
AT5G19430	putative protein predicted proteins, Drosophila melanogaster and Homo sapiens
AT5G20520	putative protein BEM46 bem1/bud5 suppressor, Schizosaccharomyces pombe, bem1/bud5 suppressor,
AT5G21010	hypothetical protein (fragment) ;supported by full-length cDNA: Ceres:113260,
AT4G37210	putative protein ; supported by cDNA: gi_13877852_gb_AF370189,1_AF370189
AT1G16680	S-locus protein, putative similar to S-locus protein 5 GI:6069485 from [Brassica rapa]
AT5G67380	casein kinase II alpha subunit ; supported by cDNA: gi_391602_dbj_D10246,1_ATHCK2A
AT5G67520	adenylylsulfate kinase-like protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:125039,
AT5G66920	pectinesterase like protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:116979,
AT5G64960	cdc2-like protein kinase ; supported by cDNA: gi_13430443_gb_AF360134,1_AF360134
AT5G64670	putative protein similar to unknown protein (ref NP_014115,1);supported by full-length cDNA: Ceres:14033,
AT5G64630	FAS2 (dbj BAA77766,1) ; supported by cDNA: gi_14030688_gb_AF375435,1_AF375435
AT5G64360	putative protein similar to unknown protein (emb CAB89376,1)
AT5G63000	putative protein contains similarity to unknown protein (dbj BAA89593,1)
AT5G59830	putative protein predicted proteins, Arabidopsis thaliana
AT5G54200	putative protein contains similarity to WD-containing protein

AT5G51840	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:36309,
AT5G49580	putative protein contains similarity to unknown protein (pir  T01052)
AT5G47970	putative protein strong similarity to unknown protein (emb CAB87804,1)
AT5G47540	putative protein similar to unknown protein (emb CAB78730,1)
AT5G47320	40S ribosomal protein S19 ; supported by cDNA: gi_15028320_gb_AY045963,1_
AT5G46840	putative protein contains similarity to RNA-binding protein;supported by full-length cDNA: Ceres:265530,
AT5G46210	cullin ;supported by full-length cDNA: Ceres:101723,
AT5G46150	putative protein similar to unknown protein (gb AAD25612,1);supported by full-length cDNA: Ceres:19716,
AT5G44800	helicase-like protein
AT5G40740	putative protein ; supported by cDNA: gi_14532693_gb_AY039971,1_
AT5G40550	putative protein predicted protein, Arabidopsis thaliana
AT5G40250	RING finger -like protein RING-H2 zinc finger protein ATL4, Arabidopsis thaliana, EMBL:AF132014
AT5G38880	putative protein
AT5G23890	unknown protein
AT5G23630	cation-transporting ATPase
AT5G13690	alpha-N-acetylglucosaminidase
AT5G13010	pre-mRNA splicing factor ATP-dependent RNA helicase -like protein
AT5G11700	putative protein predicted protein, Arabidopsis thaliana
AT5G09690	putative protein MRS2 protein, Saccharomyces cerevisiae, EMBL:M82916
AT5G08590	serine/threonine-protein kinase
AT5G07920	diacylglycerol kinase (ATDGK1) ; supported by cDNA: gi_1374771_dbj_D63787,1_ATHATDGK1
AT5G05670	signal recognition particle receptor beta subunit-like protein
AT5G05680	putative protein similar to unknown protein (pir  F71190)
AT5G04480	putative protein predicted protein, Arabidopsis thaliana; supported by cDNA: gi_15450502_gb_AY052353,1_
AT5G01390	heat shock protein 40-like heat shock protein 40 - Mus musculus, EMBL:AB028272
AT5G01370	hypothetical protein
AT3G62120	multifunctional aminoacyl-tRNA ligase-like protein multifunctional aminoacyl-tRNA ligase
AT3G60300	putative protein RING finger protein AO7, Mus musculus, EMBL:AF171060
AT3G59430	hypothetical protein
AT3G51050	putative protein hypothetical protein L1648,04 - Leishmania major, EMBL:LMFL1648
AT3G51310	vacuolar sorting protein 35 homolog vacuolar sorting protein 35 - Homo sapiens, EMBL:AF191298
AT3G50000	CASEIN KINASE II, ALPHA CHAIN 2 (CK II) ; supported by cDNA: gi_391604_dbj_D10247,1_ATHCK2B
AT3G50110	putative tyrosine phosphatase phosphatase PTEN - Drosophila melanogaster
AT3G49310	putative protein sugar transporter 2, Drosophila melanogaster, EMBL:AF199484
AT3G47610	putative protein activating signal cointegrator 1
AT4G38500/A	putative protein other Arabidopsis hypothetical proteins; supported by cDNA: gi_15010783_gb_AY045693,1_
AT4G37750	ovule development protein aintegumenta (ANT) ; supported by cDNA: gi_1171428_gb_U44028,1_ATU44028
AT4G37590	putative protein predicted protein, Arabidopsis thaliana; supported by cDNA: gi_15451175_gb_AY054668,1_
AT4G36160	NAM like protein P,hybrida NAM gene, PID:E205713
AT4G35940	putative protein glutamic acid-rich protein precursor, Plasmodium falciparum (GARP), PIR2:A54514
AT4G35020	Rho1Ps homolog Rac-like protein ; supported by cDNA: gi_1732518_gb_U62746,1_ATU62746

AT4G31090	putative protein predicted proetin, Arabidopsis thaliana
AT4G29940	pathogenesis related homeodomain protein (PRHA) ; supported by cDNA: gi_507219_gb_L21991,1_ATHPRHA
AT4G29500	X-Pro dipeptidase - like protein (fragment) X-Pro dipeptidase, Homo sapiens, PIR2:A32454
AT4G28610	putative protein WREBP-1, Nicotiana tabacum, EMBL:AB017693
AT4G26190	putative protein mature-parasite-infected erythrocyte surface antigen MESA - Plasmodium falciparum, PIR2:A45605
AT4G25970	putative phosphatidylserine decarboxylase phosphatidylserine decarboxylase (EC 4,1,1,65) 2 - yeast, Pir2:S64484
AT4G23950	putative protein various npredicted proteins, Arabidopsis thaliana
AT4G24100	putative protein Ste-20 related kinase SPAK - Mus musculus,PID:g3851169
AT4G18700	putative protein kinase ; supported by cDNA: gi_13249122_gb_AF295667,1_AF295667
AT4G18820	putative protein DNA polymerase III holoenzyme tau subunit, Thermus thermophilus, gb:AF025391
AT4G13840	fatty acid elongase - like protein (cer2-like) cer2, Arabidopsis thaliana, X93080
AT4G09630	putative protein hypothetical protein T17M13,8 - Arabidopsis thaliana,PID:g3461817
AT4G08460	hypothetical protein
AT2G33620	AT-hook DNA-binding protein (AHP1) almost identical to GB:CAA10857
AT2G33440	putative splicing factor U2AF large chain
AT1G18160	MAP kinase, putative similar to MAP3K delta-1 protein kinase GI:2253010 from [Arabidopsis thaliana]
AT1G55080	hypothetical protein predicted by genemark,hmm
AT1G50950	hypothetical protein
AT3G12520	sulphate transporter, putative similar to high affinity sulphate transporter GB:X96431 GI:1217966 [Hordeum vulgare]
AT3G12210	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 31922,
AT1G54920	unknown protein ; supported by cDNA: gi_16930484_gb_AF419596,1_AF419596
AT1G50710	unknown protein
AT1G32540	zinc-finger protein, putative similar to GI:5262161 from [Arabidopsis thaliana]
AT1G31600	hypothetical protein predicted by genemark,hmm
AT3G52290	unknown protein
AT3G52170	putative protein DNA-binding protein PD2 - Pisum sativum,PID:e275185
AT3G30380	unknown protein contains Pfam profile: PF00561 alpha/beta hydrolase fold
AT3G29375	hypothetical protein predicted by genemark,hmm
AT3G20490	hypothetical protein predicted by genemark,hmm
AT1G77250	hypothetical protein predicted by genemark,hmm
AT2G04230	hypothetical protein predicted by genscan
AT3G20280	hypothetical protein contains PHD-finger, implications for chromatin-mediated transcriptional regulation
AT3G16840	RNA helicase, putative similar to RNA helicase GB:CAA09204 from [Arabidopsis thaliana]
AT3G18370	unknown protein contains Pfam profile: PF00168 C2 domain; supported by cDNA: gi_15983786_gb_AY056799,1_
AT3G13030	hypothetical protein predicted by genscan+
AT3G25500/A	formin-like protein AHF1 identical to formin-like protein AHF1 GB:AAF14548 from [Arabidopsis thaliana]
AT3G19840	hypothetical protein predicted by genemark
AT3G19870	unknown protein
AT3G23640	hypothetical protein contains Pfam profile: PF01055 Glycosyl hydrolases family 31
AT3G15780	unknown protein
AT3G06060	unknown protein contains Pfam profile: PF00106 short chain dehydrogenase

AT3G06580	galactose kinase identical to GB:AAB94084 from [Arabidopsis thaliana] (Plant Mol, Biol, (1999) 39 (5), 1003-1012)
AT3G07020	UDP-glucose:sterol glucosyltransferase UDP-glucose:sterol glucosyltransferase GB:Z83833 [Arabidopsis thaliana]
AT3G09320	unknown protein ; supported by cDNA: gi_14517365_gb_AY039517,1_
AT3G09360	putative transcription factor similar to general transcription factor IIIB GB:4507355 [Homo sapiens]
AT3G05420	unknown protein contains Pfam profile:PF00887 Acyl CoA binding protein
AT3G05220	unknown protein
AT1G19080	unknown protein
AT1G63080/A	unknown protein
AT1G72650	hypothetical protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:110945,
AT1G76400	putative ribophorin I (dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase)
AT1G71410	hypothetical protein predicted by genefinder, contains protein kinase domain
AT1G80550	unknown protein
AT1G14570	unknown protein ; supported by cDNA: gi_13877612_gb_AF370507,1_AF370507
AT1G06110	F-box protein family contains similarity to F-box protein FBX3 GI:6103643 from [Homo sapiens]
AT1G17470	developmentally regulated GTP-binding protein identical to GB:AAB67830 from (Arabidopsis thaliana)
AT1G75340	hypothetical protein predicted by genemark,hmm; supported by cDNA: gi_14335031_gb_AY037195,1_
AT1G32860	beta-1,3-glucanase precursor, putative similar to beta-1,3-glucanase precursor GI:4097948 from [Oryza sativa]
AT1G12930	unknown protein ; supported by cDNA: gi_15215745_gb_AY050402,1_
AT1G05890	unknown protein
AT1G21060	unknown protein
AT1G33060	NAC domain containing protein, putative similar to NAC1 GB:AAF68626 GI:7716952 from [Medicago truncatula]
AT1G50140	hypothetical protein contains similarity to spastin protein orthologue GB:CAB60143 GI:6273572 from [Mus musculus]
AT4G00380/A	transcriptional regulator, putative similar to transcriptional regulator GI:4836767 from [Zea mays]
AT1G11350	serine/threonine kinase, putative similar to serine/threonine kinase GI:2181189 from [Brassica oleracea]
AT1G35620	protein disulfide isomerase, putative similar to GB:AAA85099 GI:687235 from [Onchocerca volvulus]
AT1G56180	hypothetical protein predicted by genemark,hmm; supported by cDNA: gi_13605648_gb_AF361805,1_AF361805
AT1G02870	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:5556,
AT2G01060	transfactor-like protein similar to transfactor GB:BAA75684 from [Nicotiana tabacum]
AT2G01100	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 39741,
AT1G48410	leaf development protein Argonaute identical to GB:AAC18440 from (Arabidopsis thaliana)
AT1G11240	hypothetical protein predicted by genemark,hmm,supported by full-length cDNA: Ceres:111951,
AT1G28540	hypothetical protein predicted by genemark,hmm; supported by full-length cDNA: Ceres: 29823,
AT1G59960	NADPH-dependent codeinone reductase, putative similar to NADPH-dependent codeinone reductase
AT1G54380	hypothetical protein predicted by genemark,hmm; supported by cDNA: gi_13430457_gb_AF360141,1_AF360141
AT1G75730	hypothetical protein predicted by genemark,hmm
AT2G31650	putative SET-domain transcriptional regulator
AT2G31740	hypothetical protein predicted by genscan
AT2G24820/A	hypothetical protein predicted by genscan
AT2G04740	unknown protein predicted by genefinder
AT2G36930	unknown protein ; supported by cDNA: gi_15027948_gb_AY045831,1_
AT2G27900	unknown protein



AT1G22620	unknown protein Similar to hypothetical protein C34B7,2 gb 1729503 from <i>C. elegans</i> cosmid gb Z83220
AT1G09280/A	unknown protein ; supported by cDNA: gi_15081790_gb_AY048288,1_
AT1G70310	spermidine synthase, putative similar to spermidine synthase GI:4138109 from [ <i>Lycopersicon esculentum</i> ]
AT1G03300	unknown protein Strong similarity to T08I13,7 gi 2275201 unknown protein from <i>Arabidopsis thaliana</i> BAC
AT1G11950	putative DNA-binding protein Contains similarity to box helicases gb U29097 from <i>C</i>
AT1G30825	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 101351,
AT1G65540	hypothetical protein contains similarity to caltractin GI:3688162 from [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
AT1G08780	unknown protein similar to C-1 ( <i>Homo sapiens</i> ) (U41816); supported by full-length cDNA: Ceres: 20276,
AT1G60780	clathrin adaptor medium chain protein MU1B, putative similar to clathrin adaptor medium chain protein MU1B
AT1G77080	unknown protein contains similarity to MADS box transcription factor GI:3688591 from [ <i>Triticum aestivum</i> ]
AT2G36720	putative PHD-type zinc finger protein
AT2G28450	putative RNA methyltransferase
AT2G20790	unknown protein
AT2G06010	hypothetical protein predicted by genscan
AT2G32040	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:15582,
AT2G40760	rhodanese-like family protein
AT2G40650	hypothetical protein predicted by genscan;supported by full-length cDNA: Ceres:35168,
AT2G38020	putative vacuolar protein sorting-associated protein ; supported by cDNA: gi_15081710_gb_AY048248,1_
AT2G47980	putative putative sister-chromatide cohesion protein member of stromalin protein family
AT2G25910	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:26655,
AT2G46800	putative zinc transporter ;supported by full-length cDNA: Ceres:207558,
AT2G39580	unknown protein
AT2G34340	hypothetical protein predicted by genefinder; supported by full-length cDNA: Ceres: 29146,
AT2G39340	unknown protein
AT2G41090	calcium binding protein (CaBP-22) identical to GB:Z12136;supported by full-length cDNA: Ceres:123659,
AT2G44065	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 24003,
AT2G34770	fatty acid hydroxylase (FAH1) identical to GB:AF021804; supported by cDNA: gi_15215595_gb_AY050326,1_
AT2G32980	hypothetical protein predicted by genefinder;supported by full-length cDNA: Ceres:38147,
<b>Cluster 2 (23 genes)</b>	
ATCG00020	PSII 32 KDa protein
AT5G62020	heat shock factor 6
AT5G40370	glutaredoxin -like protein glutaredoxin, castor bean, PIR:S54825; supported by full-length cDNA: Ceres: 23800,
AT5G37480	hypothetical protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:40348,
AT5G24160	squalene monooxygenase 1,2 (squalene epoxidase 1,2) (se 1,2) (sp O65402)
AT5G13880	unknown protein ; supported by cDNA: gi_15215581_gb_AY050319,1_
AT5G11740	putative protein gibberellin-responsive protein CRG16, <i>Cucumis sativus</i> , EMBL:D49413
AT4G13510	ammonium transport protein (AMT1) ; supported by cDNA: gi_14335079_gb_AY037219,1_
AT4G03960	putative protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:26983,
AT1G56300	DnaJ protein, putative contains Pfam profile: PF00226: DnaJ domain;supported by full-length cDNA: Ceres:25796,
AT3G23170	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:92314,
AT1G67880	unknown protein similar to N-acetylglucosaminyltransferase III GB:AAc53064 [ <i>Mus musculus</i> ]

AT1G74640 unknown protein contains Pfam profile: PF00561 alpha/beta hydrolase fold  
 AT1G63840 putative RING zinc finger protein Pfam HMM hit: zinc finger, C3HC4 type (RING finger)  
 AT1G76130 alpha-amylase, putative similar to alpha-amylase GI:7532799 from [Malus domestica]  
 AT1G06430 FtsH protease, putative similar to zinc dependent protease GI:7650138 from [Arabidopsis thaliana]  
 AT1G59700 glutathione S-transferase, putative similar to glutathione S-transferase  
 AT1G10500 unknown protein similar to ESTs gb|H36734 and gb|AA651244  
 AT2G15390 unknown protein  
 AT2G29300/A putative tropinone reductase ;supported by full-length cDNA: Ceres:1637,  
 AT2G23840 unknown protein  
 AT2G39500 unknown protein ; supported by cDNA: gi\_14335015\_gb\_AY037187,1\_  
 AT2G30960/A FtsH protease (VAR2) identical to zinc dependent protease VAR2 GI:7650138 from [Arabidopsis thaliana]

**Cluster 3 (9 genes)**

AT5G20350 ankyrin-repeat protein patsas protein - Drosophila melanogaster, EMBL:AF163011  
 AT5G66960 protease-like  
 AT5G15230 GASA4 ; supported by cDNA: gi\_950098\_gb\_U15683,1\_ATU15683  
 AT4G21610 Lsd1 like protein zinc-finger protein Lsd1 Arabidopsis thaliana, Patchx:G1872521  
 AT3G15130 hypothetical protein contains Pfam profile: PF01535 domain of unknown function (2 copies)  
 AT3G10010 hypothetical protein similar to hypothetical protein GB:AAD24633 [Arabidopsis thaliana]  
 AT1G76220 hypothetical protein predicted by genemark,hmm  
 AT1G49350 hypothetical protein predicted by genemark,hmm,supported by full-length cDNA: Ceres:117456,  
 AT2G28840 putative RING zinc finger ankyrin protein ; supported by cDNA: gi\_13926221\_gb\_AF370581,1\_AF370581

**11 genes that do not group in clusters 1,2 or 3**

AT2G33220 unknown protein predicted by genefinder and 5 EST; supported by full-length cDNA: Ceres: 954,  
 AT3G56690 calmodulin-binding protein ; supported by cDNA: gi\_6760427\_gb\_AF217546,1\_AF217546  
 AT5G62460 unknown protein ; supported by cDNA: gi\_16974606\_gb\_AY060581,1\_  
 AT5G24660 putative protein similar to unknown protein (emb CAB62461,1);supported by full-length cDNA: Ceres:268701,  
 AT3G15970 unknown protein contains RanBP1 domain;supported by full-length cDNA: Ceres:108414,  
 AT1G72410 hypothetical protein predicted by genscan+  
 AT1G76320 far-red impaired response protein, putative similar to far-red impaired response protein  
 AT2G17740 unknown protein  
 AT1G22870 hypothetical protein predicted by genscan+  
 AT1G51380 hypothetical protein  
 AT5G57020 putative N-myristoyltransferase ; supported by cDNA: gi\_13924515\_gb\_AF250957,1\_AF250957

**19 genes con una respuesta transitoria mediada por cry1 que depende de phyB****Cluster 4 (12 genes)**

AT4G17090 putative beta-amylase ;supported by full-length cDNA: Ceres:36882,  
 AT5G67370 putative protein similar to unknown protein (gb|AAC18972,1); supported by cDNA: gi\_15293188\_gb\_AY051028,1\_  
 AT5G64170 putative protein similar to unknown protein (emb|CAB77570,1)  
 AT5G06770 putative protein contains similarity to unknown protein (dbj|BAA82391,1)  
 AT4G29070 hypothetical protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:249331,  
 AT4G19450 putative protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:100165,

AT4G12310	flavonoid 3,5-hydroxylase -like protein flavonoid 3 ,5 -hydroxylase - Campanula medium, PID:d1003951
AT4G04840	putative protein similar to transcriptional regulator
AT3G26290	cytochrome P450, putative contains Pfam profile: PF00067 cytochrome P450
AT1G70580	putative alanine aminotransferase similar to alanine aminotransferase GB:AAB01685 (Chlamydomonas reinhardtii)
AT1G76080	chloroplast drought-induced stress protein, putative similar to chloroplast drought-induced stress protein
AT2G37720	unknown protein

**7 genes that do not group in cluster 4**

AT5G19330	putative protein VAC8 protein, Saccharomyces cerevisiae, PIR:S50446
AT5G66030	putative protein contains similarity to myosin heavy chain
AT5G65960	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:149624,
AT5G43930	putative protein contains similarity to unknown protein (pir  T00959)
AT3G60600	putative protein VAP27, Nicotiana glauca, EMBL:NPL251365;supported by full-length cDNA: Ceres:19714,
AT4G02480	coded for by A, thaliana cDNA T75804 similar to ATPases associated with various cellular activities
AT2G46550	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 122665,

**B) 26 genes con una respuesta mediada por cry1 que no depende de phyB**

**17 genes con una respuesta persistente mediada por cry1 que no depende de phyB**

**Cluster 5 (10 genes)**

AT5G44750	putative protein contains similarity to DNA-damage-inducible protein P
AT1G49600	DNA binding protein ACBF, putative similar to DNA binding protein ACBF GB:U90212
AT1G48230	unknown protein similar to putative phosphate/phosphoenolpyruvate translocator protein
AT5G42820	U2 snRNP auxiliary factor, small subunit ; supported by cDNA: gi_15723292_gb_AF409140,1_AF409140
AT4G27130	translation initiation factor ; supported by full-length cDNA: Ceres: 5206,
AT4G13940	adenosylhomocysteinase ;supported by full-length cDNA: Ceres:16846,
AT3G54650	F-box protein family, AtFBL17 contains similarity to F-box protein FBL2 GI:6010699 from [Rattus norvegicus]
AT3G06050	unknown protein contains Pfam profile: PF00578 AhpC/TSA
AT2G45050	putative GATA-type zinc finger transcription factor
AT1G75240	hypothetical protein predicted by genemark,hmm;supported by full-length cDNA: Ceres:10873

**7 genes that do not group in cluster 5**

AT4G37150	hydroxynitrile lyase like protein
AT2G35155	unknown protein ; supported by cDNA: gi_16604658_gb_AY059774,1_
AT2G01640	hypothetical protein predicted by genefinder and genscan;supported by full-length cDNA: Ceres:9469,
AT1G24440	unknown protein weak similarity to C3HC4 zinc finger;supported by full-length cDNA: Ceres:156298,
AT1G72990	beta-galactosidase (BGAL), putative similar to beta-galactosidase (BGAL) GI:192186 from [Mus musculus]
AT3G43190	sucrose synthase -like protein SUCROSE SYNTHASE (SUCROSE-UDP GLUCOSYLTRANSFERASE)
AT2G01630	putative beta-1,3-glucanase ;supported by full-length cDNA: Ceres:154469,

**9 genes con una respuesta transitoria mediada por cry1 que no depende de phyB**

**Cluster 6 (5 genes)**

AT2G41120	hypothetical protein predicted by genefinder
AT3G62410	CP12 protein precursor-like protein CP12 protein precursor, chloroplast - Pisum sativum,PIR:T06562
AT3G52360	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:31357,

AT5G24850 DNA photolyase - like protein DNA photolyase - Synechocystis sp., PIR:S74805  
 AT4G27030/A putative protein gene F19K23,12 of BAC F19K23 from Arabidopsis thaliana chromosome 1, PID:g2160143

**4 genes that do not group in cluster 6**

AT5G01020 protein kinase -like protein serine/threonine-specific protein kinase NAK, Arabidopsis thaliana, EMBL:AL162874  
 AT3G58640 putative protein several serine/threonine-specific protein kinases  
 AT5G52190 putative protein similar to unknown protein (sp|P42404);supported by full-length cDNA: Ceres:15004,  
 AT4G33905 Expressed protein ; supported by cDNA: gi\_13358221\_gb\_AF325032,2\_AF325032

**C) 58 genes que no pudieron ser clasificados como dependiente o independiente de phyB**

AT4G33630 hypothetical protein ; supported by cDNA: gi\_16604594\_gb\_AY059742,1\_  
 AT5G18550 zinc finger -like protein zinc finger protein 1, Arabidopsis thaliana, PIR:T48874  
 AT1G80210 hypothetical protein predicted by genscan+  
 AT1G17530 inner mitochondrial membrane protein, putative similar to GB:AAA57314 from [Arabidopsis thaliana]  
 AT1G57600 hypothetical protein contains similarity to cytochrome oxidase subunit GI:440282 from [Ceratomyxa stysracicola]  
 AT4G28290 putative protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:10077,  
 AT1G04300 unknown protein  
 AT5G66100 putative protein similar to unknown protein (pir|T04699)  
 AT5G42760/A putative protein similar to unknown protein (pir|F70811);supported by full-length cDNA: Ceres:111265,  
 AT5G06050 ankyrin-like protein  
 AT2G41710 putative AP2 domain transcription factor pFAM domain (PF00847)  
 AT3G04340 unknown protein C-term similar to cell division protein FTSH GB:P28691 [Escherichia coli]  
 AT4G24840 brefeldin A-sensitive Golgi protein - like brefeldin A-sensitive Golgi protein LDLC, Homo sapiens, PIR2:A53542  
 AT4G20130 hypothetical protein  
 AT1G55870 poly(A)-specific ribonuclease, putative similar to GB:CAA06683 from [Homo sapiens]  
 AT1G27385 Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 39286,  
 AT3G25150 putative RNA-binding protein contains Pfam profile:PF00076 RNA recognition motif  
 AT3G52570 putative protein similarity hypothetical protein T5L19,160 -Arabidopsis thaliana,PIR2:T04007  
 AT5G49570 putative protein contains similarity to peptide:N-glycanase  
 AT1G05160 putative cytochrome P450 Similar to GB:AAC69934  
 AT1G19880 unknown protein  
 AT3G54670 structural maintenance of chromosomes (SMC) - like protein 14S cohesin SMC1 subunit, Xenopus laevis  
 AT3G61860 ARGININE/SERINE-RICH SPLICING FACTOR RSP31  
 AT1G32490 RNA helicase, putative similar to GB:D50487 from [Homo sapiens]  
 AT5G18525 putative protein FACTOR ASSOCIATED WITH N-SMASE ACTIVATION, Homo sapiens  
 AT2G48100 Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 157460,  
 AT3G61240 DEAD box RNA helicase RH12  
 AT3G43610 putative protein gamma-tubulin interacting protein - Xenopus laevis, EMBL:AF052663  
 AT5G05350 putative protein strong similarity to unknown protein (gb|AAF01523,1)  
 AT5G19320 RAN GTPase activating protein 2 ; supported by cDNA: gi\_6708467\_gb\_AF214560,1\_AF214560  
 AT1G79830 unknown protein  
 AT5G19960 glycine-rich RNA-binding protein - like glycine-rich RNA-binding protein (GRRBP2), Euphorbia esula

AT5G12440	putative protein similarity to predicted proteins, Arabidopsis thaliana
AT1G74320	putative choline kinase similar to GB:AAC49376 from [Glycine max]
AT5G15610	putative protein hypothetical protein F14P3,15 - Arabidopsis thaliana, EMBL:AC009755
AT5G28040	putative protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana and Oryza sativa
AT1G02120	unknown protein
AT3G13340	unknown protein contains Pfam profile: PF00400 WD domain, G-beta repeat
AT5G38895	Expressed protein ; supported by cDNA: gi_14334947_gb_AY035147,1_
AT1G05960	unknown protein similar to hypothetical protein GB:AAF80120 GI:8810459 from [Arabidopsis thaliana ]
AT3G11964	hypothetical protein similar to putative pre-rRNA processing protein
AT4G22280	putative protein hypothetical protein, chr,4, Arabidopsis thaliana, PATCHX:G2392763
AT4G28910	putative protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:12759,
AT2G25140	HSP100/ClpB, putative similar to HSP100/ClpB GI:9651530 [Phaseolus lunatus]
AT4G38800	putative protein ; supported by cDNA: gi_13878068_gb_AF370297,1_AF370297
AT4G15630	hypothetical protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 933,
AT4G24520	NADPH-ferrihemoprotein reductase ATR1 ; supported by cDNA: gi_15451215_gb_AY054688,1_
AT3G51660	LS1-like protein AT-LS1 product - Arabidopsis thaliana, EMBL:X58827
AT1G20950	putative pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit similar to GB:AAC67587
AT4G32910	putative protein ; supported by cDNA: gi_13605598_gb_AF361625,1_AF361625
AT1G06900	unknown protein
AT4G22350	putative protein probable membrane protein YFR005c, Saccharomyces cerevisiae, PIR2:S56260
AT5G64930	CPR5 protein, putative Constitutive expressor of Pathogenesis Related genes 5 (cpr5)
AT2G17730	unknown protein contains similarity to C3HC4-type zinc fingers
AT1G26270	hypothetical protein similar to putative ubiquitin GI:4415931 from [Arabidopsis thaliana]
AT2G43970	unknown protein ; supported by cDNA: gi_14194142_gb_AF367277,1_AF367277
AT1G09770	putative DNA-binding protein, Myb Identical to A, thaliana Myb-like protein (gb)D58424)
AT3G12390	nascent polypeptide associated complex alpha chain

**Tabla 2:** Lista de 551 genes en donde la expresión en luz R depende de phyB. Los 32 genes de esta lista que también muestran una respuesta a la luz azul que depende de phyB (Tabla 1, Anexo), están marcados en gris.

### 347 genes where the expression is promoted in *phyB*

AT5G51210	oleosin-like
AT4G13790	SAUR-AC - like protein (small auxin up RNA) SAUR-AC1, Arabidopsis thaliana, S70188
AT4G22490	RCc3- like protein RCc3 protein, Oryza sativa, PIR2:S53012;supported by full-length cDNA: Ceres:270276,
AT1G02800	endo-1,4-beta-glucanase precursor, putative similar to endo-1,4-beta-glucanase precursor
AT4G30650	low temperature and salt responsive protein homolog low temperature and salt responsive protein LTI6A
AT4G29690	nucleotide pyrophosphatase - like protein
AT5G47450	membrane channel protein-like; aquaporin (tonoplast intrinsic protein)-like
AT5G53250	putative protein similar to unknown protein (emb CAB71094,1)
AT5G02580	putative protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:16476,
AT2G34020	unknown protein similar to T14G11,15
AT4G35720	putative protein predicted protein, Arabidopsis thaliana
AT1G16850	unknown protein ; supported by cDNA: gi_13358195_gb_AF325003,2_AF325003
AT4G02290	putative endo-1,4-beta glucanase similar to plant endo-1,4-beta glucanases
AT1G70270	hypothetical protein predicted by genscan+
AT5G01320;	pyruvate decarboxylase-like protein pyruvate decarboxylase (EC 4,1,1,1) pdc1 - Arabidopsis thaliana, PIR:T05315
AT5G53660	putative protein similar to unknown protein (gb AAB63610,1)
AT5G54190	NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A (gb AAC49043,1)
AT5G12940	putative protein DRT100 protein precursor, Arabidopsis thaliana, PIR:A46260
AT1G02340	unknown protein contains similarity to phytochrome interacting factor 3 GI:3929586 from [Arabidopsis thaliana]
AT5G01630;	hypothetical protein
AT1G77330	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, putative similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
AT5G19100	dermal glycoprotein precursor -like protein dermal glycoprotein precursor, extracellular, carrot, PIR:T14329
AT5G60660	mipC protein - like (aquaporin) mipC protein, common ice plant, PIR:T12440;supported by full-length cDNA
AT3G48460	lipase - like protein lipase Arab-1, Arabidopsis thaliana, PIR2:S68410;supported by full-length cDNA: Ceres:13870,
AT4G11610	putative phosphoribosylanthranilate transferase phosphoribosylanthranilate transferase, Pisum sativum, D86180
AT2G04500	unknown protein
AT5G42840	CHP-rich zinc finger protein-like
AT5G65800	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase ACS5 (pir  S71174)
AT1G77200	transcription factor TINY, putative similar to transcription factor TINY GI:1246403 from [Arabidopsis thaliana]
AT3G05890	low temperature and salt responsive protein (LTI6B) identical to low temperature and salt responsive protein (LTI6B)
AT1G15210	putative ABC transporter Similar to gb Z70524 PDR5-like ABC transporter from Spirodela polyrrhiza
AT4G26320	putative protein ; supported by cDNA: gi_10880502_gb_AF195894,1_AF195894
AT3G25290	unknown protein ; supported by cDNA: gi_16323199_gb_AY057704,1_
AT1G02205	hypothetical protein contains similarity to lipid transfer protein GI:498038 from (Senecio odorus)
AT5G15960	cold and ABA inducible protein kin1 ;supported by full-length cDNA: Ceres:2270,
AT2G43050	putative pectinesterase
AT4G29270	acid phosphatase-like protein acid phosphatase-1 (EC 3,1,3,-) - Lycopersicon esculentum,PIR2:T06587

AT3G49360 6-phosphogluconolactonase - like protein 6-phosphogluconolactonase (6PGL ), Homo sapiens  
AT3G63510 putative protein nifR3 protein, Azospirillum brasilense, PIR:I39492;supported by full-length cDNA: Ceres:114107,  
AT5G15290 putative protein many predicted proteins, Arabidopsis thaliana  
AT3G51410 putative protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana  
AT1G75780 tubulin beta-1 chain identical to GB:P12411 GI:135442 from [Arabidopsis thaliana](Gene 63 (1), 87-102 (1988))  
AT4G32460 putative protein mRNAs from Ricinus communis and Medicago sativa, Z81012 and L36159  
AT5G02550 putative protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:7731,  
AT5G10430 AtAGP4 ; supported by cDNA: gi\_13926257\_gb\_AF372885,1\_AF372885  
AT1G69526 Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 33120,  
AT3G14370 putative protein kinase similar to protein kinase homolog GB:AAC78477 from [Arabidopsis thaliana]  
AT1G15550 gibberellin 3 beta-hydroxylase, putative similar to gibberellin 3 beta-hydroxylase GI:3982753  
AT5G44460 calmodulin-like protein  
AT2G32990 putative glucanase  
AT1G70710 endo-1,4-beta-glucanase identical to endo-1,4-beta-glucanase GB:CAA67157 [Arabidopsis thaliana]  
AT1G11545 endo-xyloglucan transferase, putative similar to endo-xyloglucan transferase GI:2244732  
AT1G67750 F12A21,12 similar to pectate lyase like protein emb|CAB41931,1  
AT3G07990 putative serine carboxypeptidase II similar to serine carboxypeptidase II (CP-MII) GB:CAA70815 [Hordeum vulgare]  
AT2G31085 CLE4 CLAVATA3/ESR-Related 4 (CLE4); supported by full-length cDNA: Ceres: 270513,  
AT5G14690 putative protein predicted protein, Arabidopsis thaliana  
AT4G16780 DNA-binding homeotic protein Athb-2 ; supported by cDNA: gi\_166751\_gb\_M90394,1\_ATHHOMEOA  
AT3G63480; serin carboxypeptidase - like protein carboxypeptidase D II-3 precursor, barley, PIR:S44191  
AT5G23530 putative protein contains similarity to unknown protein (gb|AAF27018,1);supported by full-length cDNA: Ceres:9482,  
AT1G07090 unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:28780,  
AT4G22212 Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 113536,  
AT4G28650 receptor protein kinase-like protein receptor-like protein kinase 5, Arabidopsis thaliana, PIR1:S27756  
AT2G44910 homeodomain transcription factor (ATHB-4)  
AT3G45930 Histone H4 - like protein histone H4, Zea mays, PIR:HSZM4;supported by full-length cDNA: Ceres:22146,  
AT5G59010 protein kinase - like serine/threonine/tyrosine-specific protein kinase APK1, Arabidopsis thaliana, PIR:S28615  
AT3G57180 putative protein hypothetical protein - Arabidopsis thaliana, EMBL:AL049523  
AT5G02260 expansin precursor - like protein expansin precursor Exp4, Lycopersicon esculentum, EMBL:AF059488  
AT1G72970 unknown protein contains similarity to mandelonitrile lyase GI:288115 from [Prunus serotina]  
AT5G63650 serine/threonine-protein kinase ;supported by full-length cDNA: Ceres:39888,  
AT1G64640 unknown protein  
AT4G25260 putative protein pectinesterase - Citrus sinensis, PID:g2098705  
AT1G20190 expansin S2 precursor, putative similar to GB:U30460 from [Cucumis sativus]  
AT1G09200 Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 10388,  
AT3G60550 regulatory protein - like regulatory protein preg, Neurospora crassa, PIR:S52974  
AT2G28080 putative glucosyltransferase ; supported by full-length cDNA: Ceres: 13761,  
AT3G52960 peroxiredoxin - like protein peroxiredoxin TPx2, Arabidopsis thaliana, EMBL:AF121356  
AT5G18060 auxin-induced protein-like  
AT5G43390 putative protein strong similarity to unknown protein (emb|CAB86628,1)

AT4G14130 xyloglucan endotransglycosylase-related protein XTR-7 ;supported by full-length cDNA: Ceres:33554,  
AT1G64380 AP2-containing DNA-binding protein contains Pfam profile: PF00847 AP2 domain  
AT3G17840 receptor kinase, putative similar to receptor kinase GB:AAA33715 from [Petunia integrifolia]  
AT4G39460 mitochondrial carrier - like protein AgPET8, Ashbya gossypii, EMBL:AJ006406  
AT4G28720 putative protein dimethylaniline monooxygenase (N-oxide-forming), Sus scrofa domestica, PIR1:A33768  
AT5G01790 putative protein  
AT3G14740 hypothetical protein predicted by genscan+;supported by full-length cDNA: Ceres:98961,  
AT5G07030 nucleoid DNA-binding-like protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:15560,  
AT5G66590 putative protein contains similarity to pathogenesis-related protein;supported by full-length cDNA: Ceres:2152,  
AT4G00810 acidic ribosomal protein p1 similar to acidic ribosomal protein p1;supported by full-length cDNA: Ceres:26442,  
AT1G62610; similar to glucose 1-dehydrogenase (AB000617); similar to EST gb|T88100  
AT5G08000 putative protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana; supported by full-length cDNA: Ceres: 33347,  
AT5G45670 GDSL-motif lipase/hydrolase-like protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:18389,  
AT5G01075 Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 1366,  
AT4G14465 Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 36844,  
AT1G06350 delta 9 desaturase, putative similar to delta 9 desaturase GI:2970034 from [Arabidopsis thaliana]  
AT2G42840 En/Spm-like transposon protein related to En/Spm transposon family of maize  
AT4G37890 putative protein retrotransposon -like protein -Arabidopsis thaliana,PID:e1248853  
AT5G09980 unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 6477,  
AT4G16515 Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 6580,  
AT4G12880 blue copper-binding protein, 15K (lamin) ;supported by full-length cDNA: Ceres:41510,  
AT5G40390 raffinose synthase -like protein raffinose synthase Rfs, Cucumis sativus, EMBL:AF073744  
AT5G48900 pectate lyase non-consensus AG donor splice site at exon 2; supported by full-length cDNA: Ceres: 21311,  
AT4G36110 putative auxin-induced protein high similarity to auxin-induced protein 15A, soybean, PIR2:JQ1096  
AT1G51060 histone H2A, putative similar to histone H2A GI:9758956 from [Arabidopsis thaliana]  
AT5G57180 putative protein similar to unknown protein (pir||T04254)  
AT4G23870 putative protein predicted proteins, Arabidopsis thaliana; supported by cDNA: gi\_15450915\_gb\_AY054538,1\_  
AT3G10620 putative diadenosine 5',5'-P1,P4-tetraphosphate hydrolase  
AT5G24910 cytochrome P450-like protein fatty acid omega-hydroxylase cytochrome P450 4A11  
AT4G39200 ribosomal protein S25 ribosomal protein S25, Lycopersicon esculentum, PIR2:S40089  
AT1G10550 putative endoxyloglucan transferase similar to xyloglucan endotransglycosylase-related protein XTR4 (pir|IS71223)  
AT4G38860 putative auxin-induced protein auxin-induced protein 10A, Glycine max., PIR2:JQ1099  
AT3G12610 leucine rich repeat protein, putative contains multiple LRR repeats Pfam profile: PF00560  
AT5G03300 putative protein ; supported by cDNA: gi\_14596134\_gb\_AY042855,1\_  
AT4G18970 Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 42850,  
AT3G25120 hypothetical protein predicted by genscan+;supported by full-length cDNA: Ceres:19537,  
AT1G53035 Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 271765,  
AT3G07570 unknown protein predicted by genefinder, single est match  
AT1G06850 b-Zip DNA binding protein, putative similar to b-Zip DNA binding protein GB:CAB06697 GI:2246376  
AT2G35760 hypothetical protein predicted by genscan;supported by full-length cDNA: Ceres:9149,  
AT2G23350 putative poly(A) binding protein ; supported by cDNA: gi\_15292850\_gb\_AY050859,1\_



AT1G34110 hypothetical protein contains similarity to receptor protein kinase-like protein GI:10177178 from [Arabidopsis thaliana]  
AT4G34870 peptidylprolyl isomerase (cyclophilin) ;supported by full-length cDNA: Ceres:37,  
AT3G54930 protein phosphatase 2A regulatory subunit B-like protein B regulatory subunit of PP2A, Arabidopsis thaliana  
AT4G16450 hypothetical protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:16090,  
AT5G39320 UDP-glucose dehydrogenase-like protein UDP-glucose dehydrogenase - Glycine max, EMBL:U53418  
AT4G21105 Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 23587,  
AT4G29140 putative protein several hypothetical proteins - Arabidopsis thaliana  
AT1G78050; xylosidase, putative similar to xylosidase GI:2102655 from [Aspergillus niger]  
AT3G03320 unknown protein similar to hypothetical protein GB:BAA29429 [Pyrococcus horikoshii]  
AT1G26650 unknown protein ; supported by cDNA: gi\_14334567\_gb\_AY034957,1\_  
AT2G35120 glycine decarboxylase complex H-protein ; supported by cDNA: gi\_15810183\_gb\_AY056106,1\_  
AT3G08030 unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:27471,  
AT2G36460 putative fructose biphosphate aldolase ;supported by full-length cDNA: Ceres:13024,  
AT5G02190 putative protein CND41, chloroplast nucleoid DNA binding protein - Nicotiana tabacum, EMBL:D26015  
AT2G22900 Expressed protein ; supported by cDNA: gi\_14334701\_gb\_AY035024,1\_  
AT4G08685 Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 1734,  
AT5G59850 cytoplasmic ribosomal protein S15a - like cytoplasmic ribosomal protein S15a, Arabidopsis thaliana  
AT3G61490 putative protein polygalacturonase - Zea mays, EMBL:ZMPGAL3  
AT5G42860 putative protein similar to unknown protein (emb|CAB53482,1)  
AT1G76090 S-adenosyl-methionine-sterol-C-methyltransferase  
AT4G28050 senescence-associated protein -like senescence-associated protein 5, Hemerocallis hybrid cultivar  
AT1G56580 hypothetical protein predicted by genemark,hmm; supported by cDNA: gi\_16648668\_gb\_AY058110,1\_  
AT2G28430 unknown protein ; supported by cDNA: gi\_16648715\_gb\_AY058134,1\_  
AT3G16490 putative calmodulin-binding protein contains Pfam profile: PF00612 IQ calmodulin-binding motif (2 copies)  
AT2G37640 putative expansin  
AT3G10260 unknown protein similar to unknown protein GB:AAC62889 [Arabidopsis thaliana]  
At3g42170 putative transposase hypothetical protein a, maize transposable element Ac - Zea mays, PIR:T02916  
AT3G11250 60S acidic ribosomal protein, putative similar to 60S acidic ribosomal protein P0 GI:2088654 [Arabidopsis thaliana]  
AT3G03250 putative UDP-glucose pyrophosphorylase similar to UDP-glucose pyrophosphorylase  
AT2G45310 putative nucleotide sugar epimerase  
AT4G38580 farnesylated protein (ATFP6) ; supported by full-length cDNA: Ceres: 10238,  
AT3G14220 myrosinase-associated protein, putative similar to myrosinase-associated protein  
AT1G20050 C-8,7 sterol isomerase identical to GB:AAD03489 from [Arabidopsis thaliana]  
AT3G13720 unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:8544,  
AT5G63140 putative protein strong similarity to unknown protein (emb|CAB76911,1)  
AT3G55360 synaptic glycoprotein SC2-like protein synaptic glycoprotein SC2 spliced variant, Homo sapiens  
AT4G19120 putative protein several hypothetical proteins - Arabidopsis thaliana  
AT5G53220 unknown protein  
AT2G01630 putative beta-1,3-glucanase ;supported by full-length cDNA: Ceres:154469,  
AT2G17710 unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:1011,  
AT5G03150 putative protein zinc finger protein, Arabidopsis thaliana, EMBL:AL132953

AT2G31610 40S ribosomal protein; contains C-terminal domain ; supported by cDNA: gi\_14190418\_gb\_AF378887,1\_AF378887  
AT2G24170 putative multispanning membrane protein similar to MURA transposase of maize Mutator transposon  
AT2G35780 putative serine carboxypeptidase II ;supported by full-length cDNA: Ceres:40628,  
AT5G48580 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:143222,  
AT1G54010; myrosinase-associated protein, putative similar to myrosinase-associated protein GI:1769969 from [Brassica napus]  
AT1G09020 hypothetical protein Contains similarity to Rattus AMP-activated protein kinase (gb|X95577)  
AT1G26190 hypothetical protein contains similarity to uridine kinase GI:6899310 from [Ureaplasma urealyticum]  
AT1G01300 chloroplast nucleoid DNA binding protein, putative similar to chloroplast nucleoid DNA binding protein  
AT4G01310 putative L5 ribosomal protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:22919,  
AT5G66420 putative protein similar to unknown protein (sp|P55606); supported by cDNA: gi\_14190422\_gb\_AF378889,1\_AF378889  
AT1G01120 fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase 1 identical to GB:AAC99312 GI:4091810 from [Arabidopsis thaliana]  
AT1G04680 putative pectate lyase A11 similar to GB:CAB36835;supported by full-length cDNA: Ceres:37952,  
AT4G11010 nucleoside diphosphate kinase 3 (ndpk3) ; supported by cDNA: gi\_14334559\_gb\_AY035184,1\_  
AT5G41400 RING zinc finger protein-like ;supported by full-length cDNA: Ceres:207148,  
AT1G76500 unknown protein  
AT4G16442 Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 7632,  
AT3G60070 putative protein hypothetical protein At2g44280 - Arabidopsis thaliana, EMBL:AAC16078  
AT5G53480 Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 2034,  
AT5G23460 unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:29189,  
AT1G63050 unknown protein  
AT1G27400 putative 60S ribosomal protein L17 similar to GB:P51413 from [Arabidopsis thaliana]  
AT1G15100 putative RING-H2 zinc finger protein ESTs gb|N37587, gb|T04684, gb|AA394318, gb|Z35014 and gb|AA713343  
AT3G09820 putative adenosine kinase similar to adenosine kinase GB:CAB40376 [Zea mays]  
AT1G22550 peptide transporter, putative similar to peptide transporter GI:9757725 from [Arabidopsis thaliana]  
AT4G22010 pectinesterase like protein pectinesterase, Lycopersicon esculentum, PATX:E312172  
AT5G22740 glucosyltransferase-like protein ; supported by cDNA: gi\_16648763\_gb\_AY058158,1\_  
AT2G17630 putative phosphoserine aminotransferase  
AT5G10480 putative protein phosphatase protein tyrosine phosphatase-like protein PTPLB, Mus musculus, EMBL:AF169286  
AT4G16390 salt-inducible protein homolog  
AT1G76185 Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 24004,  
AT4G17350 putative protein  
AT1G05205 Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 108558,  
AT1G07750 globulin-like protein similar to GB:7595348 from [Cucumis melo];supported by full-length cDNA: Ceres:40551,  
AT1G80670 mRNA export protein, putative similar to mRNA export protein GB:AAC28126 GI:1903456 from [Homo sapiens]  
AT5G25460 putative protein hypothetical protein - Ricinus communis, EMBL:Z81012;supported by full-length cDNA: Ceres:1351,  
AT5G07110 putative protein prenylated rab acceptor 1 - Homo sapiens, EMBL:AF112202  
AT5G49630 amino acid permease 6 (emb CAA65051,1)  
AT4G18730 ribosomal protein L11, cytosolic ;supported by full-length cDNA: Ceres:2359,  
AT5G46750 zinc finger protein Glo3-like  
AT5G08100 asparaginase ; supported by cDNA: gi\_14517439\_gb\_AY039555,1\_  
AT1G07080 unknown protein ; supported by cDNA: gi\_15146333\_gb\_AY049308,1\_

AT2G46390 unknown protein ; supported by cDNA: gi\_14423471\_gb\_AF386973,1\_AF386973  
AT4G25830 Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 9546,  
AT4G30280; xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase-like protein xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase (EC 3,2,1,-) XTR-3  
AT2G43780 hypothetical protein predicted by genefinder  
AT5G56030; HEAT SHOCK PROTEIN 81-2 (HSP81-2) (sp|P55737)  
AT2G42570 unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 17752,  
AT4G14440 carnitine racemase like protein  
AT4G39300 putative protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:4740,  
AT1G72020 unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 2031,  
AT1G04820 tubulin alpha-2/alpha-4 chain identical to SP:P29510 from [Arabidopsis thaliana]  
AT5G02240 putative protein unknown protein At2g37660 - Arabidopsis thaliana, EMBL:AC004684  
AT1G45130 beta-galactosidase, putative similar to beta-galactosidase GI:3299896 from [Lycopersicon esculentum]  
AT5G57300 ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase-like ; supported by cDNA: gi\_15293010\_gb\_AY050939,1\_  
AT1G02180 hypothetical protein predicted by genemark,hmm  
AT3G44530 WD repeat domain protein nuclear protein HIRA, mouse, PIR:S68141  
AT1G75390 bZIP transcription factor ATB2, putative similar to GB:CAA18838 from [Arabidopsis thaliana]  
AT3G25220 immunophilin (FKBP15-1) identical to immunophilin (FKBP15-1) GB:U52046 [Arabidopsis thaliana]  
AT1G11390 similar to hypothetical 62,8 KD protein in SSE1-CAR1 intergenic region sp|Q02981  
AT1G76200 unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 20257,  
AT1G69680 hypothetical protein predicted by genefinder;supported by full-length cDNA: Ceres:40460,  
AT3G59900 putative protein hypothetical protein At2g44080 - Arabidopsis thaliana, EMBL:AC004005  
AT3G07810 putative RNA-binding protein contains Pfam profile: PF00076 RNA recognition motif  
AT3G51970 wax synthase-like protein wax synthase - Simmondsia chinensis, PID:g5020219  
AT5G22730 unknown protein  
AT4G00820 hypothetical protein  
AT4G37740 putative protein predicted proteins, Arabidopsis thaliana  
AT2G20820 unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 91872,  
AT5G28300 GTL1 - like protein GTL1, Arabidopsis thaliana, EMBL:ATAJ3215  
AT1G80230 cytochrome c oxidase subunit, putative similar to cytochrome c oxidase subunit Vb GI:1841354 from [Oryza sativa]  
AT4G27320 putative protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 10313,  
AT1G31850 unknown protein  
AT3G43720 lipid-transfer protein-like protein nonspecific lipid transfer protein, loblolly pine, PIR:S51816  
AT1G77260 hypothetical protein similar to ankyrin like protein GI:7268141 from [Arabidopsis thaliana]  
AT3G46030 histone H2B -like protein histone H2B1, upland cotton, PIR:T09722;supported by full-length cDNA: Ceres:10517,  
AT5G35160 putative protein p76, Homo sapiens, EMBL:HSU81006  
AT2G02050 unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 39285,  
AT1G30330 auxin response factor 6 (ARF6) identical to ARF6 [Arabidopsis thaliana]  
AT3G11750 putative dihydroneopterin aldolase similar to dihydroneopterin aldolase GB:P28823 [Bacillus subtilis]  
AT1G06500 hypothetical protein predicted by genemark,hmm;supported by full-length cDNA: Ceres:7311,  
AT1G73120 hypothetical protein predicted by genefinder  
AT1G79550 phosphoglycerate kinase, putative similar to phosphoglycerate kinase GI:1161601 from [Nicotiana tabacum]

AT3G44320 nitrilase 3 ;supported by full-length cDNA: Ceres:36242,  
 AT1G15710 embryo abundance protein (EMB20), putative similar to embryo abundance protein (EMB20)  
 AT3G16200 unknown protein  
 AT3G55260 beta-N-acetylhexosaminidase -like protein various beta-N-acetylhexosaminidases  
 AT3G22630 multicatalytic endopeptidase complex, proteasome component, beta subunit identical to GB:CAA74026  
 AT4G10560 putative protein other hypothetical proteins in Arabidopsis thaliana  
 AT1G20900 putative DNA-binding protein similar to GB:CAA16566 and the location of ESTs 11515T7, gb|T43108 and H2A10T7  
 AT1G27950 lipid transfer protein, putative contains Pfam profile: PF00279: Plant lipid transfer protein family  
 AT4G34700 putative protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 18715,  
 AT5G07960 putative protein PTD008, Homo sapiens, EMBL:AF078861;supported by full-length cDNA: Ceres:226,  
 AT1G14450 hypothetical protein contains similarity to cytochrome c oxidase subunit I GI:5678701 from [Loligo pealei]  
 AT3G17820 glutamine synthetase, putative similar to Gln synthetase GB:228456 from [Arabidopsis thaliana]  
 AT4G13890 glycine hydroxymethyltransferase - like protein glycine hydroxymethyltransferase, Homo sapiens, PIR2:A46746  
 AT1G22700 unknown protein contains similarity to ycf37 gene product gb|1001425 from Synechocystis sp  
 AT5G20010 RAN1 small Ras-like GTP-binding nuclear protein (Ran-1) ;supported by full-length cDNA: Ceres:9480,  
 AT1G77610 unknown protein similar to phosphate translocators: glucose-6-phosphate/phosphate-translocator precursor  
 AT5G18520 putative protein predicted proteins, Arabidopsis thaliana  
 AT3G23820 NAD dependent epimerase, putative contains Pfam profile: PF01370 NAD dependent epimerase/dehydratase family  
 AT1G27190 receptor kinase, putative similar to CLV1 receptor kinase GB:AAB58929 GI:2160756 from [Arabidopsis thaliana]  
 AT1G79390 hypothetical protein predicted by genscan+; supported by cDNA: gi\_13265441\_gb\_AF324674,2\_AF324674  
 AT4G12650 putative protein KIAA0255 gene, Homo sapiens, gb:D87444  
 AT2G45050 putative GATA-type zinc finger transcription factor  
 AT1G13280 allene oxide cyclase, putative similar to allene oxide cyclase GI:8977961 from [Lycopersicon esculentum]  
 AT1G09870 unknown protein EST gb|R64758 comes from this gene; supported by cDNA: gi\_15450400\_gb\_AY052301,1\_  
 AT4G16360 kinase like protein ; supported by cDNA: gi\_13430671\_gb\_AF360248,1\_AF360248  
 AT5G60300 receptor like protein kinase receptor like protein kinase, Arabidopsis thaliana, EMBL:AL138657  
 AT1G55190 hypothetical protein predicted by genemark,hmm;supported by full-length cDNA: Ceres:21940,  
 AT1G27450 adenine phosphoribosyltransferase 1, APRT identical to GB:P31166; similar to ESTs  
 AT4G02510 putative chloroplast outer envelope 86-like protein similar to P, sativum outer envelope 86 protein OEP86  
 AT3G01360 hypothetical protein predicted by genscan  
 AT1G16860 unknown protein contains similarity to merozoite surface protein 2 (MSP-2) GI:1657451 from [Plasmodium falciparum]  
 AT1G08480 unknown protein ; supported by cDNA: gi\_15450426\_gb\_AY052314,1\_  
 AT3G52730 ubiquinol--cytochrome-c reductase-like protein ubiquinol--cytochrome-c reductase, 8K chain, potato, PIR:T07369  
 AT2G33040 mitochondrial F1-ATPase, gamma subunit (ATP3\_ARATH) ;supported by full-length cDNA: Ceres:26812,  
 AT4G29130 hexokinase ; supported by cDNA: gi\_8567421\_gb\_U18754,2\_ATU18754  
 AT3G60080 putative protein COP1-interacting protein CIP8 - Arabidopsis thaliana, EMBL:AF162150  
 AT3G29575 hypothetical protein  
 AT4G18800 ras-like GTP-binding protein strong homology to GTP-binding protein ric2, Oryza sativa, S38741  
 AT1G63840 putative RING zinc finger protein Pfam HMM hit: zinc finger, C3HC4 type (RING finger)  
 AT4G38510 probable H<sup>+</sup>-transporting ATPase H<sup>+</sup>-transporting ATPase (EC 3,6,1,35) 57K chain - Arabidopsis thaliana  
 AT5G13450 delta subunit of mitochondrial F1-ATPase ; supported by cDNA: gi\_14190494\_gb\_AF380647,1\_AF380647

AT5G18280 apyrase (gb|AAF00612,1) ; supported by cDNA: gi\_6006800\_gb\_AF156783,1\_AF156783  
AT1G01970 hypothetical protein predicted by genemark,hmm  
AT2G24590 putative RSZp22 splicing factor  
AT3G27580 serine/threonine-protein kinase, PK7 identical to GB:Q05999 from [Arabidopsis thaliana]  
AT2G41760 unknown protein ; supported by cDNA: gi\_14335091\_gb\_AY037225,1\_  
AT4G20150 putative protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:29133,  
AT4G14960 tubulin alpha-6 chain (TUA6) ; supported by cDNA: gi\_16226461\_gb\_AF428406,1\_AF428406  
AT4G39860 putative protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:15747,  
AT5G67360 subtilisin-like serine protease ARA12 almost identical to cucumisin-like serine protease (ARA12) GI:3176874  
AT2G30050 putative protein transport protein SEC13 ;supported by full-length cDNA: Ceres:36577,  
AT1G71780 unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 25541,  
AT1G76760 thioredoxin-like protein similar to thioredoxin CH2, M-type, chloroplast precursor GB:P23400  
AT1G15120 putative ubiquinol--cytochrome-c reductase  
AT2G27730 unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 3359,  
AT1G26850 unknown protein Location of ESTs 108M14T7, gb|T41823 and 108M14XP 3 , gb|AA395002  
AT5G50350 unknown protein  
AT5G36230 putative protein strong similarity to unknown protein (gb|AAD26879,1)  
AT4G32930 putative protein predicted protein, Caenorhabditis elegans, gb:Z70780;supported by full-length cDNA: Ceres:8739,  
AT3G52930 fructose biphosphate aldolase - like protein fructose biphosphate aldolase, garden pea, PIR:S58167  
AT1G24050 unknown protein  
AT3G08610 unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 9458,  
AT3G03780 putative methionine synthase similar to cobalamin-independent methionine synthase GB:AAC50037  
AT3G51620 putative protein predicted protein, Arabidopsis thaliana  
AT3G07480 unknown protein HMM hit: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain;supported by full-length cDNA: Ceres:29120,  
AT1G36160 hypothetical protein putative acetyl-CoA carboxylase (partial) dbj|BAA07012  
AT1G78560 unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:41311,  
AT3G26420; RNA-binding protein, putative similar to RNA-binding protein (RZ-1) GB:BAA12064 [Nicotiana sylvestris]  
AT5G41600 putative protein contains similarity to 24 kDa seed maturation protein  
AT3G57870 E2 ubiquitin-conjugating-like enzyme Ahus5 ; supported by cDNA: gi\_14596100\_gb\_AY042838,1\_  
AT2G30460 putative integral membrane protein  
AT1G09250 unknown protein ESTs gb|T04610, gb|N38459, gb|T45174, gb|R30481 and gb|N64971 come from this gene  
AT4G23640 putative potassium transport protein (TRH1) high-affinity potassium transport protein KUP1, Arabidopsis thaliana  
AT4G00860 stress-induced protein OZI1 precursor ; supported by cDNA: gi\_790582\_gb\_U20347,1\_ATU20347  
AT5G18800 NADH:ubiquinone oxidoreductase - like protein NADH:ubiquinone oxidoreductase PGIV subunit, Homo sapiens  
AT3G56800 calmodulin-3 ;supported by full-length cDNA: Ceres:16715,  
AT3G62700 ABC transporter-like protein glutathione-conjugate transporter AtMRP4 - Arabidopsis thaliana, EMBL:AJ002584  
AT5G52840 unknown protein ; supported by cDNA: gi\_15809965\_gb\_AY054251,1\_  
AT2G23310 putative integral membrane protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:25204,  
AT5G47030 ATP synthase delta chain, mitochondrial precursor (sp|Q96252)  
AT5G10840; putative protein KIAA0255 gene, Homo sapiens, EMBL:HSD444  
AT5G10630 putative protein KIAA1038 protein, Homo sapiens, AB028961

AT3G12030	unknown protein similar to membrane protein GB:BAA86974 GI:6467175 from [Homo sapiens]
AT1G13060	proteasome epsilon chain precursor identical to GB:O23717;supported by full-length cDNA: Ceres:33591,
AT3G03050	putative cellulose synthase catalytic subunit similar to cellulose synthase catalytic subunit GB:AAD40885
AT3G01280	putative porin similar to outer mitochondrial membrane porin (voltage-dependent anion-selective channel protein)
AT2G26510	putative membrane transporter ; supported by cDNA: gi_13877634_gb_AF370518,1_AF370518
AT1G09570	putative phytochrome A similar to GB:AAA21351; supported by cDNA: gi_14517371_gb_AY039520,1_
AT1G27310	putative nuclear transport factor similar to nuclear transport factor 2 (NTF2) from [Oryza sativa], GB:BAA81910
AT3G02090	putative mitochondrial processing peptidase similar to mitochondrial processing peptidase
AT5G43940	alcohol dehydrogenase (EC 1,1,1,1) class III (pir  S71244) ;supported by full-length cDNA: Ceres:33315,
AT5G15230	GASA4 ; supported by cDNA: gi_950098_gb_U15683,1_ATU15683
AT5G49460	ATP citrate lyase ; supported by cDNA: gi_14334787_gb_AY035067,1_
AT3G25140	glycosyl transferase, putative contains Pfam profile: PF01501 glycosyl transferase family 8
AT3G15730	putative phospholipase D similar to phospholipase D1 GB:AAC78487 [Brassica oleracea]
AT4G14800	proteasome chain protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 24266,
AT2G17380	clathrin assembly protein AP19, small subunit no ATG at start site position
AT5G54750	transport protein particle component Bet3p-like protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:122866,
AT4G24820	putative proteasome regulatory subunit KIAA0107 gene, Homo sapiens, D14663
AT5G11280	putative protein ; supported by cDNA: gi_15028030_gb_AY045872,1_
AT3G10850	hydroxyacylglutathione hydrolase cytoplasmic (glyoxalase II) (GLX II)
AT1G20200	proteasome regulatory subunit S3, putative similar to SP:P93768 from [Nicotiana tabacum]
AT1G12840	vacuolar ATP synthase subunit C, putative similar to GB:AAF20146 from [Arabidopsis thaliana]
AT5G67590	putative protein contains similarity to NADH dehydrogenase chain CI-18;supported by full-length cDNA: Ceres:28455,
AT5G42790	20S proteasome subunit PAF1 (gb AAC32062,1) ; supported by full-length cDNA: Ceres: 12455,
<b>205 genes where the expression is repressed in <i>phyB</i></b>	
AT3G59380	farnesyltransferase subunit A (FTA) ; supported by cDNA: gi_3142697_gb_AF064542,1_AF064542
AT1G55150	ethylene-responsive RNA helicase, putative similar to ethylene-responsive RNA helicase GI:5669638
AT5G57940	cyclic nucleotide and calmodulin-regulated ion channel (emb CAB40130,1)
AT3G15460	unknown protein very similar to unknown protein GB:AAC39468 from [Arabidopsis thaliana]
AT5G32450	putative protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana and others
AT3G28730	recombination signal sequence recognition protein, (SSRP1)
AT4G32910	putative protein ; supported by cDNA: gi_13605598_gb_AF361625,1_AF361625
AT1G79040	photosystem II polypeptide, putative similar to photosystem II polypeptide GI:967967 from [Brassica rapa]
AT4G15560	DEF (CLA1) protein ; supported by cDNA: gi_14334451_gb_AY034917,1_
AT5G49820	putative protein contains similarity to unknown protein (gb AAD20664,1)
AT1G06530	hypothetical protein
AT4G37210	putative protein ; supported by cDNA: gi_13877852_gb_AF370189,1_AF370189
AT5G16990	quinone oxidoreductase - like protein probable quinone oxidoreductase (EC 1,6,5,5) P1
AT4G29500	X-Pro dipeptidase - like protein (fragment) X-Pro dipeptidase, Homo sapiens, PIR2:A32454
AT5G20620	polyubiquitin (UBQ4) identical to GI:17677
AT3G46640	putative protein several hypothetical proteins - Arabidopsis thaliana
AT3G28970	unknown protein

AT1G56280 unknown protein ; supported by cDNA: gi\_15028022\_gb\_AY045868,1\_  
 AT1G64720 membrane related protein CP5, putative similar to membrane related protein CP5 GI:4741929  
 AT5G20610 putative protein predicted protein, Plasmodium falciparum  
 AT1G23310 putative alanine aminotransferase similar to alanine aminotransferase GB:BAA77260 GI:4730884  
 AT2G28910 unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 948,  
 AT1G18160 MAP kinase, putative similar to MAP3K delta-1 protein kinase GI:2253010 from [Arabidopsis thaliana]  
 AT1G78420 unknown protein ; supported by cDNA: gi\_16604612\_gb\_AY059751,1\_  
 AT5G49580 putative protein contains similarity to unknown protein (pir|T01052)  
 AT5G02840 putative protein various Myb related proteins, Arabidopsis thaliana  
 AT5G66030 putative protein contains similarity to myosin heavy chain  
 AT2G42700 unknown protein  
 AT2G30590 unknown protein ; supported by cDNA: gi\_13507098\_gb\_AF272747,1\_AF272747  
 AT1G80440 unknown protein contains two Kelch motifs; supported by full-length cDNA: Ceres: 32885,  
 AT1G20560 hypothetical protein ; supported by cDNA: gi\_13937176\_gb\_AF372942,1\_AF372942  
 AT2G28540 unknown protein  
 AT5G63190 topoisomerase-like protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:19433,  
 AT1G09060 hypothetical protein Similar to Vicia sativa ENBP1 (gb|X95995  
 AT3G54690 sugar-phosphate isomerase - like protein gutq/kpsf family sugar-p isomerase, Chlamydia pneumoniae, PIR:E72068  
 AT2G46550 unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 122665,  
 AT1G53320 unknown protein contains similarity to tub homolog GI:2072160 from [Homo sapiens]  
 AT5G03370 putative protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 39035,  
 AT5G63940 putative protein contains similarity to protein kinase  
 AT3G03880 hypothetical protein  
 AT5G61410 ribulose-5-phosphate-3-epimerase ; supported by cDNA: gi\_15027996\_gb\_AY045855,1\_  
 AT2G32150 putative hydrolase ; supported by cDNA: gi\_15982855\_gb\_AY057535,1\_  
 AT4G36650 transcription initiation factor like protein  
 AT5G19330 putative protein VAC8 protein, Saccharomyces cerevisiae, PIR:S50446  
 AT1G70310 spermidine synthase, putative similar to spermidine synthase GI:4138109 from [Lycopersicon esculentum]  
 AT2G36960 hypothetical protein predicted by genscan  
 AT2G34690 unknown protein  
 AT1G63360; NBS/LRR disease resistance protein, putative similar to NBS/LRR disease resistance protein GB:AAC26125  
 AT2G34770 fatty acid hydroxylase (FAH1) identical to GB:AF021804; supported by cDNA: gi\_15215595\_gb\_AY050326,1\_  
 AT2G35260 unknown protein ; supported by cDNA: gi\_13605586\_gb\_AF361619,1\_AF361619  
 AT1G71800 cleavage stimulation factor, putative similar to cleavage stimulation factor 64 kilodalton subunit GB:AAD47839  
 AT1G21640 unknown protein Similar to gb|X84260 POS5 gene product from Saccharomyces cerevisiae  
 AT3G18270 unknown protein contains Pfam profile: PF01188 Mandelate racemase/muconate lactonizing enzyme family  
 AT5G42660 putative protein similar to unknown protein (gb|AAC32911,1); supported by full-length cDNA: Ceres: 117056,  
 AT1G26830 unknown protein similar to cell differentiation protein GB:AAC36682 from (Homo sapiens)  
 AT5G08340 putative protein farnesyl cysteine carboxyl methyltransferase, Rattus norvegicus, EMBL:AF075595  
 AT3G27770 unknown protein ; supported by cDNA: gi\_16974601\_gb\_AY060578,1\_  
 AT4G18700 putative protein kinase ; supported by cDNA: gi\_13249122\_gb\_AF295667,1\_AF295667

AT3G48990	4-coumarate-CoA ligase -like protein 4-coumarate-CoA ligase enzyme, Pinus taeda, gb:AAA92669
AT5G24800	transcription factor-like protein light-induced protein CPRF-2 - Petroselinum crispum, PIR:S16321
AT1G05890	unknown protein
AT5G48340	unknown protein
AT2G26430	putative cyclin ;supported by full-length cDNA: Ceres:22595,
AT4G16155	Expressed protein ; supported by cDNA: gi_15292886_gb_AY050877,1_
AT3G12360	ankyrin-like protein contains Pfam profile: PF00023 Ank repeat; supported by full-length cDNA: Ceres: 153785,
AT2G20670	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:34827,
AT2G01860	hypothetical protein predicted by genscan and genefinder
AT4G36550	putative protein
AT1G14510	nucleic acid binding protein (alfin-1), putative similar to nucleic acid binding protein (alfin-1) GI:166409
AT4G37200	thiol-disulfide interchange like protein
AT5G40740	putative protein ; supported by cDNA: gi_14532693_gb_AY039971,1_
AT5G02810	putative protein ABI3-interacting protein, Arabidopsis thaliana, EMBL:ATH251086
AT1G73680	feebly-like protein similar to feebly protein GB:S70648 [Lycopersicon esculentum]
AT5G36160	putative protein tyrosine aminotransferase-like; also similar to nicotianamine aminotransferase
AT5G59080	putative protein
AT4G35230	putative protein protein kinase APK1, Arabidopsis thaliana, PIR2:S28615
AT1G65840	polyamine oxidase, putative similar to polyamine oxidase SP:O64411 [Zea mays (Maize)]
AT1G13960	putative DNA-binding protein similar to WKRY DNA-binding protein GB:AAD17441
AT3G26070	unknown protein
AT2G45850	putative AT-hook DNA-binding protein ; supported by cDNA: gi_14194130_gb_AF367271,1_AF367271
AT2G24530	hypothetical protein predicted by genefinder
AT5G49650	xylulose kinase ; supported by cDNA: gi_15292818_gb_AY050843,1_
AT1G76100	plastocyanin identical to plastocyanin GI:1865683 from [Arabidopsis thaliana]
AT3G29310	hypothetical protein predicted by genscan+
AT3G15820	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 21882,
AT5G37360	putative protein
AT3G19860	putative myc-like DNA-binding protein similar to GB:AAB72192 from [Arabidopsis thaliana]
AT1G68370	ARG1 protein (Altered Response to Gravity) identical to GB:AAD13758
AT1G52590	hypothetical protein predicted by genemark,hmm;supported by full-length cDNA: Ceres:463,
AT5G28840	epimerase/dehydratase - like protein dTDP-glucose 4-6-dehydratase homolog D18, Arabidopsis thaliana, PIR:S58282
AT1G54140	transcriptional activation factor TAFII32, putative similar to transcriptional activation factor TAFII32 GI:841307
AT5G48655	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 12974,
AT1G11350	serine/threonine kinase, putative similar to serine/threonine kinase GI:2181189 from [Brassica oleracea]
AT5G47580	putative protein strong similarity to unknown protein (pir  E71441); supported by cDNA: gi_16974604_gb_AY060580,1
AT5G52630	selenium-binding protein-like
AT5G03470	putative protein ; supported by cDNA: gi_2160689_gb_U73526,1_ATU73526
AT3G12140	unknown protein
AT1G32540	zinc-finger protein, putative similar to GI:5262161 from [Arabidopsis thaliana]
AT5G56240	unknown protein

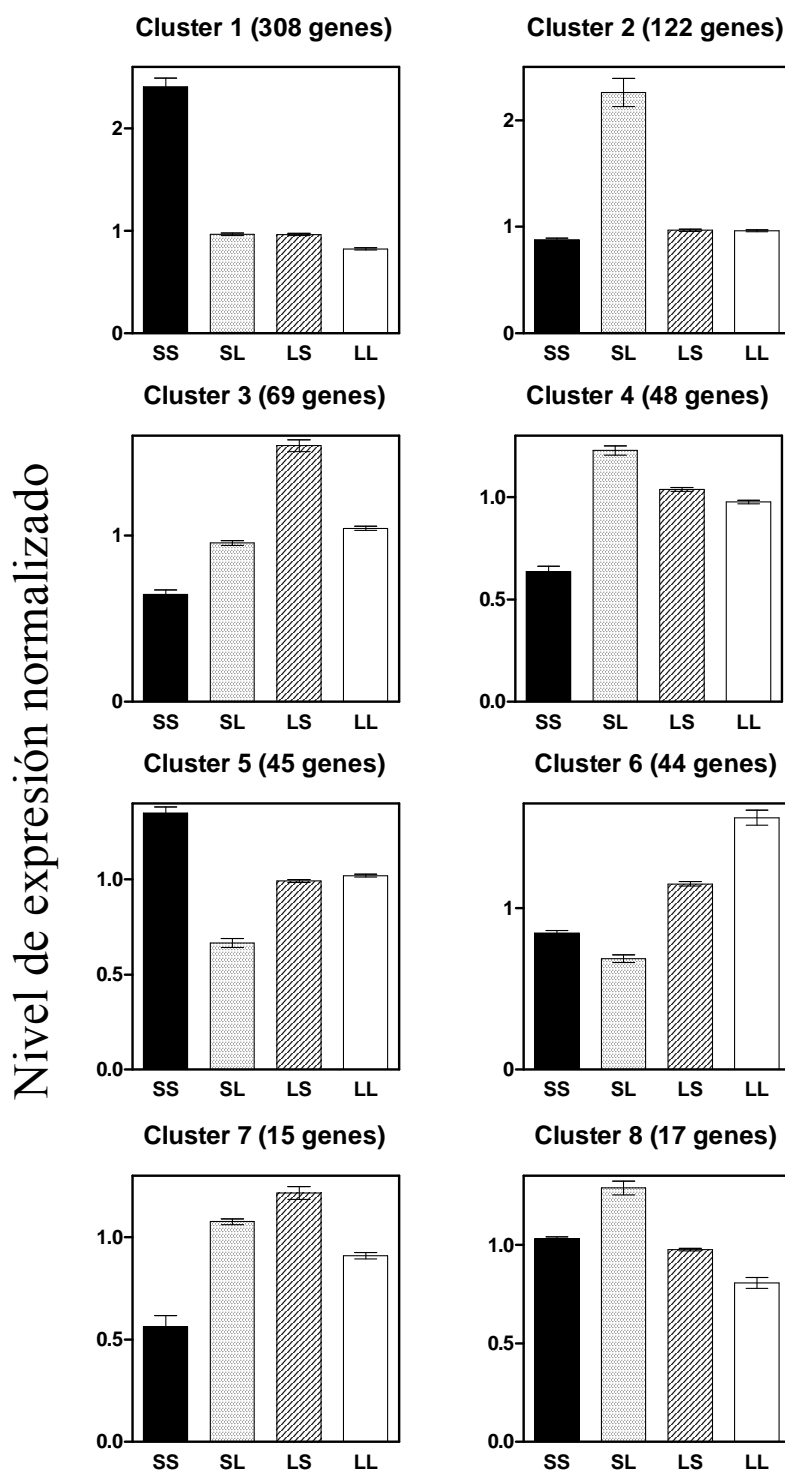


AT1G26580	hypothetical protein similar to putative MYB family transcription factor GB:AAD17429 GI:4335752
AT5G14370	putative protein predicted proteins, Arabidopsis thaliana;supported by full-length cDNA: Ceres:19906,
AT1G28540	hypothetical protein predicted by genemark,hmm; supported by full-length cDNA: Ceres: 29823,
AT1G05020	clathrin protein family Similar to clathrin assembly protein gb X68878 (AP180) from Rattus norvegicus
AT1G45150	hypothetical protein predicted by genemark,hmm
AT1G54520	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:13758,
AT5G13770	putative protein similar to unknown protein (emb CAB69839,1)
AT3G51000	epoxide hydrolase-like protein epoxide hydrolase homolog - Glycine max, PIR:T07145
AT1G03300	unknown protein Strong similarity to T08113,7 gi 2275201 unknown protein from Arabidopsis thaliana BAC
AT4G17330	G2484-1 protein
AT2G15580	putative RING-H2 zinc finger protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:7201,
AT3G01200	unknown protein
AT1G76990	unknown protein similar to putative uridylyl transferase GI:4406764 from [Arabidopsis thaliana]
AT2G17500	hypothetical protein predicted by genefinder; supported by cDNA: gi_14423545_gb_AF387010,1_AF387010
AT2G45100	putative transcription factor IIIB 70 KD subunit (TFIIIB)
AT3G15070	RING zinc finger protein, putative contains Pfam profile: PF00097 zinc finger, C3HC4 type (RING finger)
AT1G75410	homeodomain protein BELL1, putative similar to GB:AAB05099 from [Arabidopsis thaliana] (Cell 83 (5), 735-742 (1987))
AT3G19030	hypothetical protein contains similarity to phosphoserine aminotransferase GB:P19689 from [Yersinia enterocolitica]
AT4G08930	putative protein disulfide isomerase
AT2G21120	unknown protein
AT1G27840	hypothetical protein contains similarity to cockayne syndrome complementation group A protein GB:U28413 GI:975301
AT1G01740	protein kinase, putative similar to protein kinase GB:BAA24694 GI:2852447 from [Arabidopsis thaliana]
AT2G14910	unknown protein
AT3G46540	putative protein mitotic phosphoprotein 90 - Xenopus laevis, EMBL:U95102
AT3G63500	putative protein predicted protein, Arabidopsis thaliana
AT3G60300	putative protein RING finger protein AO7, Mus musculus, EMBL:AF171060
AT3G53930	putative protein serine/threonine-specific protein kinase ULK1 - Mus musculus,PIR:JW0051
AT3G20280	hypothetical protein contains Pfam profile: PF00628 PHD-finger
AT3G61260	putative DNA-binding protein DNA-binding protein (dbp) - Arabidopsis thaliana, EMBL:ATDNABP
AT3G24140	helix-loop-helix DNA-binding protein contains Pfam profile: PF00010 Helix-loop-helix DNA-binding domain
AT5G50450	putative protein strong similarity to unknown protein (gb AAB95234,1)
AT5G49360	xylosidase
AT4G11570	putative protein beta-phosphoglucomutase - Lactobacillus sanfrancisco,PID:e1331347
AT3G59060	putative protein phytochrome-associated protein 3 - Arabidopsis thaliana, EMBL:AF088280
AT1G55080	hypothetical protein predicted by genemark,hmm
AT1G19485	hypothetical protein contains Pfam profile: PF00730 HhH-GPD superfamily base excision DNA repair protein
AT2G23760	putative homeodomain transcription factor ; supported by cDNA: gi_13877512_gb_AF353092,1_AF353092
AT3G57470	protease-like protein INSULIN-DEGRADING ENZYME - Rattus norvegicus, SWISSPROT:P35559
AT3G59410	protein kinase like GCN2 - Saccharomyces cerevisiae, EMBL:M27082
AT4G22753	predicted protein predicted protein ERG25, Saccharomyces cerevisiae, PIR2:S64354
AT1G59960	NADPH-dependent codeinone reductase, putative similar to NADPH-dependent codeinone reductase GI:6478210

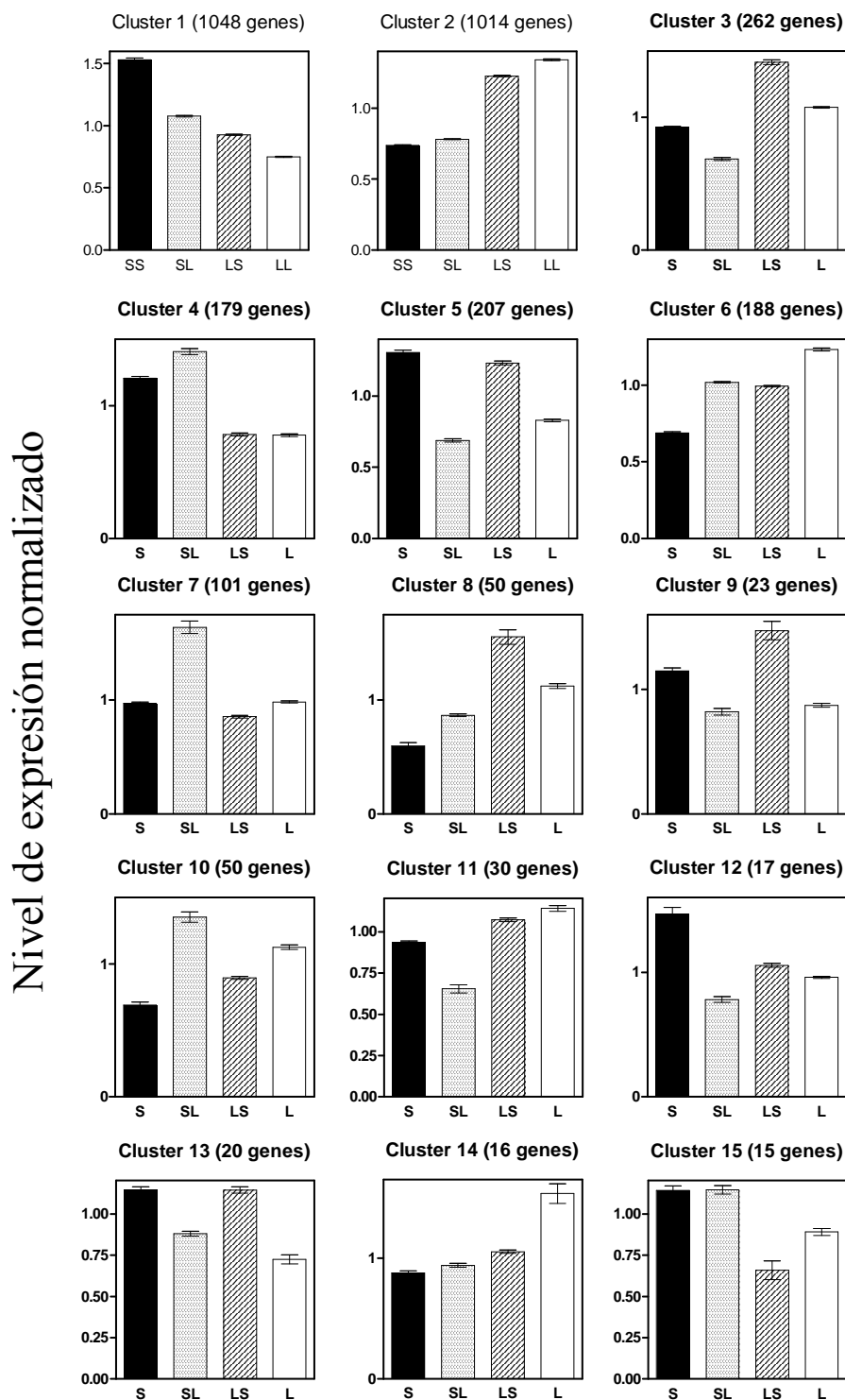
AT4G28610	putative protein WREBP-1, <i>Nicotiana tabacum</i> , EMBL:AB017693
AT1G25540	hypothetical protein similar to putative phloem transcription factor GI:7630279 from [ <i>Apium graveolens</i> ]
AT1G67970	putative heat shock transcription factor contains Pfam profile: PF00447 HSF-type DNA-binding domain
AT2G43520	putative trypsin inhibitor ;supported by full-length cDNA: Ceres:15927,
AT4G24050	putative protein CGI-82 protein - <i>Homo sapiens</i> ,PID:g4929633
AT5G04480	putative protein predicted protein, <i>Arabidopsis thaliana</i> ; supported by cDNA: gi_15450502_gb_AY052353,1_
AT4G37300	putative protein ; supported by cDNA: gi_14517511_gb_AY039591,1_
AT2G16700	actin depolymerizing factor 5 ;supported by full-length cDNA: Ceres:26940,
AT2G23420	unknown protein
AT4G00750	hypothetical protein
AT4G29940	pathogenesis related homeodomain protein (PRHA) ; supported by cDNA: gi_507219_gb_L21991,1_ATHPRHA
AT1G03400	putative 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
AT1G49720	abscisic acid responsive elements-binding factor identical to abscisic acid responsive elements-binding factor
AT3G63070	putative protein putative transcription factor HUA2, <i>Arabidopsis thaliana</i> , EMBL:AF116556
AT1G05010	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase Identical to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACC oxidase)
AT1G30810	hypothetical protein similar to Human XE169 protein (gi 3033385); similar to EST gb T88128
AT5G05140	putative protein contains similarity to unknown protein (gb AAF19567,1)
AT5G13010	pre-mRNA splicing factor ATP-dependent RNA helicase -like protein
AT1G68520	putative B-box zinc finger protein contains Pfam profile: PF00643 B-box zinc finger
AT1G48760	delta-adaptin, putative similar to delta-adaptin GI:2290770 from [ <i>Homo sapiens</i> ]
AT3G48360	putative protein MEL-26, <i>Caenorhabditis elegans</i> , U67737; supported by cDNA: gi_14532781_gb_AY040015,1_
AT1G75730	hypothetical protein predicted by genemark,hmm
AT2G25200	hypothetical protein predicted by grail
AT1G71080	unknown protein ; supported by cDNA: gi_16974549_gb_AY060562,1_
AT4G10920	putative protein RNA polymerase II transcription cofactor p15, <i>Homo sapiens</i> , PIR2:A54670
AT2G30600	unknown protein
AT3G04750	hypothetical protein similar to hypothetical proteins GB:AAC35225, GB:AAD22358, GB:AAD22682
AT3G15850	putative delta 9 desaturase similar to delta 9 desaturase GB:BAA25180 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
AT2G24520	putative plasma membrane proton ATPase
AT1G79430	transfactor, putative similar to transfactor GI:4519671 from [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
AT3G43190	sucrose synthase -like protein SUCROSE SYNTHASE (SUCROSE-UDP GLUCOSYLTRANSFERASE)
AT2G42750	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:15743,
AT4G14480	kinase like protein
AT2G30500	unknown protein
AT1G59650	unknown protein ; supported by cDNA: gi_6520232_dbj_AB028233,1_AB028233
AT2G24820	hypothetical protein predicted by genscan
AT5G67480	putative protein strong similarity to unknown protein (pir T04718); supported by cDNA: gi_15529177_gb_AY052213,1
AT2G32250	Mutator-like transposase similar to MURA transposase of maize Mutator transposon
AT2G42280	unknown protein similar to GP 2262147 AC002330
AT3G06080	unknown protein identical to unknown protein GB:AAF30301 from [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
AT2G01100	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 39741,

AT3G15620 6-4 photolyase (UVR3) identical to 6-4 photolyase (UVR3) GB:AB003687 [Arabidopsis thaliana]  
AT4G38750 hypothetical protein  
AT3G20300 unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:124193,  
AT1G68830 putative protein kinase Pfam HMM hit: Eukaryotic protein kinase domain  
AT5G51840 unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:36309,  
AT3G47250 putative protein various predicted genes, Arabidopsis thaliana and Oryza sativa  
AT1G80420 putative DNA repair protein similar to DNA repair protein XRCC1 GB:AAC40038 from (Cricetulus griseus)  
AT5G16030 putative protein with poly glutamic acid stretch hypothetical protein F16B3,13 - Arabidopsis thaliana  
AT4G37800 endo-xyloglucan transferase - like protein endo-xyloglucan transferase, Gossypium hirsutum, D88413  
AT4G33980 putative protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:8161,  
AT1G75880 anter-specific proline-rich -like protein (APG-like) similar to anter-specific proline-rich protein (APG) SP:P40602  
AT3G19290 abscisic acid responsive elements-binding factor almost identical (one amino acid) to GB:AAF27182  
AT1G25550 hypothetical protein similar to putative two-component response regulator protein GI:6623883  
AT1G37130 nitrate reductase, putative similar to nitrate reductase GI:540486 from [Brassica napus]  
AT3G53720 putative protein several hypothetical Na(+)/H(+) antiporter  
AT1G55250 unknown protein  
AT1G79770 hypothetical protein predicted by genemark,hmm; supported by full-length cDNA: Ceres: 263605,  
AT4G37150 hydroxynitrile lyase like protein  
AT1G55930 unknown protein  
AT3G19850 hypothetical protein similar to hypothetical protein GB:AAD50054 from [Arabidopsis thaliana]  
AT2G18790 phytochrome B Identical to GB:X17342  
AT4G00950 putative protein  
AT1G22900 putative disease resistance response protein similar to GB:AAD29806  
AT1G22690 putative gibberellin-regulated protein contains similarity to gibberellin-regulated protein 2 precursor (GAST1)

**Fig. 1: A)** Genes “con interacción”, cuya expresión mostraba interacción entre la condición actual (L o S) y la condición previa (L o S), clasificados en 8 *clusters*.



**Fig. 1: B)** Genes “con respuesta aditiva”, en los que la expresión dependía de la condición actual (L o S) y de la previa (L o S) de manera aditiva, clasificados en 15 *clusters*.





**Tabla 4:** Genes observados (O) y esperados (E) en cada *cluster* que responden negativamente a la aplicación exógena de las siguientes hormonas: auxinas (IAA), giberelinas (GA), etileno (ACC), brasinoesteroides (BL), ácido abscísico (ABA), jasmónico (MJ) y citocininas (Zeatin) (Goda et al., 2008). Los *clusters* que tiene una sobre-representación de genes están marcados en gris.

	N° genes	IAA		GA		ACC		BL		ABA		MJ		ZEATIN									
		O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E								
Aditivos	Cluster 1	3	2,23	1,35	3	1,52	1,98	1	1,07	0,93	0	0,62	0	6	3,97	1,51	10	9,63	1,04	0	0,76	0	
	Cluster 2	2	2,5	0,87	1	1,57	0,64	1	1,11	0,9	3	0,65	4,65	9	4,1	2,19	28	9,95	2,81	2	0,78	2,55	
	Cluster 3	3	0,38	5,21	3	0,39	7,66	1	0,28	3,62	0	0,16	0	5	1,03	4,88	7	2,49	2,81	2	0,2	10,2	
	Cluster 4	1	0,39	2,54	0	0,27	0	3	0,19	1,59	0	0,11	0	0	0,7	0	3	1,7	1,76	0	0,13	0	
	Cluster 5	207	0	0,46	0	0	0,31	0	0	0,22	0	0	0,13	0	2	0,81	2,47	3	1,97	1,53	0	0,15	0
	Cluster 6	188	0	0,41	0	0	0,28	0	0	0,2	0	0	0,12	0	0	0,74	0	3	1,79	1,68	0	0,14	0
	Cluster 7	101	0	0,22	0	1	0,15	6,62	1	0,11	9,38	0	0,06	0	0	0,4	0	1	0,96	1,04	0	0,08	0
	Cluster 8	50	1	0,11	9,1	2	0,07	26,8	0	0,05	0	0	0,03	0	1	0,2	5,11	1	0,47	2,11	0	0,04	0
	Cluster 9	23	0	0,05	0	0	0,03	0	0	0,02	0	0	0,01	0	1	0,09	11,1	0	0,22	0	0	0,02	0
	Cluster 10	50	0	0,11	0	0	0,07	0	1	0,05	19	0	0,03	0	1	0,2	5,11	3	0,47	6,32	0	0,04	0
	Cluster 11	30	0	0,07	0	1	0,04	22,3	0	0,03	0	0	0,02	0	1	0,12	8,52	1	0,28	3,51	0	0,02	0
	Cluster 12	17	0	0,04	0	0	0,03	0	0	0,02	0	0	0,01	0	0	0,07	0	1	0,16	6,19	0	0,01	0
	Cluster 13	20	2	0,04	45,5	0	0,03	0	0	0,02	0	0	0,01	0	0	0,08	0	0	0,19	0	0	0,01	0
	Cluster 14	16	0	0,04	0	0	0,02	0	0	0,02	0	0	0,01	0	0	0,06	0	0	0,15	0	0	0,01	0
	Cluster 15	15	0	0,03	0	0	0,02	0	0	0,02	0	0	0,01	0	0	0,06	0	2	0,14	14	0	0,01	0
Sin cluster	512	3	1,13	2,67	2	0,77	2,61	1	0,54	1,85	2	0,32	6,35	5	2	2,5	6	4,86	1,23	0	0,38	0	
Interacción	Cluster 1	308	1	0,68	1,48	0	0,46	0	0	0,32	0	0	0,19	0	2	1,21	1,66	8	2,92	2,74	0	0,23	0
	Cluster 2	122	1	0,27	3,73	1	0,18	5,48	2	0,13	15,5	1	0,08	13,3	2	0,48	4,19	15	1,16	12,9	1	0,09	11
	Cluster 3	69	0	0,15	0	0	0,1	0	0	0,07	0	0	0,04	0	1	0,27	3,7	1	0,66	1,53	0	0,05	0
	Cluster 4	48	0	0,11	0	0	0,07	0	0	0,05	0	0	0,03	0	0	0,19	0	2	0,46	4,39	0	0,04	0
	Cluster 5	45	0	0,1	0	0	0,07	0	0	0,05	0	0	0,03	0	0	0,18	0	0	0,43	0	0	0,03	0
	Cluster 6	44	0	0,1	0	0	0,07	0	0	0,05	0	0	0,03	0	2	0,17	11,6	0	0,42	0	0	0,03	0
	Cluster 7	15	0	0,03	0	0	0,02	0	0	0,02	0	0	0,01	0	0	0,06	0	0	0,14	0	0	0,01	0
	Cluster 8	17	0	0,04	0	0	0,03	0	0	0,02	0	0	0,01	0	0	0,07	0	0	0,16	0	0	0,01	0
Sin cluster	522	3	1,15	2,61	3	0,78	3,84	1	0,55	1,82	0	0,32	0	3	2,04	1,47	5	4,96	1,01	0	0,39	0	
No significativos	17824	30	39,2	0,77	17	26,6	0,64	12	1,88	0,64	8	11	0,73	48	69,7	0,69	116	1,69	0,69	12	13,3	0,9	
Total de genes	22746	50	34	24	14	89	216	17															

**Tabla 5:** Genes con función fotomorfogénica conocida que cambiaban su expresión de un modo significativo en respuesta de los tratamientos de L y S.

ATG	Descripción
AT3G59060	PIL6 (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 5); DNA binding / transcription factor
AT1G09530	PAP3/PIF3/POC1 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3)
AT2G43010	PIF4 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4); DNA binding / transcription factor
AT1G02340	HFR1 (LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED); DNA binding / transcription factor
AT4G16780	ATHB-2 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 2)
AT5G47370	HAT2; transcription factor
AT5G04190	PKS4 (PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 4)
AT5G11260	HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5); DNA binding / transcription factor
258349_at	AT3G17609
AT4G25350	SHB1 (SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1)
AT5G15840	CO (CONSTANS); transcription factor/ zinc ion binding
AT1G19150	LHCA6 (Photosystem I light harvesting complex gene 6); chlorophyll binding
AT3G08010	ATAB2; RNA binding
AT2G04030	CR88 (EMBRYO DEFECTIVE 1956); ATP binding
AT2G40100	LHCB4.3 (LIGHT HARVESTING COMPLEX PSII); chlorophyll binding
AT2G40080	ELF4 (EARLY FLOWERING 4)
AT1G15550	GA4 (GA REQUIRING 4); gibberellin 3-beta-dioxygenase
AT4G36930	SPT (SPATULA); DNA binding / transcription factor
AT5G48150	PAT1 (PHYTOCHROME A SIGNAL TRANSDUCTION 1); transcription factor
AT3G27690	LHCB2:4 (Photosystem II light harvesting complex gene 2.3); chlorophyll binding
AT1G52830	IAA6 (indoleacetic acid-induced protein 6); transcription factor
AT1G74660	MIF1 (MINI ZINC FINGER 1); DNA binding / transcription factor
AT1G14290	acid phosphatase, putative
AT2G42870	HLH1/PAR1 (PHY RAPIDLY REGULATED 1); transcription regulator
AT1G09570	PHYA (PHYTOCHROME A); G-protein coupled photoreceptor/ signal transducer
AT2G37640	ATEXPA3 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A3)
AT5G51810	AT2353/ATGA20OX2/GA20OX2 (GIBBERELLIN 20 OXIDASE 2); gibberellin 20-oxidase
AT5G24470	APRR5 (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5); transcription regulator
AT4G31500	CYP83B1 (CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASE 83B1); oxygen binding
AT5G02810	PRR7 (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7); transcription regulator
AT3G59060	PIL6 (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 5); DNA binding / transcription factor
AT2G35940	BLH1 (embryo sac development arrest 29); DNA binding / transcription factor
AT4G16780	ATHB-2 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 2)
AT4G32280	IAA29 (indoleacetic acid-induced protein 29); transcription factor
AT1G14920	GAI (GA INSENSITIVE); transcription factor
AT1G09530	PAP3/PIF3/POC1 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3)
AT2G32950	COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1)
AT4G14690	ELIP2 (EARLY LIGHT-INDUCIBLE PROTEIN 2); chlorophyll binding
AT5G04190	PKS4 (PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 4)
AT5G53660	AtGRF7 (GROWTH-REGULATING FACTOR 7)



AT5G02200	FHL (FAR-RED-ELONGATED HYPOCOTYL1-LIKE); protein binding
AT4G37580	HLS1 (HOOKLESS 1); N-acetyltransferase
AT4G13790	auxin-responsive protein, putative
AT1G02340	HFR1 (LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED); DNA binding / transcription factor
AT1G02400	ATGA2OX6/DTA1 (GIBBERELLIN 2-OXIDASE 6); gibberellin 2-beta-dioxygenase
AT2G42810	PAPP5/PP5 (PROTEIN PHOSPHATASE 5)
AT1G08540	SIGB (SIGMA FACTOR B); DNA binding / DNA-directed RNA polymerase/ transcription factor
AT5G44110	POP1
AT5G24120	SIGE (RNA polymerase sigma subunit E)
AT5G11260	HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5); DNA binding / transcription factor
AT1G69530	ATEXPA1 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A1)
AT1G30040	ATGA2OX2; gibberellin 2-beta-dioxygenase
AT1G69640	acid phosphatase, putative
AT1G06040	STO (SALT TOLERANCE); transcription factor/ zinc ion binding
AT1G78600	zinc finger (B-box type) family protein
AT2G46340	SPA1 (SUPPRESSOR OF PHYA-105 1); signal transducer
AT2G37970	SOUL-1; binding
AT2G02950	PKS1 (PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1)
AT2G29090	CYP707A2 (cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 2); oxygen binding
258349_at	AT3G17609
AT5G47370	HAT2; transcription factor
AT4G25260	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein
AT4G02440	EID1 (EMPFINDLICHER IM DUNKELROTEN LICHT 1)
AT2G43010	PIF4 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4); DNA binding / transcription factor
AT1G15550	GA4 (GA REQUIRING 4); gibberellin 3-beta-dioxygenase
AT5G51810	AT2353/ATGA20OX2/GA20OX2 (GIBBERELLIN 20 OXIDASE 2); gibberellin 20-oxidase
AT1G14920	GAI (GA INSENSITIVE); transcription factor
AT1G02400	ATGA2OX6/DTA1 (GIBBERELLIN 2-OXIDASE 6); gibberellin 2-beta-dioxygenase
AT1G30040	ATGA2OX2; gibberellin 2-beta-dioxygenase
AT1G52830	IAA6 (indoleacetic acid-induced protein 6); transcription factor
AT4G32280	IAA29 (indoleacetic acid-induced protein 29); transcription factor
AT4G13790	auxin-responsive protein, putative

**Tabla 6:** Genes que responden positivamente a la aplicación exógena de auxinas (IAA) y se encuentran regulados por HY5 (menores niveles de expresión en el mutante *hy5*)

ATG	Descripción
AT3G10720	putative pectinesterase contains similarity to pectinesterase GB:AAB57671 [Citrus sinensis]
AT4G27260	GH3 like protein GH3 protein, Glycine max., PIR2:S17433
AT4G30280	xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase-like protein xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase (EC 3.2.1.-)
AT3G23050	indoleacetic acid (IAA)-inducible gene (IAA7) identical to (IAA7) gene
AT3G23030	auxin-inducible gene (IAA2) identical to auxin-inducible gene (IAA2)
AT4G37390	auxin-regulated protein GH3, putative similar to auxin-regulated protein GH3
AT5G62280	putative protein predicted proteins, Arabidopsis thaliana
AT1G59740	oligopeptide transporter, putative similar to oligopeptide transporter
AT1G29500	auxin-induced protein, putative similar to SP:P33083 from [Glycine max]
AT5G02760	protein phosphatase - like protein protein phosphatase 2C homolog, Mesembryanthemum crystallinum
AT1G29430	auxin-induced protein, putative similar to SP:P33083 from [Glycine max]