

Tesis Doctoral

Bases moleculares del control del desarrollo en plantas por señales de luz y temperatura combinadas

Legris, Martina

2017-05-09

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

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

Cita tipo APA:

Legris, Martina. (2017-05-09). Bases moleculares del control del desarrollo en plantas por señales de luz y temperatura combinadas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Legris, Martina. "Bases moleculares del control del desarrollo en plantas por señales de luz y temperatura combinadas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-05-09.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Bases moleculares del control del desarrollo en plantas por señales de luz y temperatura combinadas.

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Martina Legris

Director de tesis: Jorge José Casal

Director Asistente: Marcelo Javier Yanovsky

Consejero de estudios: Pablo Diego Cerdán

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir

Buenos Aires, 2017

Índice

Resumen.....	1
Abstract	2
Agradecimientos	3
Introducción	6
La percepción y respuesta a señales lumínicas del ambiente.....	6
La percepción y respuesta a las diferentes temperaturas y la interacción con señales luminosas.	9
Regulación de la actividad de phyB.....	12
Mecanismos de regulación de la reversión térmica.	14
Los gránulos nucleares que contienen phyB o <i>photobodies</i>	15
Cascada de señalización río abajo de phyB.....	17
Objetivos	20
Materiales y métodos	22
Material vegetal	22
Reproducción del material vegetal	22
Medición del ángulo de inserción de las hojas	23
Medición de la elongación del hipocotilo	23
Espectros de las fuentes de luz utilizadas	24
Microscopía confocal	25
Análisis de imágenes	25
Método analítico para calcular kr_1 y kr_2 a partir de la abundancia de Pfr por espectrofotometría	27
Cuantificación <i>in vitro</i> de phyB.	27
Cuantificación <i>in vivo</i> de phyB.	28
Análisis estadístico	29
Estimación de la contribución de cada modo de acción de la temperatura sobre la elongación del hipocotilo.	29
Resultados	31
1.Los gránulos de phyB responden a los cambios en la relación R/RL y la irradiancia causados por el sombreado de plantas vecinas.	31
La localización del phyB responde a los cambios en la calidad y cantidad de luz.	31
Caracterización temporal y espacial de la respuesta a la irradiancia.	39
phyB responde a los cambios en la cantidad y calidad de luz generados por un canopeo vegetal en condiciones naturales.....	42

La percepción de la irradiancia es mediada por la reversión térmica	45
2. phyB integra señales de luz y temperatura.....	49
Los niveles de Pfr dependen de la temperatura aún en presencia de luz.	49
La temperatura afecta a la localización de phyB.	53
La respuesta termomorfogénica depende de phyB.....	57
3. Otras consecuencias funcionales de la integración de señales por parte de phyB	64
phyB integra señales de luz y temperatura en ciclos diarios de luz y oscuridad.	64
Señalización río debajo de phyB	65
Discusión	72
La reversión térmica tiene un fuerte rol en el control de los niveles de phyB activo.....	72
phyB es un receptor de luz y temperatura.....	74
La localización de phyB responde al sombreado por plantas vecinas, a los ciclos de luz/oscuridad y a la temperatura ambiente.....	76
Efecto río debajo de la localización de phyB.....	80
Las respuestas morfológicas en plantas dependen fuertemente de la integración de señales ambientales.	83
Conclusiones	84
Referencias.....	86
Anexo - Figuras suplementarias	98

Bases moleculares del control del desarrollo en plantas por señales de luz y temperatura combinadas.

Resumen

Las señales de luz y temperatura proveen información a las plantas acerca del ambiente circundante. En respuesta a estas señales las plantas modulan su metabolismo y desarrollo. Estas dos variables ambientales suelen estar fuertemente interrelacionadas en la naturaleza. Sin embargo, hasta el momento no se han hecho estudios exhaustivos de sus efectos conjuntos. El objetivo de este trabajo es estudiar la percepción de estas señales combinadas y su interacción a nivel molecular. En particular, nos centraremos en la función del receptor fitocromo B y la vía de señalización controlada por este durante el desarrollo de plantas de *Arabidopsis thaliana*. El fitocromo B fue caracterizado como un receptor de luz roja y rojo lejano, y es uno de los fotorreceptores más relevantes en el control de la fotomorfogénesis. Dependiendo de la calidad de luz incidente se modulan los niveles de su forma activa y se modula una cascada de señalización que involucra una fuerte regulación del transcriptoma. Entre los procesos controlados por este receptor se encuentra la elongación del tallo (hipocotilo) y la posición de las hojas. A mayor actividad de fitocromo B, más inhibida se ve la elongación y las hojas adquieren una posición menos erecta. La temperatura también regula estos procesos, observándose una mayor elongación del hipocotilo y una posición más erecta de las hojas a mayor temperatura. Sin embargo, hasta el momento no se conocía el receptor involucrado en la percepción de esta señal. En este trabajo pudimos determinar que el fitocromo B funciona como un sensor conjunto de luz y temperatura. Debido a esto no sólo percibe la calidad de la luz sino también cambios en la irradiancia. En concordancia con esta observación, proteínas previamente descritas como parte de la vía de transducción de la señal de luz, también demostraron estar reguladas por la temperatura ambiente. Esto pone de manifiesto la fuerte integración de señales que realizan las plantas, lo cual les permitiría lograr una mejor adaptación al ambiente donde se desarrollan.

Palabras clave: luz roja, luz rojo lejano, *Arabidopsis thaliana*, desarrollo, elongación del hipocotilo, calor, fitocromo B.

Molecular basis of development control by light and temperature signals in plants.

Abstract

Light and temperature signals provide information to the plants about the surrounding environment. Upon signal perception plants modulate their metabolism and development. These two variables are strongly related in nature. However, so far their combined effects have not been extensively evaluated. The aim of this work is to study how plants jointly perceive light and temperature cues and how these signals interact at the molecular level. Particularly, we will focus on phytochrome B (phyB) and its signaling pathway during vegetative development in *Arabidopsis thaliana* plants. PhyB has been characterized as a red and far-red light receptor, and is one of the most relevant light receptors controlling photomorphogenesis. Depending on the incident light quality a proportion of the receptor molecules activate and trigger a signaling cascade which involves large changes in the transcriptome. Some of the processes controlled by phyB are stem (hypocotyl) elongation and leaf hyponasty. Active phyB inhibits hypocotyl elongation and hyponasty. Temperature also regulates these features, but contrary to phyB function, higher temperatures promote hypocotyl elongation and hyponasty. So far no temperature receptors have been described. The results of this thesis show that phyB perceives not only light but also temperature. Consequently, it can also perceive changes in irradiance in field conditions. Accordingly, proteins previously described as elements of the light signal transduction pathway are also regulated by ambient temperature. This reveals how plants efficiently integrate light and temperature cues to accurately adapt their development to the prevailing ambient conditions.

Keywords: red light, far-red light, *Arabidopsis thaliana*, development, hypocotyls growth, heat, phytochrome B.

Agradecimientos

La experiencia de hacer el doctorado fue genial. Fueron cinco años de aprendizaje. De transformación. De romper y armar de nuevo. Cambiar la forma de ver las cosas. Pero sobre todo eso fueron 5 años de mi vida que disfruté muchísimo, haciendo lo que quiero acompañada de gente espectacular. Sin ellos nada de lo anterior hubiera sido igual. Por eso quiero agradecerles:

A Jorge, que le hace honor a la palabra Director. Gracias por guiarme durante estos cinco años, y enseñarme una forma de ver y hacer las cosas. Gracias por las ideas, la motivación para hacerlas, el apoyo cuando no salían y la fuerza para volver a empezar. Por el trabajo en equipo.

A mis queridas compañeras de laboratorio, el dream team, Majo y Ceci. Por ser el grupo que tanta falta me hacía. Por compartir las alegrías y las frustraciones minuto a minuto. Por bancarme en los momentos de mucho nervio. Por los mates. Las charlas. Los tratamientos de luz, sombra y temperatura grupales. Por las discusiones de resultados, por quedarse pensando y al rato venir con una idea. Por las tardes de siembra de miles de cajitas, charlando cada una mirando para su mesada (y por escucharme cuando se me daba por cantar jeje). Las quiero muchísimo!! A Lucho, que me sufrió como co-directora. Espero que sepa comprender que fuimos aprendiendo en el camino. A Cris Nieto, que aunque estuvo poco tiempo nos llenó de buenos momentos. A los casales de IFEVA, Manu, Orne, Viky, Romi, Sofi, Marian, Mer, Pipa, Trupkin, Ely, por bancarme cada vez que iba y preguntaba toooodo! Gracias por incluirme al grupo, por compartir todo y por escucharme siempre! A Manu, Orne, Ro y Santi, por las horas de terapia compartidas en el cuarto de microscopios!

A los compañeros de todos los días, Steve, Majo, Estepi, Andrew, Sole, Javi, Beck, Caro, Sabri, Mati, Juli, Gusti. Gracias por dejarme ser miembro vitalicio del Lab. 103! Por todos los materiales y equipos que me compartieron (no entrarían en la tesis si los quisiera enumerar). Por ser mi grupo cuando estaba sola en FIL. Por los mates, las birras, los asados, las risas. Porque siempre están mirando para adelante, con ideas nuevas, porque contagian las ganas de hacer. Porque en todos encontré un amigo y un modelo a seguir. Los quiero mucho! A Marcelo Yanovsky y Santiago Mora, dos referentes. Porque siempre que los necesité estuvieron ahí para escuchar, para aconsejar, para charlar de ciencia y del doctorado.

A los demás IFEVOS, los Botto y la gente de la cátedra de Fisio Vegetal de agro: Miriam, Tai, Cristian, Fabian, Flor, Sofi, Rocío. Gracias por la buena onda de siempre! Por bancarme que no estuviera ahí todos los días. Gracias por contagiar el amor a la docencia, por darme el lugar de proponer ideas, por la confianza y el trabajo en grupo. A la FAUBA por convertirse en mi segunda facultad.

A la Fundación Instituto Leloir, a la institución y toda la gente que la compone. Porque fue el escenario ideal para llevar adelante todo lo que me propuse durante el doctorado. No me quedé con las ganas de (casi) nada! Espero haber dejado algo mío porque me llevé muchísimo. Agradezco haber podido interactuar con casi toda la gente que lo compone: investigadores, becarios, la gente de mantenimiento, compras, biblioteca, droguero, biblioteca, desarrollo de fondos, comunicación institucional. De todos aprendí mucho y siempre me hicieron sentir cómoda, como en casa. Me alegro de haber participado de aquel Puertas Abiertas en el 2003

que me mostró un mundo desconocido y me dejó con ganas de volver. Ahora, después de casi 7 años de haber entrado, me voy, pero de nuevo me quedo con ganas de volver! Voy a extrañar al Leloir y a toda su gente!

A los miembros de mi CST, Alejandro Schinder, Santiago Mora y Cristina Marino, porque durante todos estos años me guiaron en el trabajo, me aconsejaron, y a cada rato me preguntaban cómo venía, dándome aliento.

A la UBA, y en particular a mi queridísima Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Por la excelente formación que me ofreció y espero que siga ofreciendo. Porque me abrió la cabeza. Porque me permitió dar los primeros pasos en la docencia.

A los amigos de la facu, compañeros de camino durante estos años de formación, con los que compartimos las subidas y las bajadas, nos acompañamos y nos apoyamos, siempre entre risas: Agos, Fabi, Agus, Juanjo, Kika, Caro, Dai, Pau, Julian, Sofi. Gracias por hacerme sentir que no era yo la única loca que se preocupaba por las cosas!! Por compartir sus diferentes formas de ver y hacer las cosas.

A los amigos de toda la vida, que están SIEMPRE, porque aunque no siempre entienden, siempre acompañan y apoyan. Especialmente a Lau, mi amiga/hermana, por toooodos los momentos compartidos en estos últimos años. A todos, ustedes ya saben quienes son, los quiero muchísimo! Nunca me falten!

A los viejos, Fernando y Amalia. Porque son lo más. Porque en estos años de formación y tanto cambio me acompañaron en cada momento, me apoyaron en todo y me dieron la seguridad para ir para adelante siempre. Porque me enseñaron el sacrificio, el trabajo, y a amar lo que uno hace. Porque confiaron en mí siempre, y a pesar de los miedos e incertidumbres me apoyaron desde el primer momento que se me ocurrió seguir esta carrera, y lo siguen haciendo. Gracias por TODO. A mis hermanos Pedro y Ana, que los quiero infinito. Porque son Hermanos, con todas las letras y mayúscula. Porque siempre están. Porque sé que siempre son sinceros, aunque lo que haya para decir no sea lo que uno quiere escuchar, y eso no es fácil de encontrar. Por marcar los errores y compartir la alegría en los aciertos. Gracias por las visitas, las cenas y las noches compartidas en el depto de Güemes. Gracias por caminar siempre al lado mío!

A las abuelas, Chochi y Haydée, que no entienden qué hago tantas horas en el laboratorio, y no están seguras de si trabajo o si todavía estoy estudiando. Porque no soy la nieta ideal, pero me quieren y me miman como si lo fuera. Porque me muestran una visión del mundo diferente. Gracias por todo su cariño, sus mimos y sus enseñanzas! Mención especial a las tortas de la abuela Chochi, que acompañaron los mates del lab estos años. También gracias a la gran familia de tíos y primos, que son los cimientos de todo lo que voy construyendo en la vida, y siempre se interesaron por lo que estaba haciendo.

Agradezco muchísimo la oportunidad de haber podido atravesar por esta experiencia de formación que fue el doctorado, les agradezco a todos los que lo hicieron posible y espero no sólo haber dicho "gracias" suficientes veces sino también haberles demostrado con hechos lo importantes que fueron.

Introducción

Introducción.

Esta tesis abarcará el tema de cómo las plantas modulan su crecimiento y desarrollo en respuesta a las condiciones ambientales. ¿Por qué es esto importante? A diferencia de la mayoría de los organismos vivos, las plantas no poseen la capacidad de desplazarse, sino que una vez que la semilla germina y la planta se establece, esta permanecerá ahí el resto de su vida. A pesar de que la germinación ocurre en un rango acotado de condiciones ambientales, los ambientes a los que se puede enfrentar la planta adulta son muy variados. En concordancia con esta situación, a diferencia de la mayoría de los animales que presentan un patrón de desarrollo poco variable, prefijado desde la embriogénesis, las plantas presentan una gran plasticidad. El número, tamaño, forma y funcionalidad de los órganos de la planta adulta dependerán en gran medida de las condiciones ambientales prevalentes. La supervivencia y el éxito reproductivo de la planta entonces dependerán fuertemente de la precisa percepción de las condiciones externas, y de los mecanismos moleculares, fisiológicos y morfogénicos que estas desencadenen.

El ambiente lumínico y la temperatura no sólo son dos de las variables ambientales que más impacto tienen sobre el desarrollo vegetal, sino también dos de las condiciones más variables del ambiente. Esta tesis se centrará en los mecanismos de percepción de estas señales y en sus efectos sobre la elongación del tallo embrionario (hipocotilo) y la arquitectura de la roseta de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana*.

La percepción y respuesta a señales lumínicas del ambiente.

La luz del sol no sólo provee la energía para la fotosíntesis, sino que también provee a las plantas información acerca del momento del día, la estación del año y la posición relativa con respecto al suelo y a otras plantas, entre otros.

Las semillas germinan debajo de la superficie del suelo, emergiendo primero la radícula y luego el vástago, que consiste de un tallo embrionario denominado hipocotilo, y dos cotiledones no expandidos, sin pigmentos fotosintéticos, que junto con el meristema apical del vástago se encuentran protegidos dentro del gancho apical, formado por la parte superior del hipocotilo. Durante los primeros estadios del desarrollo de la plántula, debajo de la superficie del suelo, en oscuridad, esta se nutre de las reservas contenidas en la semilla para crecer. Las células que forman el hipocotilo se expanden debido al aumento de la turgencia en su vacuola y el ablandamiento de las paredes celulares, permitiendo a la plántula atravesar el perfil del suelo. Una vez alcanzada la superficie, la planta percibe por primera vez la luz. En consecuencia, cesa la elongación celular en el hipocotilo, se expande el gancho apical, se promueve la expansión de los cotiledones y el desarrollo del aparato fotosintético, pasando a su plan de desarrollo fotomorfogénico y nutrición fotoautótrofa. Este proceso se denomina des-etiolación, y el plan de desarrollo en oscuridad se denomina etiolado (Casal, J.J. 2000).

Dependiendo del momento del día varía la intensidad y la dirección de incidencia de la luz, hasta la noche que oscurece. Los cambios entre día y noche permiten el entrenamiento del reloj circadiano. El reloj circadiano es un mecanismo molecular que consiste en el control de la abundancia de ciertas proteínas mediante ciclos de retroalimentación negativa, generando patrones de abundancia o actividad cíclicos con un período de aproximadamente 24 h. Una vez

entrenado por señales ambientales el reloj circadiano puede “medir” el paso del tiempo y permite predecir los cambios diarios y estacionales en las condiciones ambientales. En plantas, estos relojes regulan la apertura y cierre de estomas, la posición de sus hojas, y ciclos de crecimiento, de modo que aun cuando las plantas se transfieren a condiciones artificiales de luz y temperatura continuas estos procesos continúan mostrando un patrón rítmico. A lo largo del año se modifican la cantidad de horas de luz por día, el fotoperiodo, siendo más largo en verano y acortándose hacia el invierno. Estos cambios son registrados por las plantas, en un proceso que involucra al reloj circadiano, y en consecuencia inducen procesos del desarrollo como la germinación, la floración o la tuberización en las épocas más favorables (McClung, C.R. 2006).

Cuando la luz blanca atraviesa una hoja, los pigmentos fotosintéticos absorben las longitudes de onda en el rango entre el azul y el rojo, mientras que las longitudes de onda del rojo lejano y el infrarrojo son transmitidas o reflejadas. Consecuentemente, la luz debajo de un canopeo vegetal se caracteriza por una menor irradiancia de luz fotosintéticamente activa (PAR, $\lambda = 400-700\text{nm}$), con la consecuente disminución de la irradiancia de luz roja ($\lambda = 660\text{nm}$), y un aumento relativo de la radiación rojo lejano ($\lambda = 730\text{nm}$), o expresado de otra forma, menor relación rojo/rojo lejano (R/RL) (Fig. I.1). Cuando plantas que típicamente crecen al sol perciben esta señal se desencadenan las respuestas de escape al sombreado. Morfológicamente las respuestas de escape al sombreado se caracterizan por una mayor expansión celular, generando hipocotilos, entrenudos y pecíolos más largos, las hojas adquieren una posición más erecta, y a largo plazo se observa un menor contenido de pigmentos fotosintéticos en las hojas, las hojas nuevas presentan láminas más pequeñas, y eventualmente se puede observar una reducción de la dominancia apical y un adelantamiento de la floración (Casal, J.J. 2012; Casal, J.J. 2013).

Las señales luminosas del ambiente son percibidas por receptores fotosensoriales. En general estos receptores son proteínas unidas a una molécula orgánica que cambia su configuración electrónica al absorber fotones de determinadas longitudes de onda, denominada cromóforo. El cambio en el cromóforo repercute en la proteína causando cambios en su actividad biológica. En base a sus características estructurales y a las longitudes de onda que perciben, se han descrito cinco familias de fotorreceptores sensoriales en plantas: los criptocromos, las fototropinas y los miembros de la familia ZEITLUPE perciben la luz azul y UV-A, el receptor UVR8 percibe la luz UV-B, y los fitocromos perciben la luz roja y rojo lejano (Fig. I.1) (Galvão, V.C. *et al.* 2015).

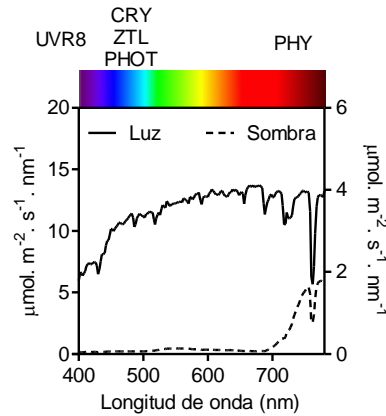


Figura I.1 - Espectro de la luz natural un día soleado (Luz, línea completa) o bajo la sombra de una planta (Sombra, línea punteada). Se indica a qué color corresponde cada longitud de onda y las familias de fotorreceptores especializados para cada rango del espectro. Nótese que en la sombra se reduce drásticamente la radiación entre 400 y 700 nm mientras que se mantiene gran parte de la radiación entre 700 y 800 nm, reduciendo la relación rojo / rojo lejano de la luz.

Los criptocromos (*cry1* y *cry2* en *Arabidopsis* (Lin, C. *et al.* 1995; Lin, C. *et al.* 1998)) son los principales receptores de la luz azul, regulando la elongación del hipocotilo y la arquitectura de la roseta en respuesta a los cambios en la irradiancia de luz azul (Keller, M.M. *et al.* 2011). Consisten en una proteína con alta similitud a fotoliasas, que une una Flavina Adenina Dinucleótido (FAD) como cromóforo. La percepción de luz azul causa la reducción del FAD y el receptor sufre un cambio conformacional que permite la interacción con los elementos de la vía de transducción de la señal, finalmente regulando la expresión génica (Galvão, V.C. *et al.* 2015).

Las fototropinas, denominadas *phot1* y *phot2* en *Arabidopsis* (Briggs, W.R. *et al.* 2002) en respuesta a la luz azul regulan la dirección del crecimiento del hipocotilo y tallos, la curvatura de las hojas, la apertura y cierre de estomas y la posición de los cloroplastos. Dependiendo de las condiciones ambientales estas pueden encontrarse asociadas a la membrana o en el citoplasma. Presentan un dominio LOV (*Light Oxygen or Voltage*) que en presencia de luz une covalentemente una molécula de Flavina Mono Nucleótido (FMN), y consecuentemente sufren un cambio conformacional que des-reprime su actividad kinasa. La transducción de la señal implica la interacción con proteínas de membrana y citoplasmáticas, y eventualmente controla la expansión celular a través de la modulación de la síntesis, transporte y actividad de las hormonas vegetales auxinas (Fankhauser, C. *et al.* 2015).

Los miembros de la familia ZEITLUPE, denominados ZTL, FKF1 y LKP2 (Nelson, D.C. *et al.* 2000; Somers, D.E. *et al.* 2000; Schultz, T.F. *et al.* 2001), son reguladores positivos de la elongación del hipocotilo en respuesta a la luz. Perciben la luz a través de un dominio LOV (*Light Oxygen or Voltage*) que une FMN y activa un complejo E3 ligasa SCF. UVR8 fue el último fotorreceptor descrito (Kaiserli, E. *et al.* 2007; Rizzini, L. *et al.* 2011). Este receptor no tiene un cromóforo, sino que se vale de los residuos triptófano en su estructura para percibir la luz ultravioleta. Dependiendo de las condiciones se encuentra como dímero o como monómero, que es la

forma activa y se localiza en el núcleo donde interactuando con otros factores regula la expresión génica (Hayes, S. *et al.* 2017).

Los fitocromos son proteínas núcleo-citoplasmáticas que unen un tetrapirrol de cadena lineal (fitocromobilina, P Φ B) como cromóforo. En *Arabidopsis* la familia de los fitocromos está formada por cinco miembros, fitocromo A (phyA), phyB, phyC, phyD, phyE. En general estos receptores regulan la respuesta a la luz durante la germinación, la des-etiolación, el desarrollo de la planta adulta y la transición entre el estado vegetativo y reproductivo, en particular en respuesta al fotoperiodo. Como se puede predecir en base a la cantidad y diversidad de respuestas controladas por estos receptores, las mutantes nulas para los cinco fitocromos presentan fuertes defectos en el desarrollo y en algunos casos no logran sobrevivir. Por ejemplo, cuando estas plantas son cultivadas en luz roja logran expandir sus cotiledones y desarrollar cloroplastos, pero luego el crecimiento se frena y mueren. Estas mutantes presentan hipocotilos extremadamente largos. Cuando las plantas adultas, cultivadas en luz blanca, son privadas de la luz azul al irradiarlas con luz roja rápidamente senescen y mueren (Strasser, B. *et al.* 2010; Hu, W. *et al.* 2013).

Muchas de las respuestas mencionadas anteriormente son controladas en conjunto por los cinco miembros de la familia de los fitocromos, aunque dependiendo de las condiciones ambientales cambia su actividad relativa. Los fitocromos se pueden clasificar en dos categorías: el tipo I (representado por phyA) se caracteriza por su rápida degradación en respuesta a la luz, mientras que los del tipo II (phyB-E) son relativamente estables. Consecuentemente, phyA es el fitocromo más abundante en plantas etioladas, mientras que en plantas des-etioladas el fitocromo más abundante es phyB (Hirschfeld, M. *et al.* 1998; Sharrock, R.A. *et al.* 2002). Durante la des-etiolación phyA es particularmente necesario en la respuesta a la luz de baja relación R/RL y a los muy bajos flujos de luz, mientras que phyB es importante en respuesta a las bajas irradiancias (Casal, J.J. *et al.* 1998; Strasser, B. *et al.* 2010; Sánchez Lamas, M. *et al.* 2016). En plantas des-etioladas phyB domina la mayoría de las respuestas, aunque recientemente se han descrito efectos específicos de phyC, phyD y phyE en la respuesta fotoperiódica de la floración y de la germinación, y en la regulación de la respuesta a hormonas (Arana, M.V. *et al.* 2014; Sánchez Lamas, M. *et al.* 2016).

En esta tesis nos centraremos en el rol de phyB, que es el miembro con mayores efectos en la fotomorfogénesis en plantas cultivadas en luz. Los mecanismos detallados de percepción de la luz y regulación de la fisiología vegetal por parte de phyB serán descritos en detalle más adelante.

La percepción y respuesta a las diferentes temperaturas y la interacción con señales luminosas.

Al igual que las condiciones lumínicas, la temperatura ambiente también varía a lo largo del día, con las estaciones del año y dependiendo de la posición de la planta relativa al suelo y a otras plantas. En respuesta a estos estímulos las plantas regulan su crecimiento y desarrollo. Por un lado, la cinética de todos los procesos bioquímicos es afectada por la temperatura. Es así que en condiciones naturales de crecimiento la duración de las fases de desarrollo depende fuertemente de la temperatura ambiente, observándose un aumento de su velocidad de ocurrencia a mayores temperaturas, hasta un máximo a partir del cual mayores temperaturas

son contraproducentes (Penfield, S. 2008). Por otro lado, las temperaturas extremas, tanto altas como bajas, causan estrés, inhibiendo el crecimiento y en casos extremos comprometiendo la supervivencia de las plantas (Yeh, C.H. *et al.* 2012). Finalmente, existen efectos más específicos de las temperaturas no estresantes, que regulan la morfogénesis desde la germinación hasta los últimos estadios de desarrollo (Quint, M. *et al.* 2016), y estos serán el objeto de estudio de esta tesis.

En condiciones naturales los cambios en la temperatura suelen estar causados por cambios en la radiación solar. A lo largo del día la mayor temperatura del aire se da luego de las horas de máxima radiación del mediodía, y las menores temperaturas se registran al amanecer. En el suelo, la variación diaria de la temperatura también depende fuertemente de la profundidad. En la superficie se alcanzan temperaturas muy elevadas, mientras que en estratos inferiores no solo se reduce la temperatura sino también la amplitud térmica durante el día. Las semillas perciben la temperatura del suelo, lo que les permite obtener información acerca de su posición relativa a la superficie y de la época del año, y en consecuencia la germinación se induce sólo en ciertas condiciones (Penfield, S. *et al.* 2009). Los cambios diarios en la temperatura del suelo son suficientes para entrenar al reloj circadiano, aún en ausencia de luz (Millar, A.J. 2004; Penfield, S. *et al.* 2009). Durante la des-etiolación, este entrenamiento del reloj por las temperaturas del suelo aumenta la sensibilidad a la luz, resultando en un efecto sinérgico entre los cambios de temperatura y la luz en la inhibición de la elongación del hipocotilo y la expansión de los cotiledones (Karayekov, E. *et al.* 2013).

En un rango de temperaturas no estresantes, entre 10 °C y 30 °C, mayores temperaturas promueven la elongación del hipocotilo (Quint, M. *et al.* 2016). Este cambio morfológico sería ventajoso ya que aleja al meristema y a los tejidos fotosintéticos del suelo caliente y los coloca en una zona donde el aire se mueve más, promoviendo la transpiración y la consecuente refrigeración de los tejidos (Gray, W.M. *et al.* 1998). La luz, como se mencionó anteriormente tiene el efecto contrario. Consecuentemente, esta respuesta a la temperatura se encuentra des-reprimida en mutantes de fotorreceptores (Jung, J.H. *et al.* 2016; Ma, D. *et al.* 2016). Además en muchos casos mutantes de la vía de señalización de fotorreceptores, mutantes de genes del reloj circadiano y mutantes de la síntesis o señalización de auxinas pierden la capacidad de responder a la temperatura (Gray, W.M. *et al.* 1998; Lee, J.H. *et al.* 2007; Koini, M.A. *et al.* 2009; Delker, C. *et al.* 2014; Toledo-Ortiz, G. *et al.* 2014; Box, M.S. *et al.* 2015; Quint, M. *et al.* 2016). Esto pone de manifiesto una fuerte interacción entre los mecanismos moleculares de respuesta a la luz y a la temperatura en el control de la elongación del hipocotilo.

Durante el desarrollo vegetativo de la planta adulta mayores temperaturas promueven la elongación de los tallos y entrenudos, la posición más erecta de las hojas (hiponastia), la elongación de los pecíolos, y eventualmente la generación de hojas con láminas más pequeñas y la inducción temprana de la floración (Mazzella, M.A. *et al.* 2000). Este plan de desarrollo permitiría una mejor aireación entre las hojas, aumentando el flujo transpiratorio y la consecuente disminución de la temperatura (Crawford, A.J. *et al.* 2012). Llamativamente estas respuestas a las temperaturas elevadas son muy similares a las observadas en la respuesta de escape al sombreado, mediada principalmente por phyB. Al igual que en el caso de la elongación del hipocotilo, la respuesta morfogénica a la temperatura se ve fuertemente

afectada en mutantes de fotorreceptores, mutantes de la vía de transducción de la señal lumínica y en mutantes del reloj circadiano (Mazzella, M.A. *et al.* 2000; Millar, A.J. 2004; Salomé, P.A. *et al.* 2010).

A diferencia de los mecanismos moleculares de percepción de la luz, los mecanismos de percepción de la temperatura no están tan claros. Los cambios de temperatura afectan a prácticamente todas las reacciones químicas y alteran la configuración de los átomos que forman ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y otras biomoléculas, afectando fuertemente su actividad. Sin embargo, para poder decir que una molécula es un receptor, al sufrir cambios por efecto de la temperatura esta debe proveer de información ambiental al sistema vivo que le permita desencadenar una respuesta fisiológica acorde a esas condiciones (Sengupta, P. *et al.* 2013). En base a esta definición, hasta el momento no se han identificado receptores de temperatura que regulen el crecimiento de las plantas (Quint, M. *et al.* 2016). Sin embargo, se han descrito mecanismos involucrados en la respuesta termosensible en el control de la floración. Uno de estos involucra a la histona H2A.Z, ya que la abundancia de esta variante en los nucleosomas de la región promotora del gen *FT*, un regulador positivo de la floración, es mayor a bajas temperaturas que a altas temperaturas (Kumar, S.V. *et al.* 2010; Kumar, S.V. *et al.* 2012; Talbert, P.B. *et al.* 2014). La menor abundancia de nucleosomas conteniendo H2A.Z a altas temperaturas favorece la actividad del factor de transcripción PIF4, promoviendo la expresión de *FT* y de esa forma acelerando la floración. En concordancia con este mecanismo, las mutantes *pif4* florecen más tarde que las plantas salvajes a altas temperaturas, evidenciando un rol de esta proteína en la respuesta termosensible (Kumar, S.V. *et al.* 2012). Además de las modificaciones epigenéticas mencionadas, la remodelación de la cromatina también tiene un rol en la respuesta termomorfogénica. La proteína ACTIN RELATED PROTEIN 6 (ARP6) controla la incorporación de nucleosomas que contienen H2A.Z a la cromatina, y plantas mutantes *arp6* tienen un fenotipo consistente con una respuesta constitutivamente termomorfogénica (Quint, M. *et al.* 2016).

En cuanto a la percepción de la señal, por analogía con otros sistemas biológicos se ha propuesto que el receptor podría ser una proteína de membrana. En respuesta a la temperatura las membranas biológicas cambian sus propiedades biofísicas. Tanto en animales como en bacterias existen proteínas de membrana que en respuesta a estos cambios cambian su actividad biológica (Sengupta, P. *et al.* 2013). Sin embargo, en plantas aún no se han encontrado proteínas con estas características.

Como se mencionó anteriormente, las respuestas morfológicas a las altas temperaturas son prácticamente las mismas que en respuesta al sombreado. Por otro lado, las respuestas termomorfogénicas se ven afectadas en mutantes de fitocromos y en mutantes de sus vías de señalización, y la temperatura afecta a la respuesta a la luz mediada por fitocromos (Kinnersley, A.M. *et al.* 1977). Estas observaciones llevaron a pensar que los fitocromos podrían actuar como receptores de temperatura (Roth-Bejerano, N. *et al.* 1966; Halliday, K.J. *et al.* 2003; Penfield, S. 2008). Otra observación que favorece esta visión es la fuerte interacción que existe entre la temperatura y el efecto de las mutaciones en fitocromos en el control de la floración y la germinación. El análisis del tiempo a floración en mutantes simples y múltiples de fitocromos mostraron que *phyE* es necesario a bajas temperaturas, *phyB* y *phyD* son importantes a alta temperatura, y *phyA* cumple funciones en todo el rango de temperaturas

estudiadas (16-22°C) (Blázquez, M.A. *et al.* 2003; Halliday, K.J. *et al.* 2003). En cuanto a la germinación, phyE sería importante a temperaturas menores a 16°C, phyA en temperaturas elevadas y phyB en un rango amplio de temperaturas (Heschel, M.S. *et al.* 2007; Penfield, S. 2008).

En resumen, a pesar de que el efecto de los fitocromos en la percepción de la temperatura ha sido propuesto anteriormente, nunca fue abarcado formalmente.

Regulación de la actividad de phyB.

El phyB de *Arabidopsis* consiste de una apoproteína de 1172 aminoácidos (PHYB, ~125 kDa) fusionada a un tetrapirrol de cadena lineal (fitocromobilina, P Φ B) (Burgie, E.S. *et al.* 2014). La apoproteína está formada por dos dominios: un dominio fotosensor N-terminal (PSM) y un dominio C-terminal de dimerización y regulación de la función (OPM), unidos por una región bisagra (Fig. 1.2 A). Recientemente se logró cristalizar el PSM de phyB de *Arabidopsis*, lo que permitió conocer más en detalle los cambios conformacionales relacionados con la actividad biológica de la proteína (Fig. 1.2 B), (Burgie, E.S. *et al.* 2014).

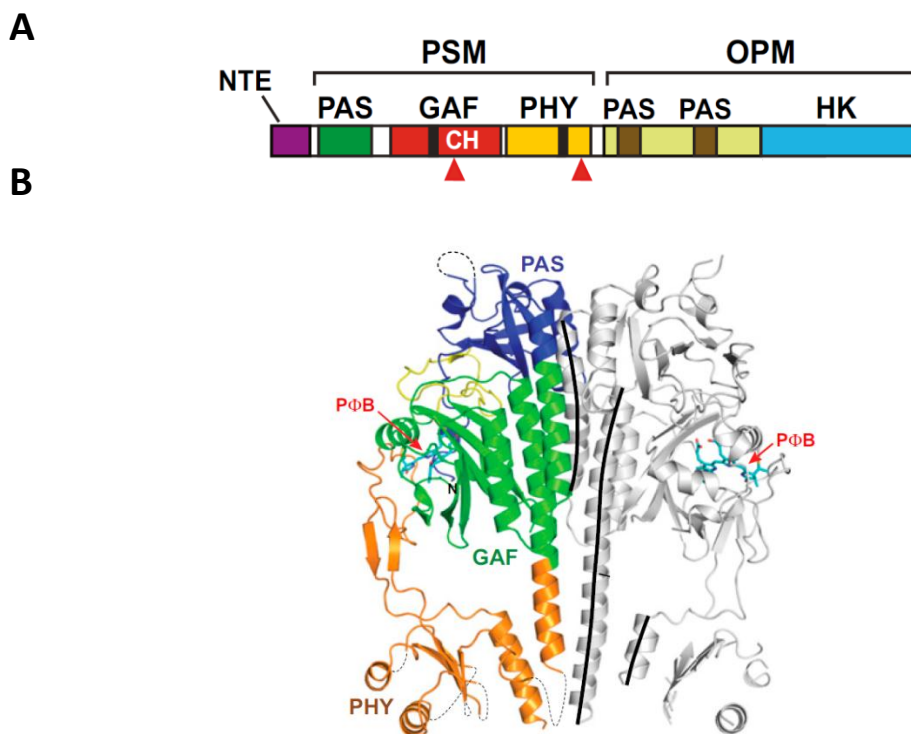


Figura 1.2 - Esquema de los módulos que componen PHYB y estructura cristalográfica de un dímero Pr.
 A - Esquema de los módulos que componen la proteína PHYB en *Arabidopsis*. PSM: Módulo fotosensor. OPM: módulo de output. NTE: Extensión N-terminal rica en glicina y serina. PAS: dominio Per/Arnt/Sim de función desconocida. GAF: dominio cGMP fosfodiesterasa/adenilil ciclasa/FhIA que sostiene al cromóforo. PHY: Módulo específico de fitocromos que estabiliza el estado fotoactivado. HK: dominio relacionado con histidin-quinasas de función aún desconocida. CH: residuos Cyh-His, involucrados en la unión del cromóforo. Los triángulos rojos muestran la posición aproximada de las mutaciones Y361F en el dominio GAF y R582A en el dominio PHY. Modificado de (Burgie, E.S. *et al.* 2014).
 B - Estructura del PSM (residuos 90-624) en un dímero de fitocromo B de *Arabidopsis thaliana* en su forma inactiva Pr. Tomado de (Burgie, E.S. *et al.* 2014).

PHYB se sintetiza en el citoplasma y espontáneamente se une a la fitocromobilina, formando la holoproteína phyB en su estado inactivo (Pr), la cual a su vez forma dímeros. En este estado phyB absorbe principalmente luz roja ($\lambda=660\text{nm}$). La percepción de luz de esta longitud de onda induce un cambio conformacional hacia la forma activa, Pfr, con una velocidad dada por la constante k_1 . Este cambio es reversible, ya que ante la absorción de luz rojo lejano ($\lambda=730\text{nm}$) Pfr revierte a la forma inactiva Pr, con una velocidad dada por la constante k_2 (Fig. I.3). k_1 y k_2 dependen de la calidad y cantidad de la luz incidente. Estas son las denominadas reacciones de fotoconversión del fitocromo. Debido a que los espectros de absorción de Pr y Pfr se solapan considerablemente, dependiendo de la calidad de luz incidente se establece un fotoequilibrio dinámico entre las dos formas.

La forma activa, Pfr, tiene un estado de energía mayor que Pr y es inestable. Consecuentemente el Pfr puede revertir a Pr en una reacción que no depende de la luz, ya que acontece aún en oscuridad, pero que depende de la temperatura, denominada reversión térmica o reversión oscura (Schäfer, E., Schmidt W. 1974; Hennig, L. *et al.* 2001). Esta reacción se evidenció estudiando la abundancia de Pfr en plantas etioladas tratadas con un pulso de luz, que induce la formación de Pfr, e incubadas en oscuridad durante varias horas. Las mediciones clásicas de esta reacción demostraron que su velocidad, k_r , es mucho menor que la de las reacciones de fotoconversión k_1 y k_2 . Es por esto que su efecto en la determinación de los niveles de Pfr en plantas cultivadas en luz ha sido desestimado. Sin embargo, los niveles de Pfr que se establecen bajo irradiación continua son menores a los esperados en base a las reacciones de fotoconversión (Klose, C. *et al.* 2015).

Recientemente, el grupo de Eberhard Schäfer en la universidad de Freiburg, Alemania, describió un nuevo mecanismo que podría explicar estas diferencias. Como se mencionó anteriormente, phyB forma dímeros. Dado que cada monómero puede existir en la forma activa o inactiva, existen tres dímeros posibles: Pr-Pr (D0), Pr-Pfr (D1) o Pfr-Pfr (D2). La actividad biológica de phyB se adjudica al homodímero activo, D2. En base a modelados matemáticos, se encontró que la velocidad de reversión de cada monómero depende de la conformación de su compañero. El Pfr contenido en homodímeros activos, D2, revierte muy lentamente, con una velocidad comparable a las descritas previamente. Sin embargo, el Pfr contenido en heterodímeros D1 revierte muy rápidamente, con una velocidad comparable con las reacciones de fotoconversión. Entonces se pueden describir dos reacciones de reversión, siendo k_{r2} la constante de reversión lenta, y k_{r1} la constante de reversión del heterodímero, rápida (Fig. I.3), (Klose, C. *et al.* 2015). Este mecanismo fue el fundamento de muchas de las hipótesis de este trabajo y será clave para la interpretación de algunos de los resultados obtenidos en esta tesis.

El gen *PHYB* se transcribe en todos los órganos de la planta. Su expresión no varía significativamente en respuesta a estímulos ambientales o en diferentes órganos (Winter, D. *et al.* 2007). Aunque no muestra un ritmo de expresión muy fuerte, se puede detectar un cierto control por el reloj circadiano sobre su expresión, con un pico entre las -1 y 1 h del día, dependiendo de la condición (Mockler, T. *et al.* 2007). La abundancia de la proteína está controlada a nivel de su degradación, en un proceso que involucra la ubiquitinación. Se ha propuesto que la ubiquitin ligasa COP1 está involucrada en este proceso, aunque su actividad no sería suficiente (Jang, I.C. *et al.* 2010). Recientemente se describió que las E3 ubiquitin

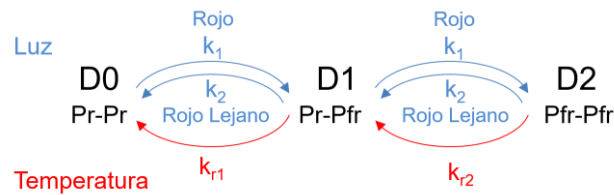


Figura 1.3 - Modelo de tres etapas de la regulación de la actividad de phyB.

Se muestran las tres formas en las que se pueden encontrar los dímeros de phyB: D0 o Pr-Pr, el homodímero inactivo, D1 o Pr-Pfr, el heterodímero, y D2 o Pfr-Pfr, el homodímero activo que es el que tiene actividad biológica. Además, se muestran las reacciones de foto-conversión mediadas por luz roja (k_1) y luz roja lejana (k_2), que dependen del espectro de la luz incidente, y k_{r1} y k_{r2} , las reacciones de reversión térmica que no dependen de la luz. Adaptado de (Klose, C. et al. 2015).

ligasas LRB1 y LRB2 interactúan con phyB y lo degradan durante la des-etiolación, en un proceso dependiente de los factores de transcripción de la familia PIF (Ni, W. et al. 2014). Sin embargo, en plantas des-etioladas, la exposición a la sombra de plantas vecinas no modifica los niveles de proteína de phyB (Leivar, P. et al. 2012). En plantas desetioladas no se han observado cambios significativos en la abundancia de la proteína en respuesta a cambios en la temperatura (Jung, J.H. et al. 2016).

Mecanismos de regulación de la reversión térmica.

La reversión térmica de phyB depende fuertemente de su secuencia aminoacídica, del contexto celular, y de modificaciones post-traduccionales de la proteína.

En cuanto a la estructura primaria de la proteína, la región N-terminal cercana a la zona de unión del cromóforo (dominio GAF) tiene un rol preponderante. Ciertas mutaciones en esta zona afectan específicamente a la reversión térmica, sin modificar las reacciones de fotoconversión. Las mutaciones R352A, R582A y Y361F (siendo la primera letra el aminoácido original, la segunda el aminoácido que se origina de la mutación, y el número la posición de la sustitución) inhiben fuertemente la reversión, mientras que la mutación R322A la acelera. Estos resultados se obtuvieron *in vitro*, por medio de espectrofotometría a partir de soluciones conteniendo el PSM de phyB expresado en bacterias. *In vivo*, la complementación de mutantes nulas phyB con variantes conteniendo las mutaciones mencionadas causaron diferencias en la elongación del hipocotilo en respuesta a la luz roja. Las variantes con menos reversión muestran hipocotilos más cortos y gránulos nucleares más grandes, mientras que la variante inestable mostró hipocotilos largos y menor formación de gránulos (Zhang, J. et al. 2013). Estas líneas se utilizaron durante el transcurso de esta tesis para evaluar los efectos de la reversión térmica en la respuesta de las plantas a variables ambientales.

Otras variantes de phyB, originalmente identificadas por su respuesta diferencial a la luz roja durante la elongación del hipocotilo fueron posteriormente caracterizadas encontrando que el efecto se debía a modificaciones en la velocidad de reversión térmica. La mutante hipersensible a la luz phyB-401 presenta una mutación en el residuo 564, que estabiliza el Pfr (Ádám, É. et al. 2011). La mutante phyB-101, que presenta un fenotipo de pérdida de función, lleva una mutación en la posición 812, en el segundo motivo PAS en el dominio C-terminal, que

causa una mayor tasa de reversión térmica (Elich, T.D. *et al.* 1997). Esto pone de manifiesto que otras regiones de la proteína, más alejadas de la zona de unión al cromóforo, también tendrían un rol regulatorio de la reversión.

Además de la secuencia aminoacídica, el contexto celular también es importante. En el caso de phyA, las accesiones Columbia-0, Landsberg *erecta* y Wassileskija no presentan reversión térmica detectable. Sin embargo, en la accesión RLD sí se observa reversión térmica, aunque la secuencia aminoacídica de su phyA es exactamente igual a la del phyA de Columbia-0 (Eichenberg, K. *et al.* 2000). En el caso de phyB, al expresar la proteína en levaduras utilizando ficocianobilina como cromóforo se observó una primera fase de reversión rápida pero no se logró una completa reversión a Pr, indicando que en levaduras algún componente celular afecta a la reversión (Sweere, U. *et al.* 2001).

Finalmente, ciertas modificaciones post-traduccionales también afectan a la reversión térmica. La fosforilación en la Ser86 acelera la reversión (Medzihradzky, M. *et al.* 2013). Por otro lado, la interacción con la proteína ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 4 (ARR4) reduciría la reversión *in vivo* (Sweere, U. *et al.* 2001).

Los gránulos nucleares que contienen phyB o *photobodies*.

Mientras que el Pr se sintetiza en el citosol, el fitocromo activo se localiza en el núcleo (Yamaguchi, R. *et al.* 1999; Kircher, S. *et al.* 2002). La localización nuclear es necesaria para que phyB medie las respuestas a la luz (Huq, E. *et al.* 2003). Esto es consistente con el hecho de que gran parte de la respuesta a la luz mediada por phyB se basa en una fuerte reprogramación del transcriptoma (Casal, J.J. *et al.* 2004; Pacín, M. *et al.* 2016). Este mecanismo es común para otros fotorreceptores: de los receptores de luz descriptos hasta el momento, al menos 10 (UVR8, cry1, cry2, fkf1, lkp2, phyA-E) se localizan en el núcleo, donde regularían la expresión génica modificando la abundancia o actividad de reguladores transcripcionales. Una vez dentro del núcleo, phyB se localiza tanto en el nucleoplasma como en gránulos nucleares denominados *photobodies* (Yamaguchi, R. *et al.* 1999). La formación de gránulos también es común entre los fotorreceptores. Además de phyB, los restantes fitocromos, cry1, cry2 y UVR8 también forman gránulos nucleares al ser activados por la luz (Van Buskirk, E.K. *et al.* 2012). En general, estos gránulos fueron visualizados en plantas sobreexpresantes para la proteína de interés fusionada a proteínas fluorescentes como GFP. Sin embargo, cabe destacar que los gránulos formados por phyA han sido visualizados mediante inmuno localizaciones en plantas salvajes, lo que demuestra que no son artefacto de la sobreexpresión (Hisada, A. *et al.* 2000).

Aunque se han descrito variantes de phyB con cierta respuesta a la luz que no forman gránulos, la formación de los mismos es necesaria para que phyB pueda cumplir todas sus funciones (Van Buskirk, E.K. *et al.* 2014), y la presencia de los mismos se correlaciona con la respuesta fotomorfológica. Por ejemplo, una variante de phyB constitutivamente activa causada por una mutación en un residuo Tyr altamente conservado forma gránulos aún en oscuridad (Su, Y.S. *et al.* 2007). Por otro lado, entre las mutaciones puntuales que afectan la reversión térmica mencionadas anteriormente, aquellas que aceleran la reversión presentan menor formación de gránulos mientras que las que estabilizan el Pfr presentan más gránulos de mayor tamaño (Zhang, J. *et al.* 2013). Durante la des-etiolación, la abundancia de gránulos correlaciona con la abundancia de Pfr de phyB estimada en base a la intensidad de luz

incidente (Chen, M. *et al.* 2003). Los photobodies se estabilizan con la exposición prolongada a altas relaciones R/RL (Kevei, E. *et al.* 2007).

La formación y permanencia de gránulos está regulada por el reloj circadiano. La formación de gránulos en plantas sometidas a ciclos de luz/oscuridad durante varios días podría preceder a la percepción de la luz (Kircher, S. *et al.* 2002). Recientemente se identificó a PCH1 como un factor regulador de la biogénesis de los photobodies, que interactúa con phyB y es a su vez regulado por el reloj circadiano, favoreciendo la integración de señales de luz y los ritmos endógenos (Huang, H. *et al.* 2016).

Hasta el momento, no se conoce cómo se modifica la localización subnuclear de phyB en respuesta al sombreado por plantas vecinas. Desde el descubrimiento de la existencia de los photobodies se ha desarrollado un amplio debate acerca de sus funciones:

Una hipótesis es que son sitios de almacenamiento de fotorreceptores activos que no son necesarios para la señalización. Este modelo considera que la actividad de phyB ocurre en el nucleoplasma y los gránulos funcionarían como un reservorio dinámico. En concordancia con este modelo, la secuencia N terminal de phyB fusionada a un dominio de dimerización y a una señal de localización nuclear (NLS) induce algunas respuestas a la luz pero no se localiza en photobodies (Matsushita, T. *et al.* 2003; Van Buskirk, E.K. *et al.* 2014). Sin embargo, como se verá más adelante, la mayor parte de la evidencia sugiere que phyB estaría cumpliendo alguna función en los gránulos.

Una segunda hipótesis es que los photobodies funcionarían como sitios de degradación de proteínas. Este modelo se basa en que muchas proteínas que localizan en photobodies son posteriormente degradadas, y muchos componentes de los photobodies están relacionados con la degradación de proteínas, como por ejemplo los miembros del complejo ubiquitin ligasa COP1 y SPAs (Van Buskirk, E.K. *et al.* 2012). Durante la des-etiolación, phyA y su target, el regulador negativo de la fotomorfogénesis PIF3 colocalizan en photobodies antes de ser degradados (Al Sady, B. *et al.* 2006). Por otro lado, la actividad de phyB implica la inactivación de los factores de transcripción de la familia PIF. Recientemente se ha demostrado que como parte del mecanismo de inactivación tanto los PIF como phyB son degradados por E3 ligasas de la familia LRB (Ni, W. *et al.* 2014). Sin embargo, aún se desconoce si el proteasoma se localiza en photobodies. De hecho AtS6A y At59 (componentes de subunidades regulatorias del proteasoma), CUL4 y DDB1 (otros dos componentes importantes del complejo CUL4-DDB1-COP1-SPA), y COP9 (que regula la actividad de las CUL-E3 ligasas) se localizan en el núcleo pero hasta ahora no se las localizó específicamente en gránulos (Chamovitz, D.A. *et al.* 1996; Kwok, S.F. *et al.* 1999; Zhang, Y. *et al.* 2008). En base a estos datos se puede suponer que los sustratos de degradación podrían estar siendo marcados en los photobodies y posteriormente degradados en el nucleoplasma. Por otro lado, no todos los targets de phyB son degradados. Por ejemplo, PIF7 se localiza en photobodies pero es estable aún en luz (Leivar, P. *et al.* 2008).

Otra posible función de los photobodies es que estén involucrados en la regulación transcripcional. A favor de esta idea, muchos de los factores que localizan en los photobodies son reguladores transcripcionales. Se ha propuesto que estos factores podrían estar asociados a la cromatina, acercándola así a otros reguladores transcripcionales presentes en los gránulos. De este modo los gránulos podrían actuar como centros de organización regulando la

expresión de genes de respuesta a la luz (Van Buskirk, E.K. *et al.* 2012). A favor de este modelo, recientemente se ha encontrado que el factor TZP (por Tandem Zinc-finger-Plus) es un regulador transcripcional, que forma parte de los photobodies y que requiere de phyB para asociarse con las regiones promotoras de sus genes target (Kaiserli, E. *et al.* 2015).

Se ha propuesto que cuando phyB se localiza en gránulos nucleares disminuye la velocidad de reversión térmica debido a la interacción con factores que colocalizan en estos gránulos (Rausenberger, J. *et al.* 2010; Klose, C. *et al.* 2015). Esta hipótesis se basa en dos evidencias. Por un lado, en levaduras la reversión térmica es más rápida que en plantas. Los autores adjudican esta diferencia a la existencia de gránulos nucleares en plantas, que impedirían la reversión oscura del fitocromo. Por otro lado, mutantes que no forman gránulos mantienen algunas respuestas a la luz, pero pierden la respuesta a largo plazo, y los autores lo adjudican a un aumento en la tasa de reversión térmica. Aunque esta función de los gránulos está relativamente admitida y forma parte de modelos de matemáticos sobre la acción de phyB (Rausenberger, J. *et al.* 2010), no hay suficiente evidencia experimental para poder aseverarlo.

Cascada de señalización río abajo de phyB.

Una buena parte de la acción de la luz sobre la fisiología de la planta mediada por phyB se puede explicar por cambios a nivel transcripcional. El fitocromo activo, en el núcleo, interactúa con factores de transcripción del tipo bHLH denominados PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 1 (PIF1), PIF3, PIF4, PIF5 y PIF7, a través de su dominio APB (por sus siglas del inglés Active phyB Binding) (Leivar, P. *et al.* 2011). Como resultado de esta interacción los PIF son fosforilados, causando en algunos casos su degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma, y en otros casos impidiendo su unión a los promotores de los genes target (Leivar, P. *et al.* 2011; Park, E. *et al.* 2012). Recientemente se ha demostrado que los PIF también regulan la abundancia de phyB, ya que, al menos durante la des-etiolación, la E3 ubiquitin-ligasa LIGHT RESPONSE BTB (LRB) se asocia al complejo PIF3-phyB, degradando conjuntamente al receptor y a los factores de transcripción (Ni, W. *et al.* 2014). Este mecanismo funcionaría como un sistema de atenuación de la respuesta a la luz al menos en los primeros minutos de la respuesta durante la des-etiolación.

Paralelamente a la acción negativa de phyB sobre los PIFs, se ha propuesto que phyB tendría la capacidad de regular directamente la transcripción uniéndose a las regiones promotoras de sus genes target. En este mecanismo, la interacción de phyB con los PIF favorecería la asociación del fotorreceptor con la cromatina, ya que este no tiene dominios de unión al ADN (Martínez-García, J.F. *et al.* 2000; Jung, J.H. *et al.* 2016). Este mecanismo de regulación directa de la transcripción se ha detectado también en el caso de phyA (Chen, F. *et al.* 2014).

Los PIF regulan genes que controlan el crecimiento, ya sea de manera directa, como genes que codifican para expansinas, o indirectamente modulando la síntesis y la respuesta a la hormona del crecimiento auxina (Lucas, M. *et al.* 2014). En la respuesta de escape al sombreado este efecto se debe principalmente al aumento de la expresión de los genes *YUCCA*, que codifican para enzimas limitantes en el último paso de la síntesis de auxinas (Hornitschek, P. *et al.* 2012; Li, L. *et al.* 2012). En respuesta a la temperatura PIF4 se une a los promotores de *TAA1*, *CYP79B2* y *YUC8*, genes involucrados en la síntesis de auxinas, aumentando los niveles de estas hormonas en respuesta a las altas temperaturas (Franklin, K.A. *et al.* 2011; Sun, J. *et al.* 2012).

Cabe destacar que los PIF son regulados a otros niveles además del efecto directo de phyB sobre su abundancia o actividad. Proteínas de la familia DELLA interactúan con los PIF por su sitio de unión al ADN inhibiendo su actividad transcripcional (De Lucas, M. *et al.* 2008; Feng, S. *et al.* 2008). Por otro lado, la proteína ELF3 también regula a nivel transcripcional y post-traducciona la abundancia y actividad de PIFs (Nieto, C. *et al.* 2015). Tanto las DELLA como ELF3 son reguladas por la luz y la temperatura. La relación y el balance entre estas regulaciones y la regulación mediada por phyB no está del todo clara. Por otro lado, los PIF no solo modulan la respuesta a auxinas sino también están involucrados en la vía de señalización de otras hormonas como giberelinas y brasinosteroides (De Lucas, M. *et al.* 2008; Lucas, M. *et al.* 2014). Durante el día los PIF presentan un patrón rítmico de expresión y acumulación de la proteína (Nozue, K. *et al.* 2007; Seaton, D.D. *et al.* 2015). En combinación con el control post-traducciona por parte de phyB y otras proteínas se obtienen ritmos de abundancia de la proteína (Nozue, K. *et al.* 2011). Debido a lo mencionado, se ha propuesto a los PIFs como integradores de señales ambientales, regulando finamente el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Leivar, P. *et al.* 2011).

Durante la des-etiolación y el desarrollo de la plántula los PIF cumplen un rol preponderante (Leivar, P. *et al.* 2011). Mutantes simples y múltiples de los PIF tienen un fenotipo hipersensible a la luz, caracterizado por hipocotilos más cortos, cotiledones más grandes y mayor acumulación de clorofila que las plantas salvajes (Huq, E. *et al.* 2002; Kim, J. *et al.* 2003; Fujimori, T. *et al.* 2004; Huq, E. *et al.* 2004; Monte, E. *et al.* 2004; Leivar, P. *et al.* 2008). En la respuesta de escape al sombreado los genes PIF4, PIF5 y PIF7 son indispensables (Lorrain, S. *et al.* 2008; Li, L. *et al.* 2012). Las plantas mutantes simples, dobles o triples para estos genes presentan gradualmente menor respuesta a los cambios en la calidad de luz, mientras que las sobreexpresantes presentan un fenotipo similar al de plantas sombreadas. En respuesta al sombreado por plantas vecinas se inhibe la degradación de PIF4, permitiendo su acumulación (Lorrain, S. *et al.* 2008). PIF4 es necesario para la respuesta a la temperatura (Koini, M.A. *et al.* 2009). Aumentos de la temperatura aumentan su expresión (Koini, M.A. *et al.* 2009; Stavang, J.A. *et al.* 2009) e inhiben su degradación (Foreman, J. *et al.* 2011). En concordancia con estas observaciones, la mutante *pif4* pierde la respuesta a las altas temperaturas (Koini, M.A. *et al.* 2009; Stavang, J.A. *et al.* 2009; Wigge, P.A. 2013).

Paralelamente a la acción mediada por los PIF, phyB también controla la expresión génica inhibiendo la actividad de la RING E3 ubiquitin ligasa COP1. Esta proteína marca a sus proteínas target para su degradación mediada por el proteasoma 26S (Lau, O.S. *et al.* 2012). Entre los targets de COP1 se encuentran varias proteínas promotoras de la fotomorfogénesis, por ejemplo, HY5, HYH y HFR1. Durante la des-etiolación, COP1 es excluido del núcleo de manera dependiente de los fitocromos y criptocromos, permitiendo la acumulación de HY5 y la respuesta a la luz (Osterlund, M.T. *et al.* 2000; Pacín, M. *et al.* 2014).

Aunque *in vitro* COP1 tiene la capacidad de ubiquitinar proteínas independientemente de otros factores, *in vivo* lo hace como parte de un complejo formado por las proteínas SUPPRESSOR OF PHYA-105 1 (SPA1), SPA2, SPA3 y SPA4, aumentando su actividad ubiquitin ligasa (Zhu, D. *et al.* 2008). Además del mecanismo de exclusión nuclear mencionado anteriormente, los fitocromos y los criptocromos activados por la luz reducen la actividad de COP1 impidiendo la interacción con SPA1 en el núcleo (Lian, H.L. *et al.* 2011; Sheerin, D.J. *et al.*

2015). Las mutantes *cop1* y *spa1 spa3 spa4* cultivadas en oscuridad presentan un fenotipo des-etiolado, con cotiledones expandidos e hipocotilo corto (Deng, X.W. *et al.* 1992; Laubinger, S. *et al.* 2004). Las mutantes *cop1* y *spa1 spa3 spa4* también tienen disminuida la respuesta de escape al sombreado (Rolauffs, S. *et al.* 2012).

COP1 está fuertemente relacionado con el reloj circadiano. Por un lado, su expresión muestra un patrón rítmico, con un pico de expresión durante la noche (Winter, D. *et al.* 2007). Por otro lado, las mutantes de este gen presentan defectos en la expresión de genes controlada por el reloj circadiano, afectando por ejemplo la respuesta fotoperiódica de la floración (Jang, S. *et al.* 2008; Yu, J.W. *et al.* 2008). COP1 también tiene un rol en la respuesta a la temperatura, ya que las mutantes *cop1* y *spa1 spa3 spa4* no responden al aumento de temperatura (Delker, C. *et al.* 2014). La regulación de COP1 por la temperatura todavía no está del todo clara. Se ha reportado que en hojas de la roseta la expresión del gen *COP1* aumenta con la temperatura, mientras que la estabilidad de la proteína COP1 disminuye (Jang, K. *et al.* 2015). En raíces, las bajas temperaturas reducen la abundancia de COP1 en el núcleo, probablemente por un mecanismo de exclusión (Catalá, R. *et al.* 2011).

En conclusión, es evidente que existe una fuerte interacción entre las respuestas a los cambios en las condiciones lumínicas y la temperatura, no sólo a nivel de las respuestas que controlan sino también a nivel de los mecanismos moleculares subyacentes.

Objetivos

El objetivo de esta tesis fue evaluar la interacción entre las vías de señalización de luz y temperatura en el control de la morfogénesis de plantas de Arabidopsis, focalizándonos en su efecto sobre la actividad del receptor de luz phyB y dos de sus targets más importantes, COP1 y PIF4.

El primer objetivo fue evaluar la hipótesis que debido a la reversión térmica los cambios en irradiancia asociados al sombreado por plantas vecinas modifican la localización sub-nuclear de phyB. Como pre-requisito fue necesario estudiar los cambios en localización de phyB causados por la relación R/RL, pues este aspecto de la luz tiene efectos bien establecidos sobre la dinámica de phyB, pero su impacto sobre la localización del mismo no ha sido descrito.

El segundo objetivo fue evaluar el efecto de la temperatura y la interacción con la señalización desencadenada por la luz. La hipótesis fue que los cambios en la temperatura impactarían sobre la reversión térmica de phyB, reduciendo su actividad a mayores temperaturas y de esta forma explicando al menos parte de la respuesta termomorfogénica.

El tercer objetivo fue evaluar el efecto de las señales de luz y temperatura sobre la abundancia de los blancos de acción de phyB, y en situaciones de ciclos de luz-oscuridad. La hipótesis fue que al menos parte del efecto de la luz y la temperatura sobre la actividad de phyB se vería reflejada en la abundancia de sus blancos de acción.

***Materiales y
 Métodos***

Materiales y métodos

Material vegetal

Todos los experimentos de esta tesis se realizaron con plantas de *Arabidopsis thaliana*. Los genotipos salvajes utilizados fueron Columbia (Col) y Landsberg *erecta* (Ler). Los alelos mutantes utilizados fueron *phyB-9* (Reed, J.W. *et al.* 1993), *phyA-211* (Reed, J.W. *et al.* 1994) en el fondo Col y *phyA-201* (Nagatani, A. *et al.* 1993) y *phyB-5* (Reed, J.W. *et al.* 1993) en el fondo Ler.

El análisis de la localización subcelular de phyB en respuesta a la irradiancia y a la temperatura durante el fotoperiodo se realizaron con la línea PGB, que expresa phyB bajo el control del promotor 35S en el fondo Ler (Yamaguchi, R. *et al.* 1999).

Para los experimentos de espectroscopía *in vivo* se utilizaron plántulas que sobreexpresan phyB en el fondo mutante nulo *phyA-201* (Sweere, U. *et al.* 2001).

Las líneas mutantes *phyB-9* complementadas con variantes mutantes puntuales de phyB (phyB-YFP, phyB^{Y361F}-YFP o phyB^{R582A}-YFP) provienen del laboratorio de Richard Vierstra, Universidad de Washington (Zhang, J. *et al.* 2013; Burgie, E.S. *et al.* 2014). Las mutaciones puntuales introducidas consisten en la sustitución de arginina por alanina en la posición 582 (R582A) y tirosina por fenilalanina en la posición 361 (Y361F). Estas mutaciones presentan una reversión térmica reducida (retienen un 3,5% y 2,6% respectivamente) pero no afectan a la capacidad de fotoconversión de la proteína.

Para las mediciones de la elongación del hipocotilo en respuesta a la combinación de temperatura y diferentes irradiancias se utilizaron dos líneas independientes de cada variante: salvaje, R582A y Y361F. Estas líneas acarrean el ADNc de phyB salvaje o mutado bajo el control del promotor *PHYB* en el fondo mutante *phyB-9*. Las dos líneas salvajes y las de Y361F presentan cantidades de la proteína phyB comparables con plantas salvajes. En cuanto a las líneas de R582A, la línea 1 genera niveles de proteína comparables con las plantas salvajes pero la línea 2 genera niveles mucho más bajos de proteína (Zhang, J. *et al.* 2013).

Las líneas utilizadas para los experimentos de microscopía confocal consisten del ADNc de phyB con las mutaciones correspondientes bajo el control del promotor ubiquitina 10 (*UBQ10*) y fusionado a su extremo 3' la secuencia codificante para YFP en el fondo *phyB-9*. Estas líneas ya fueron validadas anteriormente (Zhang, J. *et al.* 2013).

Para analizar la localización subcelular de COP1 se utilizó la líneas *35S::YFP::COP1* en el fondo *cop1-4* (Oravec, A. *et al.* 2006). La localización subcelular de PIF4 se analizó utilizando la línea *pPIF4::PIF4::GFP* en el fondo *pif4* generada en el laboratorio de Salomé Prat (CNB, CSIC, Madrid).

Reproducción del material vegetal

Las semillas se sembraron en agar agua 0.8%, en cajas de acrílico de 3 x 4 x 2 cm (largo-ancho-alto). Se estratificaron durante 3-5 días a 4°C, oscuridad. Luego de trasladaron a un cuarto de cultivo, con fotoperiodo de 16 h, luz provista por tubos fluorescentes. Al cabo de 3-6 días se

trasplantaron las plántulas germinadas a macetas conteniendo perlita, vermiculita y turba en proporciones 2:2:1. Se regó periódicamente con Hakaphos rojo (COMPO). Una vez secas las silicuas se las cosechó y se las guardó en tubos eppendorf de 1,5 ml con un orificio en la tapa. Se conservaron en frascos conteniendo silica durante al menos 15 días y luego se las guardó en cajas a temperatura ambiente o a largo plazo en cuartos fríos.

Medición del ángulo de inserción de las hojas

Las plantas fueron cultivadas durante dos semanas en fotoperiodo de día largo (16:8 Luz-Oscuridad) utilizando una lámpara de sodio de alta presión a 22°C hasta alcanzar el estado de roseta 2.5 (Boyes, D.C. *et al.* 2001). El día del tratamiento, dos horas después del comienzo del día fueron trasladadas a los diferentes tratamientos, indicados al pie de cada figura.

Al cabo de diferentes tiempos de tratamiento se midió el ángulo de inserción de las hojas con respecto a la horizontal, con un transportador. Las dos hojas más jóvenes y las dos más viejas fueron descartadas, y se midieron las 4 a 6 hojas restantes de cada roseta. El valor promedio se tomó como réplica. En el caso de mutantes *phyB*, se midieron menos hojas debido a que este genotipo induce tempranamente la floración.

Para los experimentos de la figura 1.12 se reemplazó la luz provista por la lámpara de sodio por luz natural. Los experimentos se realizaron en la terraza del instituto Leloir, Buenos Aires, días de verano.

En los experimentos donde la luz blanca fue suplementada con rojo lejano se utilizó una lámpara de LED Lumi Grow, con pico de emisión en 740nm (LumiBulb-FR, LumiGrow, <http://www.lumigrow.com>).

Medición de la elongación del hipocotilo

Las semillas se sembraron en agar agua, se estratificaron por 4-6 días (oscuridad, 4°C) y luego fueron trasladadas a las condiciones de crecimiento. Las placas se colocaron en posición vertical, con el fin de poder registrar el tamaño de las plantas mediante fotografías. Al principio del tratamiento y al cabo de 9 h (final del día) se tomaron fotos de cada placa conteniendo plantas con una cámara Olympus SZ-12, de 14 Mpx. Como resultado se obtuvieron dos imágenes de cada planta, una al principio del tratamiento y otra al final, lo que permitió medir la elongación de las mismas durante el tratamiento. Las imágenes fueron analizadas con el software Global Mapper. Mediante este software se adjudicaron coordenadas específicas a las dos imágenes, de modo de superponerlas precisamente. Luego se identificó el extremo superior de cada planta en cada foto y comparando estas coordenadas se calculó la elongación durante las 9h de tratamiento.

Para los experimentos de la figura 2.9 las plantas se cultivaron a 20 °C, 50 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ provista por tubos fluorescentes, fotoperiodo 10 h. Una hora después de comenzar el 4º día de crecimiento fueron trasladadas a las diferentes condiciones experimentales. Las mismas constaron de las 25 combinaciones resultantes de cruzar 5 temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 °C) con 5 irradiancias (1, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), relación R/RL=1 (comparable con la luz solar). Las temperaturas se alcanzaron utilizando aires acondicionados y ventiladores, y en el

caso de las temperaturas menores a 20 °C los experimentos se realizaron en cámaras refrigeradas.

Para los experimentos de la figura 3.3 las plantas fueron cultivadas en condiciones de día corto (fotoperiodo de 8 h) con luz blanca provista por lámparas fluorescentes, $50 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a 22°C o 28°C. Se tomaron fotografías de la s mismas a las 0, 4, 8, 11, 14, 17, 20, 22 y 24 h del día (las 0 h representan el momento en el que se enciende la luz). Se calculó la elongación del hipocotilo promedio por hora en cada intervalo.

Para los experimentos de la figura 3.2 A las plantas se cultivaron durante 3 días bajo fotoperiodo de 10 h, luz blanca relación R/RL=1. 1h después de comenzar el cuarto día la mitad de las plantas fueron transferidas a condiciones de sombreado utilizando dos filtros verdes LEE#089, mientras que el resto de las plantas se mantuvo en condiciones de luz hasta el final del fotoperiodo.

Para los experimentos de la figura 3.2 B las plantas fueron cultivadas durante 4 días en condiciones de luz continua $25 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ provista por tubos fluorescentes. El quinto día la mitad de las plantas se transfirieron a 29 °C mientras que el resto se mantuvo a 22 °C por 9 h.

Espectros de las fuentes de luz utilizadas

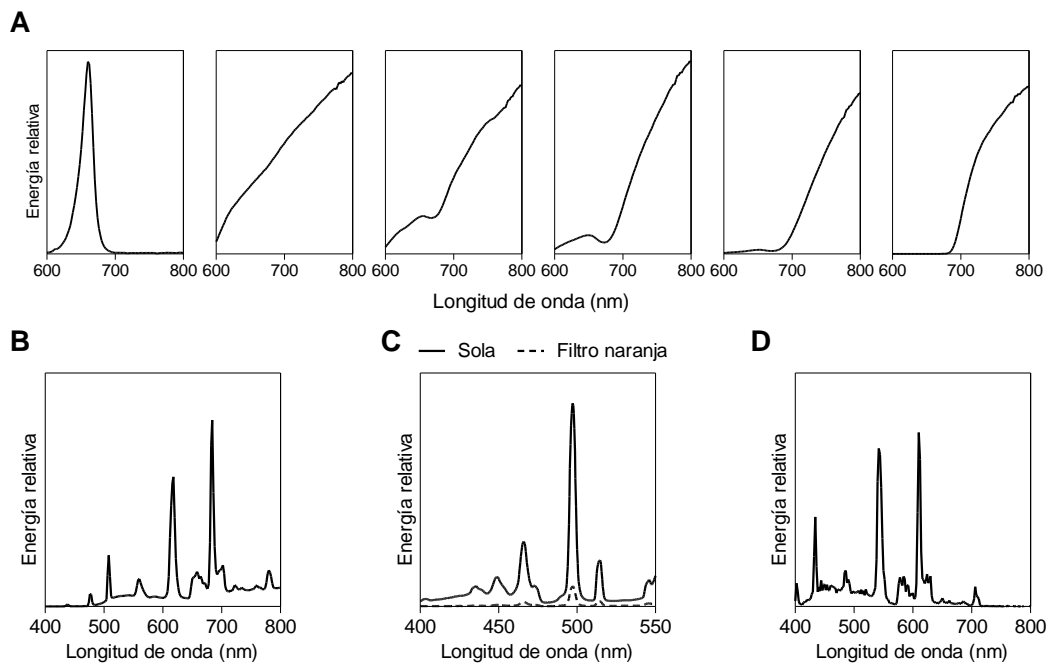


Figura M.1- Espectros de las fuentes de luz utilizadas para los tratamientos.

A - Luz de diferentes relaciones R/RL. De izquierda a derecha: luz roja pura ($330 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) provista por una lámpara Lumi Bulb Red (Lumi Grow). Lámparas incandescentes de 150 W R95 (Phillips) en combinación con filtros amarillo, naranja y rojo (LEE #101, #105 y #106 respectivamente) solos o en combinación con filtros de acetato verdes (LEE #138, 121 o 089) o seis filtros de acrílico Paolini 2031 obteniendo las siguientes mezclas de rojo y rojo lejano (332/743, 220/800, 83/664, 28/618, 21/921, en $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 600-700 nm/700-800 nm). Para evitar que el calor emitido por las lámparas incandescentes modificara la temperatura de las plantas se interpusieron filtros de agua entre las lámparas y las cajas y se generó una corriente de aire continua con un ventilador.

B - Luz blanca, relación R/RL = 1 resultante de la combinación de lámparas fluorescentes y halógenas. Para obtener las diferentes irradiancias (1, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ entre 400 y 700 nm) se utilizaron filtros neutros o diferentes distancias a la fuente.

C - Lámpara de sodio de alta presión 400W Phillips SON con o sin filtro naranja.

D - Lámpara fluorescente.

Microscopía confocal

Las imágenes de microscopía de fluorescencia confocal se tomaron con un microscopio LSM5 Pascal (Zeiss). Se utilizó un objetivo de inmersión en agua (C-Apochromat 40x/1,2; Zeiss). Para observar las proteínas fluorescentes GFP o YFP se excitó con un láser de argón (488 nm) y se detectó la fluorescencia utilizando un filtro BP 505-530. En algunos casos se detectó la fluorescencia de la clorofila excitando con un láser de He-Ne (543 nm) y detectando la fluorescencia con un filtro LP 630. Las imágenes de fluorescencia de la clorofila se utilizaron con el fin de identificar la posición de los cloroplastos, ya que en algunos casos la fluorescencia de este pigmento se filtró en el canal correspondiente al GFP.

Para observar phyB y PIF4 el *pinhole* se cerró hasta obtener un seccionado óptico de 6 μm , mientras que en el caso de COP1 debido a la baja intensidad de fluorescencia de la línea transgénica utilizada el *pinhole* se utilizó totalmente abierto alcanzando un seccionado óptico de 11,5 μm .

En todos los casos las imágenes se tomaron de la epidermis o de las primeras capas subepidérmicas. Los órganos observados se aclaran en cada caso.

En el caso de phyB, las imágenes se tomaron en dos pasos: primero se realizó una imagen de baja calidad del área a analizar, y luego se realizaron ampliaciones 8 x de esa imagen en las zonas de interés, tomando un núcleo por cada foto, y ajustando el foco en cada foto con el fin de optimizar la visualización de gránulos.

Análisis de imágenes

Para cuantificar la abundancia nuclear de COP1 y PIF4 se utilizó el software ImageJ. Las imágenes obtenidas contaban con un canal de detección de la clorofila y otro para detectar GFP o YFP. Los núcleos se identificaron por su forma ahusada, comprimidos contra la pared celular, y en muchos casos se lograba identificar el nucléolo. En todos los casos se indica la fluorescencia nuclear promedio. Para obtener este valor se midió la intensidad promedio del canal correspondiente a la proteína fluorescente en las zonas identificadas como núcleos. Además, se contó el número de núcleos identificados. Por otro lado, utilizando el canal de transmisión y el de clorofila se midió el tamaño de 5-10 células y el tamaño total del área fluorescente. De esta forma se calculó el número de células en el campo. La fluorescencia nuclear promedio se calculó como:

$$\text{Fluorescencia nuclear promedio} = \frac{\text{Número de núcleos} \times \text{brillo nuclear promedio}}{\text{Número de células por campo}} \quad (1)$$

La relativización por el número de células fue necesaria porque en muchos casos los tratamientos generaron cambios en la longitud (y por lo tanto área) de las mismas, modificando la cantidad de células en el campo visual.

Para la cuantificación de los gránulos de phyB a lo largo de la tesis se fueron perfeccionando los métodos. Así, en los experimentos de respuesta a la irradiancia se clasificaron los gránulos por tamaño, definiendo un límite entre grandes y pequeños como menores o mayores a 0,4 μm de diámetro. Luego se contó manualmente la cantidad de gránulos en cada categoría en cada foto utilizando el programa LSM Image Browser.

Luego, para los experimentos de respuesta combinada a la luz y temperatura se desarrolló un método automático de medición. Para esto se modificó un script desarrollado en Matlab (R2008a) previamente desarrollado en el área de microscopía del Instituto Leloir por el Ing. Maximiliano Neme (Perez Pepe, M. *et al.* 2012), con el fin de optimizarlo para este fin. El algoritmo de procesamiento contiene dos piezas de código: un *script* principal, que obtiene la información de los archivos de imágenes presentes en la carpeta especificada, y una función de procesamiento, la cual es llamada desde el *script* principal para cada imagen en la carpeta analizada. Una vez que la función de procesamiento ha analizado todas las imágenes, el *script* principal exporta la información obtenida a un archivo de Excel. Los gránulos se identifican por una correlación bidimensional de la imagen original con tres gránulos modelo seleccionados previamente. Cuando la correlación supera un umbral definido por el usuario, se define un gránulo, y se lo ubica en una máscara binaria. Esta máscara binaria es luego analizada clasificando los gránulos identificados en cinco categorías de tamaño: 0-0,09; 0,09-0,18; 0,18-0,27- 0,27-0,36; 0,35-0,45 en μm^2 o 9-25, 25-50, 50-100, 100-125 o >125 pixeles² (1 pixel=0,06 μm).

Con estos datos calculamos el tamaño promedio de los gránulos como:

$$\text{Tamaño promedio} = \frac{\sum_{i=0}^c N_c \times S_c}{\sum_{i=0}^c N_c} \quad (2)$$

Donde c indica la categoría de tamaño, Nc el número de gránulos de esa categoría y Sc el límite inferior de tamaños en la categoría c.

Paralelamente, se desarrolló otro método automático para analizar las imágenes, utilizando el *software* libre Icy (<http://icy.bioimageanalysis.org/>). El método desarrollado consiste en un análisis en *batch* de las imágenes, donde a cada una se le aplica el mismo procesamiento. El procedimiento aplicado fue un típico protocolo de segmentación, identificación de patrones y cuantificación. El primer paso consistió en identificar los límites del núcleo en cada imagen. Para esto se utilizó el método de segmentación HK means. Previamente se aplicó un filtro anisotrópico que permitió mejorar la definición de los bordes del núcleo y los gránulos. Generamos una ROI (región de interés) con la forma del núcleo de la cual registramos el tamaño y la intensidad de fluorescencia. Además, en esa ROI aplicamos un detector de puntos (Wavelet spot detector) y nuevamente de cada punto registramos el tamaño. La cuantificación del número y tamaño de los gránulos obtenida con este programa fue muy similar a la obtenida con el programa desarrollado en Matlab. Este programa se utilizó en la cuantificación de las figuras 2.6, 2.8 y 3.1.

Método analítico para calcular kr_1 y kr_2 a partir de la abundancia de Pfr por espectrofotometría

La proporción de Pfr con respecto a la abundancia de phyB total (Pfr/Ptot) medida por espectrofotometría *in vivo* se relacionó a la abundancia de los dímeros D0, D1 y D2 (Pr-Pr, Pr-Pfr, Pfr-Pfr) utilizando el método analítico basado en el modelo de tres etapas (Fig. 1.3), (Klose, C. *et al.* 2015), el cual consiste en relacionar las reacciones de fotoconversión (k_1 , k_2) y las de reversión térmica (kr_1 , kr_2) correspondientes a las condiciones experimentales.

kr_1 se calculó a partir del siguiente cálculo (ecuación 3):

$$kr_1 = \frac{(2.k_1^2/Pfr) + (k_1.[2.k_2+2.kr_2]/Pfr) - 2.k_1^2 - 2.k_1.(2.k_2+2.kr_2)}{(2.k_2+2.kr_2)} - k_2 \quad (3)$$

La velocidad de las reacciones de fotoconversión (k_1 , k_2) se calculó utilizando el método propuesto por Kelly y Lagarias (1985).

Los valores de kr_2 se calcularon a partir de experimentos especiales, que consistieron en someter a las plántulas etioladas a un pulso de luz roja saturante seguido de oscuridad a diferentes temperaturas. Los resultados se muestran en la figura 2.5. En este experimento el pool de dímeros D1 decae muy rápidamente, por lo que la reducción en los niveles de Pfr se deben al decaimiento de los dímeros D2, y la velocidad de decaimiento entonces es proporcional a kr_2 . La tasa de decaimiento de Pfr medida corresponde al doble de kr_2 , ya que en estas condiciones los dímeros D1 que se forman decaen muy rápidamente, y su tiempo de persistencia es despreciable.

Cuantificación *in vitro* de phyB.

La cuantificación *in vitro* de la abundancia de Pfr fue llevada a cabo por E. Sethe Burgie en el laboratorio de Richard Vierstra, en la universidad de Washington, Estados Unidos.

La proteína phyB completa, con un tag N-terminal MGSSHHHHHSSSEN LYFQG se expresó en células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) usando un plásmido pBAD Myc Hys (Invitrogen). También se utilizó el plásmido pL-PΦB con el fin de sintetizar *in situ* el cromóforo de phyB, la fitocromobilina (PΦB) (Zhang, J. *et al.* 2013; Burgie, E.S. *et al.* 2014). Los cultivos crecieron en medio Terrific conteniendo 1 mM MgCl₂. Cuando los cultivos alcanzaron una OD₆₀₀ de 1, la temperatura se mantuvo a 16 °C y se agregó Acido 5-aminolevulinico a una concentración final de 20 µg. ml⁻¹. Una hora después se agregó IPTG a una concentración de 1 mM, y una hora después se agregó L-arabinosa a una concentración de 2 g. l⁻¹. Los cultivos crecieron una noche y se cosecharon por centrifugación. Los pellets se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C.

Las células se lisaron en Buffer de lisis, que incluyó 10 % de glicerol, 500 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 30 mM imidazol, 1 mM PMSF, 2 mM 2-mercaptoetanol, 1 tableta por litro de inhibidor de proteasas sin EDTA Roche, y 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.8). El lisado se clarificó por centrifugación, y se colocó en columnas de Ni-NTA (Qiagen). Después de pasar el buffer de lisis la proteína se eluyó con buffer de lisis suplementado con imidazol 300 mM. Luego se intercambió a un buffer conteniendo 10 % glicerol, 20 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoetanol, 1

mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 tableta por litro de inhibidor de proteasas sin EDTA, Roche, y 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.8), y cargada en una columna de Q-sefarosa HP (GE). La proteína se eluyó usando un gradiente lineal de NaCl de 20 a 500 mM, en 20 volúmenes. La fracción de phyB se intercambió a buffer de lisis sin inhibidor de proteasas Roche y se cargó en una columna Ni-IMAC (GE). La proteína se eluyó usando un gradiente de imidazol entre 30 y 150 mM en 40 volúmenes. Se cosechó el segundo pico conteniendo fitocromo y se incubó con proteasa TEV para liberar el tag de histidina N-terminal. La muestra se intercambió a buffer de lisis y se pasó a través de una columna de Ni-NTA equilibrada con el mismo buffer. El eluato se colectó y se concentró a una OD 665 de 1. La proteína purificada se congeló en gotas en nitrógeno líquido. Antes de los ensayos la proteína fue intercambiada a los buffers indicados usando columnas Superose-6 (GE). El buffer en los ensayos contenía 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoetanol, y 50 mM HEPES-KOH pH 7,8.

Las mediciones de abundancia de Pfr se realizaron usando un espectrofotómetro Cary6 (Agilent). La temperatura del ensayo se controló con un circulador frío/calor Isotemp (Fischer Scientific). Las muestras fueron irradiadas desde arriba con un LED a longitud de onda = 660 nm. La irradiancia se calibró utilizando un radiómetro Li-Cor modelo LI-185B. La misma cubeta se utilizó para todas las mediciones. En cada caso se utilizaron 200 μ l de la solución conteniendo phyB con una densidad óptica de 0,2 a $\lambda = 665$ nm.

Cuantificación *in vivo* de phyB.

La cuantificación *in vivo* de phyB fue realizada por Cornelia Klose en el laboratorio del Dr. Eberhard Schafer, Universidad de Freiburg, Alemania.

Para estas mediciones se utilizaron plántulas de Arabidopsis sobreexpresantes de phyB, en fondo mutante *phyA-201*. Para la determinación de kr1 las plantas crecieron en oscuridad por 4 días, y luego fueron expuestas a un pulso de 20 minutos de luz roja (660 nm), $1 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, o diferentes intensidades de una combinación de luz roja y rojo lejano (740 nm) de relación R/RL=1. Estos tratamientos se realizaron a diferentes temperaturas. Inmediatamente después del tratamiento las plantas se transfirieron a hielo y 100 – 120 mg de tejido se colocaron a presión en una cubeta. La medición se realizó con un espectrofotómetro de doble longitud de onda (Ratiospect) a 4 °C. El tiempo entre el fin del pulso de luz y la medición fue aproximadamente de 1 minuto.

La abundancia de Pfr y de fitocromo total se calculó como se describe en la literatura (Hennig, L. *et al.* 1999). Brevemente, la cantidad total de phyB (Ptot) se midió alternando radiación roja y roja lejana y midiendo la absorbancia por seis veces consecutivas, obteniendo la cantidad relativa de fitocromo foto-convertible Δ (ΔA) de la muestra. La diferencia en la absorción de la muestra entre la línea de base al principio de la espectroscopía y el primer tratamiento con rojo lejano en el Ratiospec se consideró como el nivel de Pfr de la muestra relativo al Ptot. Para cada medición el resultado se normalizó al peso de tejido utilizado.

Para la determinación de kr2 las plantas se irradiaron con un pulso de 10 min, $\lambda_{\text{max}}=656$ nm; $20 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, con el fin de obtener la máxima fotoconversión de phyB a la forma Pfr (87%). Luego las plántulas se transfirieron a diferentes temperaturas en oscuridad por hasta 8h y se midió a los tiempos indicados en la figura.

Análisis estadístico

La significancia estadística indicada en los experimentos de respuesta a la irradiancia corresponden a los resultados obtenidos en ANOVA de 1 o 2 factores, seguido de test de Bonferroni para comparar medias entre sí. Los análisis de regresión lineal simple fueron realizados en GraphPadPrism o en Infostat. Los análisis de regresión lineal múltiple se realizaron con el software Infostat. Se consideraron significativos los efectos con $p < 0,05$.

Estimación de la contribución de cada modo de acción de la temperatura sobre la elongación del hipocotilo.

El objetivo del modelado de la elongación del hipocotilo era poder discriminar el impacto de cada factor ambiental sobre la tasa de crecimiento. Para esto una vez generado el modelo se estimó el efecto de la temperatura dependiente de phyB, independiente de phyB y su interacción, calculando la tasa de crecimiento resultante en caso de desestimar cada uno de estos efectos, en cada irradiancia. En primer lugar, se calculó el crecimiento desestimando el efecto inhibitorio de las bajas temperaturas, es decir utilizando los niveles de D2 correspondientes a 30 °C y $T = 30$ °C (línea horizontal). Secuencialmente se incorporaron los efectos de la temperatura sobre D2 en el término $k.D2$, el efecto de la temperatura en la interacción reemplazando los valores de D2 y T en ese término, y finalmente el efecto de la temperatura independiente de phyB reemplazando con las diferentes temperaturas el término $a.([1/T]-[1/30])$. Las zonas sombreadas en la figura M.2 indican la magnitud de los respectivos efectos.

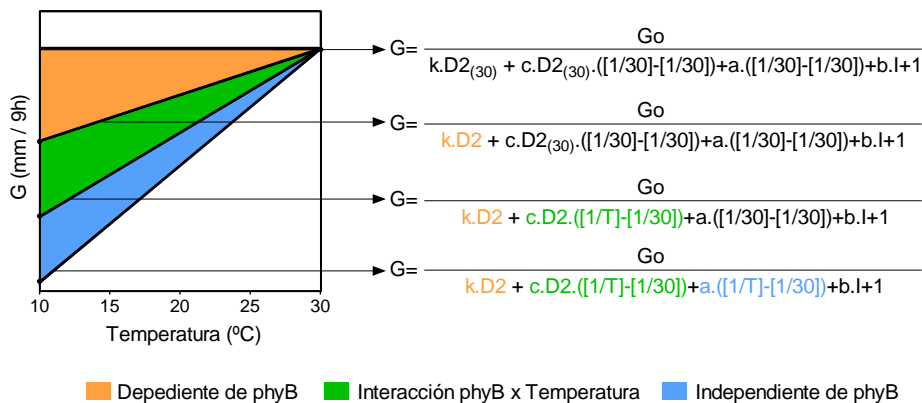


Figura M.2- Representación gráfica de la metodología utilizada para estimar la contribución de cada factor sobre la elongación del hipocotilo, a partir del modelo de la ecuación 6.

Resultados

Resultados

1. Los gránulos de phyB responden a los cambios en la relación R/RL y la irradiancia causados por el sombreado de plantas vecinas.

La localización del phyB responde a los cambios en la calidad y cantidad de luz.

El phyB ha sido tradicionalmente descrito como receptor de la relación R/RL de la luz. Esta relación cambia dependiendo de la posición relativa de una planta con respecto a otras plantas, debido a que los tejidos fotosintéticos absorben la luz visible, incluyendo el rojo, pero reflejan y transmiten la luz de longitudes de onda mayores, como el rojo lejano, por lo que debajo de un canopeo vegetal la relación R/RL es menor que la del sol (que es aproximadamente 1.1). En canopeos densos, además de cambiar la relación R/RL de la luz, en los estratos inferiores también disminuye considerablemente la irradiancia de luz fotosintéticamente activa (PAR, por sus siglas del inglés *Photosynthetically Active Radiation*, rango de longitudes de onda entre 400 y 700 nm). La disminución de la irradiancia genera cambios en las plantas similares a los observados cuando se disminuye la relación R/RL de la luz, como el alargamiento del hipocotilo o la posición más erecta de las hojas (Pierik, R. *et al.* 2004). En parte estos cambios son mediados por los criptocromos, que perciben la disminución de la irradiancia de luz azul (Keller, M.M. *et al.* 2011). Sin embargo, los fitocromos también estarían involucrados en la respuesta. Plantas de *Arabidopsis thaliana* salvajes y mutantes de fotorreceptores fueron cultivadas a alta irradiancia ($200 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) y luego transferidas a condiciones de baja irradiancia ($25 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Como respuesta se evaluó el cambio en el ángulo de inserción de las hojas con respecto a la horizontal, también llamado hiponastia.

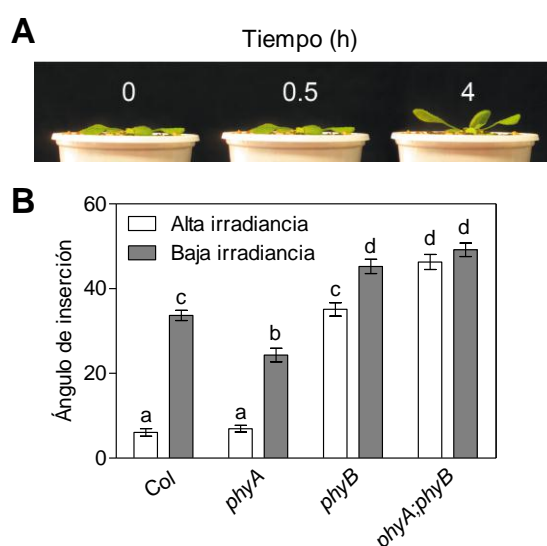


Figura 1.1 - La actividad de fitocromo B es necesaria para la respuesta a los cambios en la irradiancia.

A - Fotos representativas de plantas salvajes utilizadas en el ensayo de hiponastia. Las plantas fueron cultivadas por 2 semanas en condiciones de alta irradiancia ($200 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) y 4 h después del comienzo del día fueron transferidas a condiciones de baja irradiancia ($25 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) por el tiempo indicado antes de tomar las fotos.

B - Ángulo de inserción de las hojas de la roseta con respecto a la horizontal, en plantas salvajes (Col) y mutantes para los fotorreceptores fitocromo A (phyA) y phyB y dobles mutantes, en respuesta a una

disminución de la irradiancia incidente. Las plantas fueron cultivadas por 2 semanas en condiciones de alta irradiancia ($200 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) y 4 h después del comienzo del día fueron transferidas a condiciones de baja irradiancia ($25 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) y medidas 24 h después. Los datos corresponden al promedio \pm error estándar (EE) de al menos 10 plantas independientes por tratamiento. La interacción entre genotipo e irradiancia fue significativa con $P < 0.0001$. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Se observó que en respuesta al tratamiento de baja irradiancia las plantas salvajes aumentaron su ángulo de inserción (hojas más erectas). Las mutantes *phyA*, aunque en menor medida que las plantas salvajes, repitieron la respuesta. Sin embargo, las mutantes *phyB* y las dobles mutantes *phyA phyB* ya tenían sus hojas erectas aún en condiciones de alta irradiancia, y no respondieron de la misma forma que las plantas salvajes al tratamiento (Fig. 1.1 A, B). Esto indica que la presencia de *phyB* es indispensable para la respuesta a la irradiancia. Sin embargo, el efecto observado no indica que *phyB* perciba los cambios en la cantidad de luz. Alternativamente, la mutación podría estar generando una des-represión general de la respuesta hiponástica independiente de las condiciones lumínicas, o debido al fenotipo de la mutante la respuesta podría estar saturada por motivos estructurales. Es por esto que para poder determinar si *phyB* es capaz de percibir los cambios en la irradiancia es necesario evaluar en detalle si su actividad es modificada por la cantidad de luz.

La actividad de *phyB* suele medirse por espectrofotometría in vivo, obteniendo los niveles de *phyB* activo (Pfr) con respecto a la abundancia total de *phyB* (Hennig, L. *et al.* 1999). La limitante de esta técnica es que requiere que las plántulas no contengan pigmentos fotosintéticos ya que estos interfieren en la medición, por lo que las plantas deben ser cultivadas en total oscuridad. Dado que nuestra pregunta biológica se refiere a plantas adultas, completamente des-etioladas, no podemos aplicar esta medición para responderla.

La actividad del fitocromo depende de su localización sub-celular. Las moléculas de *phyB* inactivo (Pr) se ensamblan en el citoplasma y al ser excitados por luz roja se convierten a su conformación activa (Pfr) y migran al núcleo, donde se acumulan en gránulos denominados *photobodies*. Durante la des-etiolación, la cantidad de *photobodies* correlaciona con la actividad de *phyB* (Chen, M. *et al.* 2003). En condiciones de sombreado por plantas vecinas la actividad de *phyB* disminuye. Sin embargo, no se conoce si en respuesta los cambios en la relación R/RL o en la irradiancia, típicos del sombreado por plantas vecinas, *phyB* cambia su localización dentro del núcleo. Con el fin de evaluar esta posibilidad se estudió la localización de la proteína en plantas transgénicas que expresan la secuencia codificante de *phyB* fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor fuerte constitutivo 35S (línea PGB) (Yamaguchi, R. *et al.* 1999). Las plantas se cultivaron por dos semanas en condiciones de alta irradiancia ($200 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) y alto R/RL (4,3) y el día del tratamiento se redujo la relación R/RL a 0,8 utilizando lámparas de rojo lejano. Las imágenes se tomaron de la cara abaxial de la base del pecíolo, que es la zona donde se regula la hiponastia (Polko, J.K. *et al.* 2013).

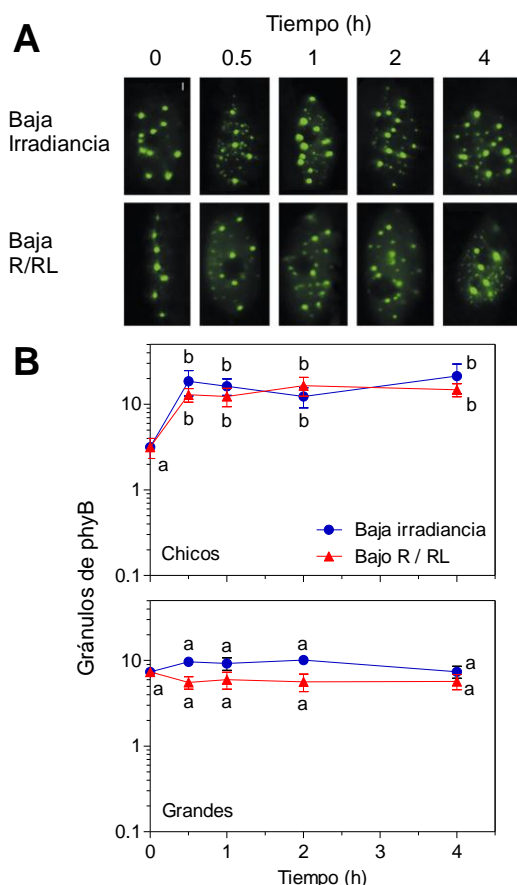


Figura 1.2 - La disminución de la irradiancia genera efectos similares a la reducción de la relación R/RL en la localización subnuclear de phyB.

A - Fotos representativas de núcleos de plantas sobreexpresantes de phyB marcado con GFP (línea PGB) cultivadas en alta irradiancia y alto R/RL en fotoperiodo de 16 h y transferidas a baja irradiancia o baja relación R/RL a diferentes tiempos antes de ser observadas en el microscopio a las 6 h de haber comenzado el día.

B - Cuantificación de los experimentos mencionados en A. Se definió el punto de corte entre gránulos grandes y pequeños en $0,4 \mu\text{m}$ de diámetro. Los datos corresponden a la media \pm EE de 8 plantas independientes. El efecto de la irradiancia y de la relación R/RL fue significativo con $P < 0.01$ y $P < 0.001$ respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Se observó que las plantas cultivadas en alta irradiancia y alto R/RL mostraban gránulos nucleares grandes, y en poca cantidad (Fig. 1.2 A). Al disminuir la relación R/RL se observó la aparición de muchos gránulos pequeños (Fig. 1.2 A, B). Esta observación nos permitió definir dos categorías de gránulos, los grandes, con diámetro mayor a $0,4 \mu\text{m}$ y los pequeños, con diámetro menor a $0,4 \mu\text{m}$. Cuantificando por separado las dos poblaciones, observamos que los gránulos pequeños aparecieron en la primera media hora de tratamiento y se mantuvieron por al menos las 4 h posteriores (Fig. 1.2 B). Los gránulos de mayor tamaño no cambiaron su abundancia en respuesta a este tratamiento.

Llamativamente, en plantas cultivadas a alta irradiancia y alta relación R/RL, la disminución de la irradiancia de $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a $25 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ tuvo prácticamente el mismo efecto en la distribución de tamaños de los gránulos de phyB. Con una cinética muy similar a la respuesta a

la disminución en la relación R/RL, en respuesta a la baja irradiancia también aumentó el número de gránulos pequeños, mientras que los gránulos grandes se mantuvieron estables (Fig. 1.2). Este es un indicador de que, al menos a nivel de su localización subcelular, phyB responde a la irradiancia.

La respuesta celular precedió a los cambios morfológicos, aunque estos también fueron rápidos. Al cabo de 4 h de tratamiento el ángulo de inserción de las hojas fue 9 ± 1 grados mayor en respuesta a la irradiancia y 8 ± 1 grados mayor en respuesta a la disminución de la relación R/RL con respecto a los controles (promedio \pm EE de al menos 10 plantas).

Debido a que las longitudes de onda necesaria para excitar a GFP podrían estar activando a phyB y causar la formación de gránulos, evaluamos la presencia de gránulos en partes de la hoja donde nunca se irradió, haciendo foco en una parte de la hoja y tomando la imagen en otra. El resultado fue el mismo que cuando sacamos las fotos normalmente (Fig. S.1 A). Por otro lado, si la luz de excitación indujera la formación de gránulos en fotos sucesivas la cantidad de gránulos debería aumentar, y en efecto disminuye (Fig. S.1 B). Por otro lado, los gránulos de phyB fueron visualizados utilizando microscopía electrónica en plantas sobreexpresantes de phyB (Kircher, S. *et al.* 2002). En base a esto concluimos que los gránulos no se forman en respuesta a la radiación utilizada para tomar las imágenes de microscopía.

Hasta el momento la abundancia de gránulos se encontró positivamente relacionada con un aumento de la actividad del fitocromo (Chen, M. *et al.* 2003). Sin embargo, en este caso vemos aparecer nuevos gránulos en respuesta a condiciones donde la actividad del fitocromo debería disminuir (baja relación R/RL, baja irradiancia). Una posibilidad es que en respuesta a la disminución de la abundancia de Pfr, el fitocromo se desagregue, formando gránulos pequeños a partir de la proteína acumulada en los gránulos grandes. Para evaluar esta posibilidad medimos el diámetro de los gránulos categorizados como “grandes”. Si los gránulos pequeños se formaran a partir de los grandes, estos deberían ser en promedio más pequeños en condiciones de baja irradiancia o bajo R/RL.

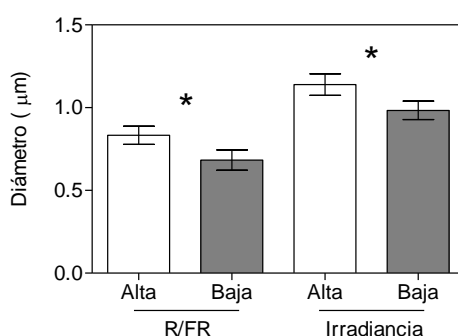


Figura 1.3 - El diámetro promedio de los gránulos grandes disminuye en condiciones de baja irradiancia o bajo R/RL.

A partir de las imágenes cuantificadas en la figura 1.2, donde se ve que el número de gránulos grandes no cambia con los tratamientos, se cuantificó el diámetro promedio de los gránulos grandes a las 2h de tratamiento y en el control. El asterisco indica diferencias significativas ($P < 0.05$).

Se observó que tanto en respuesta a la disminución de la irradiancia como en respuesta a la disminución de la relación R/RL disminuyó el diámetro de los gránulos grandes. Aunque esta

información no es suficiente como para obtener una conclusión definitiva, este resultado es consistente con la idea de que los gránulos pequeños se originan a partir del phyB localizado en gránulos grandes.

Aunque el mecanismo de entrada y salida del núcleo de phyB no se conoce en detalle, sabemos que para ingresar al núcleo phyB debe encontrarse en su forma activa Pfr. Tras la observación de la aparición de nuevos gránulos en respuesta a menores relaciones R/RL, condición en que disminuye la proporción de Pfr, nos preguntamos si la abundancia total de phyB en el núcleo estaba cambiando. Para esto medimos la fluorescencia total en las mismas imágenes donde cuantificamos los gránulos de la figura 1.2. Para este fin desarrollamos un método automático en el programa Icy (<http://icy.bioimageanalysis.org>). A grandes rasgos, el método consistió en determinar los límites del núcleo en cada foto utilizando un método de segmentación por *thresholding*, y medir el brillo promedio en el área determinada. El resultado de este proceso es un archivo donde, para cada imagen se define el tamaño y el brillo promedio del núcleo.

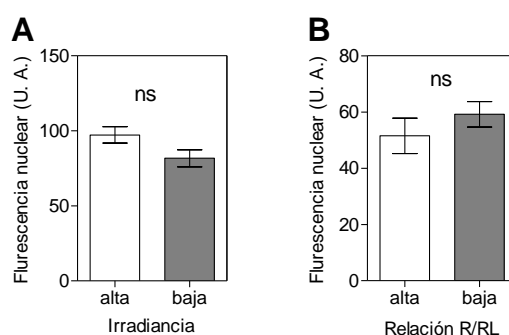


Figura 1.4 - En respuesta a la baja relación R/RL o la baja irradiancia cambia la localización sub-nuclear de phyB, pero no su abundancia nuclear.

A partir de las imágenes cuantificadas en la figura 1.2 se midió el brillo promedio del núcleo a las 2 h de tratamiento con baja irradiancia (A) o bajo R/RL (B). ns indica diferencias no significativas entre las medias ($P > 0,05$).

En los dos casos estudiados, mientras que a las 2 h de tratamiento se observa un cambio total en la abundancia de gránulos, al mismo tiempo no se detectaron cambios en la fluorescencia nuclear total de phyB (Fig. 1.4). En base a estos resultados podemos determinar que, al menos a tiempos cortos, un paso en la respuesta desencadenada por phyB frente a baja irradiancia o bajo R/RL implica el desensamblado de los gránulos, y no la exclusión nuclear de phyB.

A modo de control evaluamos si la respuesta fisiológica de hiponastia se mantiene en las plantas utilizadas para el análisis por microscopía confocal. Por un lado, existe la posibilidad de que la sobreexpresión de phyB en la línea PGB impida la respuesta fisiológica. Además, esta línea se encuentra en el fondo genético *Ler*, mientras que los experimentos de hiponastia presentados en la figura 1.1 se realizaron con mutantes en el fondo genético Columbia (*Col*). Es por esto que se midió la hiponastia en respuesta a los tratamientos en la misma línea en la que se evaluaron los gránulos nucleares, en *Ler* y en las mutantes *phyA* y *phyB* en el fondo genético *Ler*.

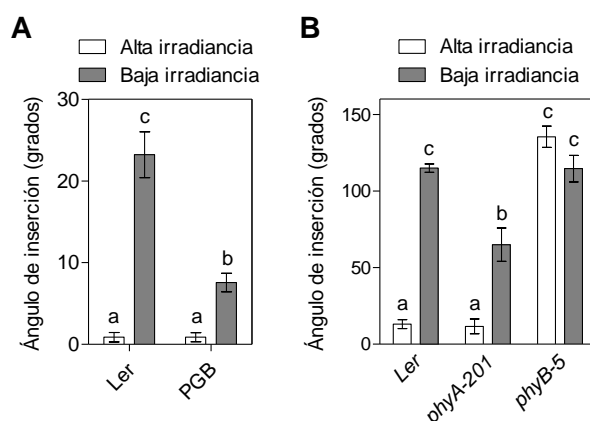


Figura 1.5 - La respuesta de hiponastia está conservada en otros fondos genéticos y en la línea sobreexpresante de *phyB* utilizada para los experimentos de microscopía confocal.

A - Ángulo de inserción de las hojas de la roseta en plantas cultivadas en alta irradiancia o transferidas de alta irradiancia a baja irradiancia, de los genotipos *Landsberg erecta* (*Ler*) y sobreexpresantes de *phyB* marcado con GFP (*PGB*).

B - Ángulo de inserción de las hojas en plantas mutantes de *phyA* y *phyB* en el fondo *Ler* sometidas al tratamiento de disminución de la irradiancia.

Los datos corresponden a la media \pm EE de al menos 10 plantas. La interacción entre genotipo e irradiancia fue significativa con $P < 0.0001$. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

La respuesta de hiponastia en bajas irradiancias y el rol de *phyB* en ese proceso están conservados en los fondos genéticos *Col* y *Ler*, aunque debido a su diferente arquitectura de la roseta las magnitudes no coinciden (Fig. 1.5). Por otro lado, se puede ver que a diferencia de la mutantes de *phyB*, la sobreexpresante *PGB* presenta las hojas con poca inclinación, y responde menos a los cambios de irradiancia (Fig. 1.5 A). Esto podría deberse a que mayores niveles de *phyB* permiten establecer mayores niveles de la conformación activa, que permanecen aún luego de disminuir la cantidad de luz. Además, esta planta tuvo mayores niveles de *phyB* durante todo su desarrollo por lo que podría haber adquirido diferencias estructurales con respecto a las plantas salvajes, como puede observarse en una arquitectura de la roseta más compacta, que también podría impedir que las hojas cambien su posición. Además, observamos que en otro fondo genético (*Ler*) se mantiene el efecto de las mutaciones de *phyA* y *phyB*, lo cual nos permite extrapolar nuestras conclusiones a otros ecotipos de *Arabidopsis thaliana*.

El tratamiento de reducción de la irradiancia consistió en alejar las plantas de la fuente de luz. Este tratamiento afecta no sólo a la irradiancia de luz roja (percibida por *phyB*) sino también a la luz de otras longitudes de onda, entre ellas el azul. Los cambios en la irradiancia de luz azul son percibidos por los criptocromos. Existe evidencia de la interacción entre los fotorreceptores, tanto a nivel genético como funcional, inclusive que criptocromos y fitocromos colocalizan en gránulos nucleares (Mas, P. *et al.* 2000; Sellaro, R. *et al.* 2010). Es por esto que nos preguntamos si los cambios observados en la localización de *phyB* en respuesta a la disminución de la irradiancia podrían deberse indirectamente a la disminución de la actividad de los criptocromos, y que estos estuvieran afectando la localización de *phyB*. Para evaluar esta posibilidad, plantas cultivadas a alta irradiancia fueron transferidas a condiciones

donde se mantuvo la irradiancia alta ($200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) pero se redujeron selectivamente ciertas longitudes de onda, de modo de inactivar fotorreceptores específicos.

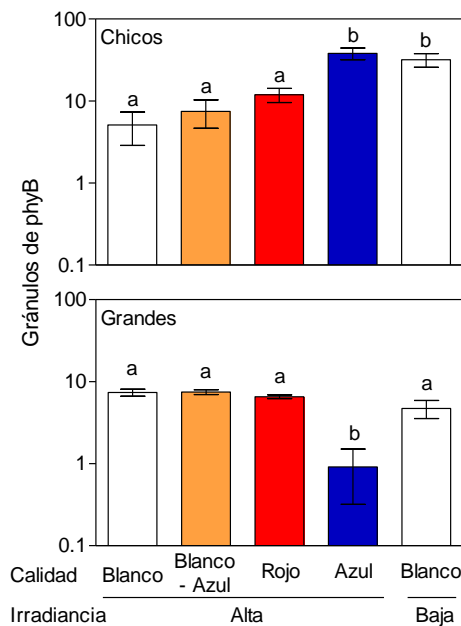


Figura 1.6 - Los cambios en la localización de phyB en respuesta a la irradiancia no se deben a la interacción con otros fotorreceptores.

Plantas de la línea PGB, cultivadas en condiciones de alta irradiancia y alto R/RL fueron transferidas a condiciones de alta irradiancia de diferente calidad de luz: naranja (blanco desprovisto de azul), rojo puro, azul puro o baja irradiancia de luz blanca 2 h después de comenzado el día. Al cabo de 4 h se tomaron fotografías de microscopía confocal y se cuantificó la abundancia de gránulos grandes y pequeños. Los datos son promedio \pm EE de 7 plantas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

En el tratamiento con filtro naranja, donde se reduce la radiación azul, manteniendo el PAR constante, los gránulos no modificaron su distribución de tamaños (Fig. 1.6). Por otro lado, manteniendo la irradiancia alta pero sólo con luz roja (por medio de LEDs que emiten sólo en esta longitud de onda) se mantuvo la misma respuesta que en alta irradiancia. En conclusión, la luz roja, que mantiene los niveles de fitocromo activos, sería suficiente para inhibir la formación de gránulos pequeños, mientras que la activación de los criptocromos por luz azul no sería necesaria para modular la localización de phyB. Por el contrario, al transferir a las plantas a altas irradiancias de luz azul (provista por diodos que emiten en esta longitud de onda) se observó un marcado aumento en la cantidad de gránulos pequeños, comparable en magnitud a la observada en respuesta a bajas irradiancias de luz blanca. A diferencia de la respuesta a bajas irradiancias, también se observó una disminución en la abundancia de gránulos grandes. Esto puede deberse a que la reducción de la irradiancia de luz roja en este tratamiento es aún más drástica que en el tratamiento de baja irradiancia, y niveles mucho menores de fitocromo activos causen una mayor des-agregación de los gránulos haciendo que sean menores a $0,4 \mu\text{m}$.

Dado que la luz azul parece ser prescindible en esta respuesta, con el fin de adjudicar el efecto a la luz roja inequívocamente, se probó si sólo con cambios en la irradiancia de luz roja se podían reproducir los cambios observados en respuesta a la disminución de todas las longitudes de onda por igual. Plantas cultivadas en alta irradiancia de luz blanca se sometieron a diferentes irradiancias de luz roja.

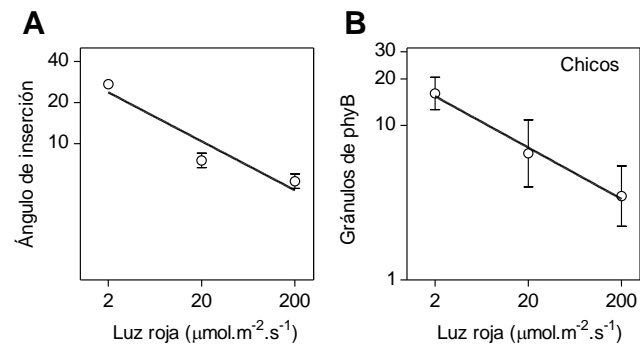


Figura 1.7 - La respuesta a la irradiancia depende de la cantidad de luz roja percibida por phyB. Plantas de Arabidopsis del genotipo salvaje y sobreexpresantes de phyB marcado con GFP fueron cultivadas en condiciones de alta irradiancia y alto R/RL hasta desarrollar su roseta y transferidas a diferentes irradiancias de rojo puro. Se midió el ángulo de inserción de las hojas de la roseta (A) y la abundancia de gránulos de phyB (B) 2 horas más tarde. Los datos son el promedio \pm EE de 18 (A) o 6 (B) plantas. El análisis de regresión lineal indica que el efecto de la irradiancia de luz roja es significativo con $P < 0.0001$ en A y $P < 0.05$ en B.

Como se puede observar, cambios en la irradiancia de luz roja son suficientes para desencadenar la respuesta fisiológica y el cambio en la localización de phyB (Fig. 1.7), de modo independiente de la acción de otros fotorreceptores.

Caracterización temporal y espacial de la respuesta a la irradiancia.

Habiendo probado que la localización de phyB responde a los cambios en la irradiancia de luz roja, nos propusimos caracterizar esta respuesta a diferentes niveles. Hasta el momento se había analizado la respuesta del fitocromo en la base del pecíolo, el mismo lugar donde se regula la respuesta de hiponastia (Polko, J.K. *et al.* 2013). Sin embargo, los cambios en la irradiancia generan respuestas en otros órganos como ser la elongación de entrenudos, la elongación del hipocotilo, y a largo plazo cambios en la morfología de las hojas jóvenes como láminas más pequeñas y pecíolos más largos, entre otros. Para evaluar si la respuesta en otros órganos puede explicarse por cambios en la actividad de phyB se analizó la localización subnuclear del phyB en células de otros órganos, tejidos, y estados ontológicos.

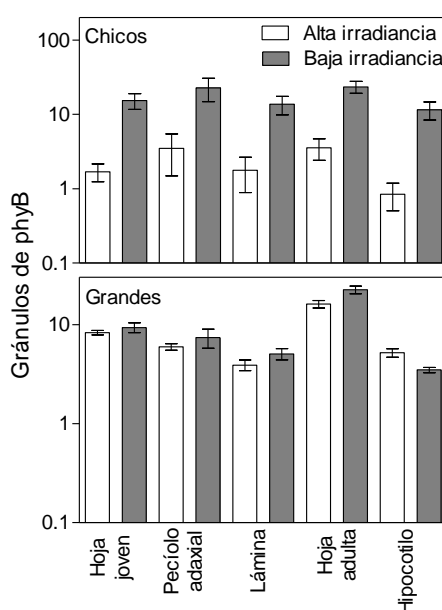


Figura 1.8 - Los cambios en la irradiancia son percibidos igualmente en diferentes órganos y estadios del desarrollo.

Las plantas se cultivaron en alta irradiancia y 4h después de comenzar el día fueron transferidas a baja irradiancia. Al cabo de 2h se tomaron fotografías de microscopía confocal. Hoja joven: cara abaxial del pecíolo de hojas que responden a la irradiancia. Hoja adulta: cara abaxial del pecíolo de hojas que ya no responden a la irradiancia. Hipocotilo: epidermis y primeras capas sub epidérmicas del tercio superior de hipocotilos de plántulas de 3 días. Pecíolo adaxial: cara adaxial del pecíolo de hojas jóvenes. Lámina: epidermis/mesófilo de la lámina en hojas jóvenes.

La respuesta a la irradiancia está conservada en todos los tipos celulares observados (Fig. 1.8). Las hojas adultas no modifican su ángulo de inserción en respuesta a la irradiancia. Sin embargo, a juzgar por su localización, el fitocromo es capaz de percibir la señal, por lo que el impedimento podría estar dado por modificaciones en la estructura de la pared de sus células, más rígidas, o diferencias en señales río abajo del efecto de phyB, como puede ser la sensibilidad a auxinas.

A pesar de que la respuesta se conservó en todos los tejidos estudiados, se observaron diferencias en la abundancia de gránulos grandes entre muestras, siendo más abundantes en

las hojas adultas totalmente expandidas que en el hipocotilo de plántulas de 3 días. Además, en pecíolo de hojas adultas la disminución de la irradiancia parecería promover un aumento del número de gránulos grandes mientras que en hipocotilos o en la lámina se observa un efecto sutilmente contrario. Sin embargo, estas diferencias probablemente no reflejen cambios en la actividad de fitocromo en los diferentes tipos celulares. Por el contrario, se ha observado una fuerte correlación entre el tamaño del núcleo y el tamaño de las células, y entre el tamaño de los gránulos y el tamaño de los núcleos, consistente con lo reportado en otros trabajos (Price, H. *et al.* 1973; Sugimoto-Shirasu, K. *et al.* 2003). Entonces, probablemente en células de mayor tamaño algunos gránulos cuantificados como grandes en realidad se comporten como los pequeños, y en células muy chicas algunos gránulos grandes estén en el límite de tamaño por lo cual al reducir su tamaño sutilmente pasen a la categoría de pequeños. Es por esto que dependiendo del tipo celular se debería redefinir un valor de corte para separar a los gránulos grandes de los chicos. En nuestro caso manteniendo el límite definido para hojas jóvenes ($0,4 \mu\text{m}$ de diámetro) pudimos observar la misma respuesta en todos los casos, pero a la luz de estas observaciones otros métodos cuantitativos serían más apropiados para analizar este fenómeno.

Las señales del ambiente luminoso pueden ser muy cambiantes durante un día, ya sea por la presencia de nubosidad o por cambios en la posición del sol y el consecuente sombreado de plantas vecinas. Como se vio en la figura 1.2 la respuesta a la irradiancia es persistente una vez que se establecen las nuevas condiciones. Nos preguntamos qué ocurriría si los cambios en las condiciones fueran más dinámicos. Para esto se sometieron plantas a cambios en la irradiancia o en la relación R/RL e inmediatamente fueron evaluadas por microscopía confocal para analizar la localización de phyB, tomando imágenes cada 4 min. Al cabo de una hora de tratamiento fueron nuevamente transferidas a alta irradiancia o alto R/RL y siguieron siendo observadas continuamente para evaluar su capacidad de revertir la respuesta.

La abundancia de gránulos se mantuvo constante en los minutos previos al tratamiento. Una vez transferidas a las condiciones de baja irradiancia o bajo R/RL se observó inmediatamente la aparición de gránulos pequeños (Fig. 1.9). Estos continuaron formándose por al menos media hora de tratamiento, hasta que se estabilizaron, consistentemente con lo observado en la figura 1.2. Posteriormente, al transferir las plantas nuevamente a alta irradiancia, la abundancia de gránulos pequeños disminuyó inmediatamente, sin mostrar una fase de retardo evidente. Estos resultados permiten afirmar que phyB puede percibir cambios dinámicos en las condiciones lumínicas del ambiente. La respuesta es inmediata, inmediatamente reversible en el caso de retornar a las condiciones originales, y persistente en el caso de que la señal persista (Fig. 1.2 y Fig. 1.9).

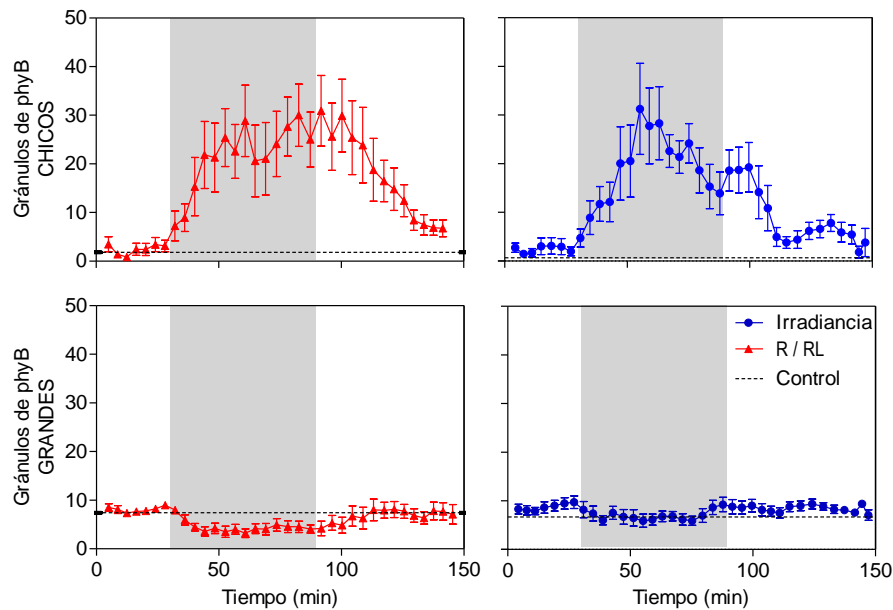


Figura 1.9 - Las respuestas a la irradiancia y la relación R/RL son inmediatas y reversibles. Las plantas fueron cultivadas en condiciones de alta irradiancia y alto R/RL. Se las observó por 25 min en esas condiciones (fondo blanco) y se las transfirió a baja irradiancia ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) o bajo R/RL (0.8) (tiempo 0 min, fondo gris). Durante 65 min se tomaron imágenes continuamente. Al cabo de ese tiempo se transfirieron nuevamente las plantas a alta irradiancia y alto R/RL (fondo blanco) y se las continuó observando por 60 min más. Los experimentos se repitieron tres veces, y cada vez se observó una hoja diferente por punto. Las imágenes se tomaron a intervalos de aproximadamente 4 min (el tiempo que llevaba cortar una hoja, montarla, fotografíarla en el microscopio y tomar la siguiente hoja). Los valores graficados corresponden a la media móvil de tres puntos sucesivos \pm EE. La línea punteada en cada figura corresponde a los valores medidos en plantas que se mantuvieron en alta irradiancia y alto R/RL durante todo el tiempo del experimento, medidas al final del experimento.

Cabe destacar que en todos los aspectos analizados los cambios en la irradiancia tuvieron efectos sobre la actividad de phyB prácticamente idénticos a los cambios en la relación R/RL, poniendo de manifiesto que el receptor está igualmente especializado en la respuesta a ambas señales, funcionalidad que hasta el momento había sido desestimada.

phyB responde a los cambios en la cantidad y calidad de luz generados por un canopeo vegetal en condiciones naturales.

La función de phyB como receptor de la irradiancia hasta el momento había sido desestimada debido a que, según estudios acerca de la fotobiología del receptor, en el rango de irradiancias presentes en condiciones naturales su actividad debería estar saturada. Sin embargo, pudimos demostrar que cambios en la irradiancia en valores que se creían saturantes hasta el momento tienen un efecto en la localización del receptor y consecuentemente en la fisiología de la planta. Para poder extender este análisis a condiciones naturales, repetimos los experimentos en un rango mayor de irradiancias, alcanzando niveles cercanos a los observables en condiciones de luz solar.

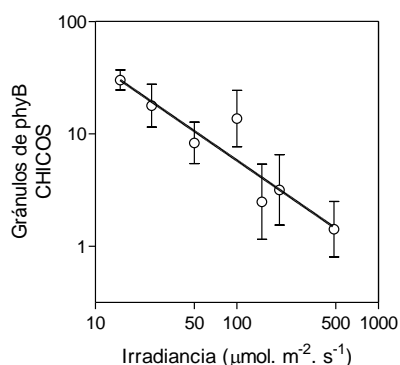


Figura 1.10 - La respuesta a la irradiancia se mantiene en un amplio rango, aún en situaciones similares a las de un canopeo vegetal.

Relación entre la cantidad de gránulos de phyB y la irradiancia. Las plantas fueron cultivadas en alta irradiancia y transferidas a diferentes irradiancias ($15 - 485 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 4h después del comienzo del día y medidas 2h después. Los datos son el promedio \pm EE de 6 plantas. El análisis de regresión lineal indica que el efecto de la irradiancia es significativo con $P < 0.0001$.

Los resultados nos permiten indicar que la capacidad de percibir cambios en la irradiancia por parte de phyB se mantiene en todo el rango de irradiancias, a juzgar por la abundancia de gránulos pequeños en respuesta al cambio de condiciones (Fig. 1.10). No sólo aumenta el número de gránulos al reducir la irradiancia, sino que se reduce al aumentarla.

En un canopeo natural, el ambiente lumínico se ve modificado conjuntamente en la cantidad como en la calidad de luz, ya que si se reduce la cantidad de luz por la presencia de plantas vecinas, necesariamente habrá disminuido la relación R/RL. En estas condiciones, sería posible que la actividad del receptor estuviera fuertemente afectada por la relación R/RL y en esas condiciones serían despreciables los cambios de irradiancia. Para evaluar esta posibilidad, analizamos la abundancia de gránulos de phyB en plantas cultivadas a altas irradiancias, y transferidas a diferentes combinaciones de tratamientos: menor irradiancia, menor relación R/RL, y la combinación de menor irradiancia y menor relación R/RL.

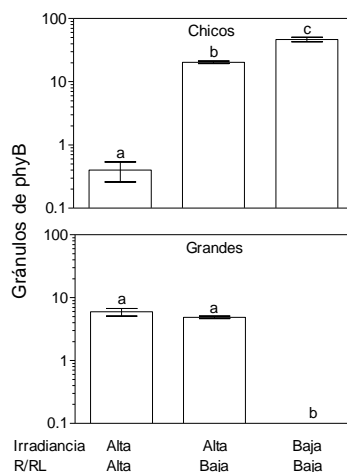


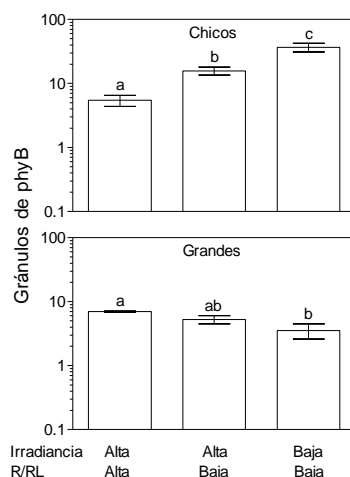
Figura 1.11 - La disminución de la irradiancia modula la actividad de phyB aún en condiciones de bajo R/RL.

Las plantas se cultivaron en alta irradiancia ($200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, R/RL = 4,3). A las 4 h del fotoperiodo un grupo de plantas fue sometido a baja relación R/RL (0,8) irradiando con una lámpara que emite rojo lejano, y otro grupo a baja irradiancia y bajo R/RL ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PAR, R/RL = 0,8). 2 h después se tomaron imágenes de microscopía confocal.

Lo datos corresponden al promedio \pm EE de 3 plantas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

Observamos que a pesar de que el efecto de la reducción de la relación R/RL fue significativo, la combinación de este tratamiento con el de menor irradiancia tuvo consecuencias aún mayores sobre la abundancia de gránulos de phyB, causando no sólo un aumento de la abundancia de los gránulos pequeños sino también una reducción de la abundancia de los gránulos grandes (Fig. 1.11).

En condiciones naturales la irradiancia alcanza valores mucho más altos que los que logramos alcanzar utilizando lámparas eléctricas. Con el fin de poder extrapolar nuestros resultados a plantas creciendo en un canopeo natural, repetimos el experimento anterior exponiendo las plantas a luz solar plena en un día de verano o a la sombra de un árbol.



*Figura 1.12 - En canopeos naturales, la relación R/RL y la irradiancia tienen efectos aditivos. Las plantas fueron cultivadas en condiciones naturales, en días de verano en Buenos Aires (fotoperiodo 14 h). Al mediodía del día 15 ($1360 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $R/RL = 1,2$) un grupo de plantas se transfirió a condiciones de bajo R/RL (se mantuvo la irradiancia constante pero se agregó rojo lejano utilizando una lámpara de modo de disminuir la relación R/RL a 0,8) y otro grupo se transfirió bajo la sombra de una Tipa (*Tipuana tipu*) de modo de reducir la irradiancia y la relación R/RL ($110 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $R/RL = 0,8$). 2 h después se tomaron imágenes de microscopía confocal. Los datos corresponden al promedio \pm EE de 3 plantas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$)*

Observamos que en plantas cultivadas en ambientes naturales, el phyB responde a los cambios en la irradiancia y en la relación R/RL típicas de un ambiente sombreado (Fig. 1.12). El último resultado nos permite extrapolar nuestros resultados a las condiciones que puede experimentar una planta en la naturaleza. Aún en irradiancias mayores a las utilizadas hasta el momento, y con una calidad de luz diferente, se mantiene la respuesta a los cambios en la irradiancia.

La percepción de la irradiancia es mediada por la reversión térmica

Los resultados hasta aquí expuestos indican que el phyB de *Arabidopsis* es capaz no sólo de responder a los cambios en la calidad de la luz (relación R/RL) sino también a la cantidad de luz roja incidente en un canopeo. Sin embargo, no se conoce un mecanismo que relacione directamente los cambios en la irradiancia a cambios en la actividad de phyB. Hasta el momento se conocen tres reacciones que regulan la actividad de phyB: la foto-trasformación de la forma inactiva (Pr) a la activa (Pfr) por luz roja, la inactivación por luz rojo lejano y una inactivación independiente de la luz denominada reversión térmica u oscura, ya que ocurre aún en ausencia de luz (Fig. 1.3). Dado que en nuestros tratamientos de luz la proporción entre la cantidad de luz rojo y rojo lejano no se vio afectada, la única alternativa es que la respuesta a cambios en la irradiancia dependa del efecto de la reversión térmica en el establecimiento de los niveles de Pfr. Esta reacción hasta el momento ha sido desestimada al predecir los niveles de phyB activo en condiciones naturales ya que según las mediciones con las que se cuenta es demasiado lenta como para competir con las reacciones de fotoconversión.

Para evaluar si la reversión térmica puede explicar el efecto observado de los cambios en la irradiancia sobre la actividad de phyB utilizamos líneas transgénicas en las que la mutante nula *phyB-9* es complementada con versiones de phyB mutadas, provistas por el laboratorio de Richard Vierstra (Universidad de Washington, Estados Unidos). Las mutaciones puntuales introducidas consisten en la sustitución de arginina por alanina en la posición 582 (R582A) y tirosina por fenilalanina en la posición 361 (Y361F). Ambas mutaciones se encuentran cerca de la región de unión al cromóforo (Fig. 1.2). Estas líneas han sido caracterizadas y se ha probado que difieren del phyB salvaje sólo en la reversión térmica (retienen un 3,5% y 2,6% de la reversión térmica de phyB salvaje respectivamente), mientras que las propiedades de fotoconversión se encuentran inalteradas (Zhang, J. *et al.* 2013; Burgie, E.S. *et al.* 2014).

Se analizó la distribución de tamaños de gránulos de phyB en líneas transgénicas donde las variantes mutadas de phyB mencionadas anteriormente se encontraban fusionadas a YFP. Estos experimentos se realizaron en plantas de 3 días, y se observó la localización de phyB en células del hipocotilo. Dado que anteriormente se demostró que la respuesta en la localización de phyB frente a cambios en la irradiancia se encuentra conservada en todos los órganos observados, incluyendo el hipocotilo de plántulas de 3 días (Fig. 1.8) los resultados obtenidos podrían extrapolarse a plantas adultas.

Dado que la cuantificación manual de los gránulos de phyB tomaba mucho tiempo, y que nos propusimos continuar con el análisis de esta respuesta, desarrollamos un método automático para cuantificar las imágenes de microscopía confocal. A grandes rasgos el método consiste en identificar gránulos con un cierto grado de similitud con tres gránulos modelo, previamente seleccionados para tal fin. El resultado del análisis es una tabla donde se indica para cada imagen el número de gránulos clasificados por categorías de tamaños. Los resultados mostrados en las siguientes figuras fueron obtenidos con este método.

Como primer paso en la validación de las líneas transgénicas se midió su respuesta a la relación R/RL, cultivando las plantas durante tres días en luz blanca y transfiriéndolas a diferentes condiciones lumínicas (Fig. M.1 A) durante 3 h previo a la observación en el microscopio.

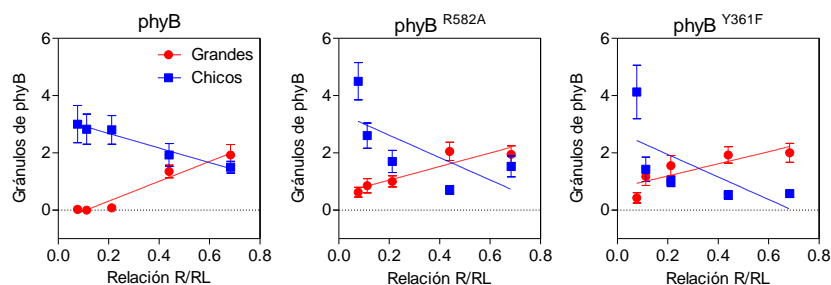


Figura 1.13 - Las líneas transgénicas en fondo *phyB-9* complementadas con *phyB* salvaje o mutado responden a los cambios en la relación R/RL.

Plantas transgénicas conteniendo $pUBQ10::YFP::phyB$, $pUBQ10::YFP::phy^{R582A}$ o $pUBQ10::YFP::phy^{Y361F}$ fueron cultivadas por tres días en luz blanca y el cuarto día fueron tratadas con luz de diferentes relaciones R/RL a 20°C por tres horas antes de ser observadas en el microscopio confocal. Se definió el punto de corte entre gránulos grandes y chicos en 0,4 μm de diámetro.

Se observó que como era de esperarse, tanto el fitocromo salvaje (*phyB*) como las dos líneas de *phyB* con reversión térmica disminuida (*phyB^{R582A}* y *phyB^{Y361F}*) mostraron una fuerte respuesta a los cambios en la relación R/RL. Sin embargo, en este caso no sólo los gránulos pequeños respondieron a los tratamientos, sino que también se vio una respuesta de los gránulos grandes. Esto ya se había observado previamente en aquellos tratamientos donde los cambios en la actividad del fitocromo eran muy drásticos (por ejemplo Fig. 1.6, Fig. 1.11, Fig. 1.12). Por otro lado, se observó que la cantidad de gránulos en esta línea es mucho menor que en la línea anterior. Esto puede deberse a que los niveles de expresión de estas líneas transgénicas son mucho menores a los de la línea utilizada anteriormente, lo cual se debería a que en este caso se utiliza el promotor *UBQ10*, y en el caso anterior el promotor *35S*. Esto podría dificultar la detección de los gránulos más pequeños (y menos brillantes). Por estos motivos, se buscó una medida más integradora del estado del *phyB*, que permitiera unificar en un solo dato los cambios en todos los tipos de gránulos y que no dependa de un valor umbral arbitrario. Luego de evaluar varias opciones se definió el tamaño promedio de los gránulos como medida de la localización subnuclear de *phyB* (ver cálculos en Materiales y Métodos, ecuación 2).

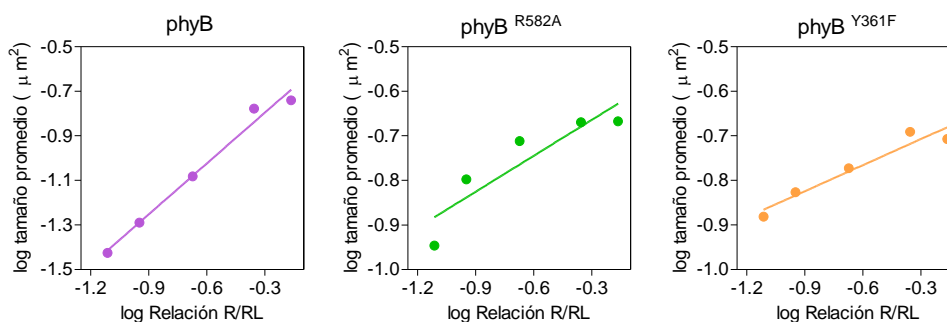


Figura 1.14 - Tamaño promedio de los gránulos de *phyB* en las tres líneas transgénicas utilizadas en respuesta a la relación R/RL de la luz.

El análisis de regresión lineal mostró efectos significativos en todos los casos con $P < 0,05$.

A mayor actividad de phyB (dada por una mayor relación R/RL) se observó mayor tamaño promedio, mientras que al disminuir la actividad de phyB se redujo el tamaño promedio de los gránulos (Fig. 1.14). Esto es consistente con lo observado anteriormente, ya que al disminuir la relación R/RL disminuye la cantidad de Pfr, y consistentemente aparecen más gránulos pequeños y disminuye la cantidad de gránulos grandes, por lo que disminuye el tamaño promedio de los gránulos. Esta medida integra eficientemente los dos efectos observados anteriormente y permite hacer un análisis cuantitativo de los resultados.

Habiendo validado las líneas a utilizar, se analizó su respuesta a cambios en la irradiancia, cultivando las plantas por dos días en condiciones de luz blanca y al tercer día transfiriéndolas a diferentes irradiancias de luz blanca, R/RL=1,1.

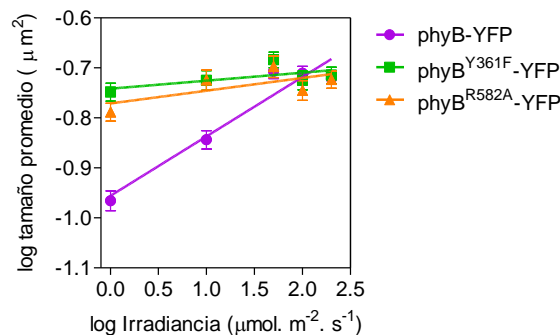


Figura 1.15 - Respuesta a la irradiancia en plantas salvajes y mutantes con menor tasa de reversión térmica.

Luego de 3 días de crecimiento a $50 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ con luz provista por tubos fluorescentes, una hora después de comenzado el día las plantas fueron transferidas a diferentes irradiancias, relación R/RL=1,1. Al cabo de 3 h fueron observadas al microscopio confocal. El análisis de regresión lineal indicó que el efecto de la irradiancia es significativo en la línea phyB-YFP ($P < 0,05$) y no es significativo en las líneas con menor reversión térmica phyB^{Y361F}-YFP y phyB^{R582A}-YFP.

Las líneas con menor reversión térmica perdieron la respuesta a los cambios en la irradiancia, mientras que al igual que lo observado anteriormente en la línea PGB, la línea acarreado la versión salvaje de phyB mostró una fuerte respuesta a los cambios en la irradiancia, disminuyendo el tamaño promedio de los gránulos (Fig. 1.15).

Por otro lado, se midió la fluorescencia nuclear total en las mismas fotos cuantificadas en la figura 1.15, utilizando el mismo programa que el utilizado para la figura 1.4.

Al igual que en la línea PGB estas líneas transgénicas respondieron a los cambios de irradiancia modificando la abundancia y tamaño de los gránulos nucleares, pero no se observaron cambios significativos en la abundancia total de phyB en el núcleo en respuesta a la irradiancia (Fig. 1.16).

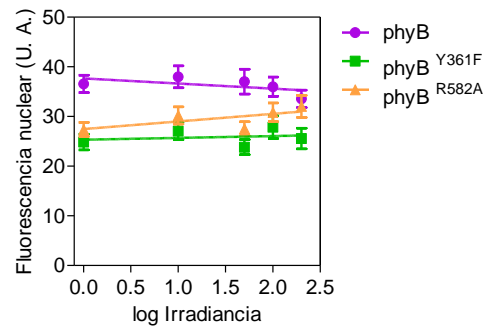


Figura 1.16 - Los cambios en la irradiancia no afectan la abundancia nuclear total de phyB. En las mismas imágenes cuantificadas en la figura 1.15 se cuantificó el brillo del núcleo. El análisis de regresión lineal indica que no hay un efecto significativo de la irradiancia ($P > 0,05$).

Dado que, al impedir específicamente la reacción de reversión térmica sin modificar la capacidad de fotoconversión se inhibió la respuesta a la irradiancia, se puede inferir que la reversión térmica está involucrada en la percepción de la cantidad de luz por parte de phyB. Un mecanismo posible para explicar este fenómeno es que al disminuir la cantidad de luz disminuye la tasa de fotoconversión. En estas condiciones, al disminuir la irradiancia, la reversión térmica empezaría a tener cada vez una contribución relativa mayor en el establecimiento de los niveles de phyB activo, Pfr.

2. phyB integra señales de luz y temperatura.

Los niveles de Pfr dependen de la temperatura aún en presencia de luz.

Estudios clásicos han demostrado que la velocidad de la reversión térmica depende de la temperatura (Schäfer, E., Schmidt W. 1974). La observación de que la reversión térmica impacta sobre la actividad de phyB aún en condiciones de luz abrió la posibilidad de que cambios en la temperatura impacten sobre la velocidad de esta reacción y en consecuencia se establezcan diferentes niveles de Pfr a diferentes temperaturas aún en presencia de luz. Para testear esta posibilidad se estudió el efecto de la temperatura sobre la actividad de phyB a diferentes niveles: *in vitro*, *in vivo*, su localización subcelular y su efecto fisiológico.

La cuantificación de la forma activa del fitocromo se basa en métodos espectrofotométricos. Como se mencionó anteriormente, phyB posee dos conformaciones: la inactiva, Pr, que absorbe preferentemente la luz roja ($\lambda_{\text{max}} = 660 \text{ nm}$) y la activa, Pfr, que absorbe preferencialmente la luz rojo lejana ($\lambda_{\text{max}} = 730 \text{ nm}$). Para cuantificar la abundancia relativa de las isoformas, entonces, se mide la absorbancia de la muestra en cada una de estas longitudes de onda, y en respuesta a la radiación con luces de diferente calidad.

Para evaluar si cambios en la temperatura afectan a la actividad del fitocromo, en primer lugar se midió la abundancia de su forma activa, Pfr, *in vitro* a diferentes temperaturas e irradiancias de luz roja, utilizando proteína purificada a partir de cultivos bacterianos y posteriormente unida al cromóforo fitocromobilina. La holoproteína adaptada a la oscuridad fue irradiada con luz roja (1 o $5 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) y se midió la abundancia de Pfr a lo largo del tiempo y una vez alcanzado el estado estacionario. Estos experimentos fueron realizados por Sethe Burgie, en el marco de una colaboración, en el laboratorio de Richard Vierstra (Universidad de Washington).

Los cambios en la temperatura de incubación tuvieron un fuerte efecto en la determinación de los niveles de Pfr. A bajas temperaturas ($10 \text{ }^{\circ}\text{C}$) se alcanzan niveles mayores de Pfr y más rápidamente que a altas temperaturas ($30 \text{ }^{\circ}\text{C}$), con respuestas intermedias a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 2.1 A). Tanto a $1 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ como a $5 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ se observaron los mismos efectos de la temperatura. Aunque las magnitudes medidas fueron diferentes, no se observó un efecto de la irradiancia sobre el patrón de respuesta a la temperatura.

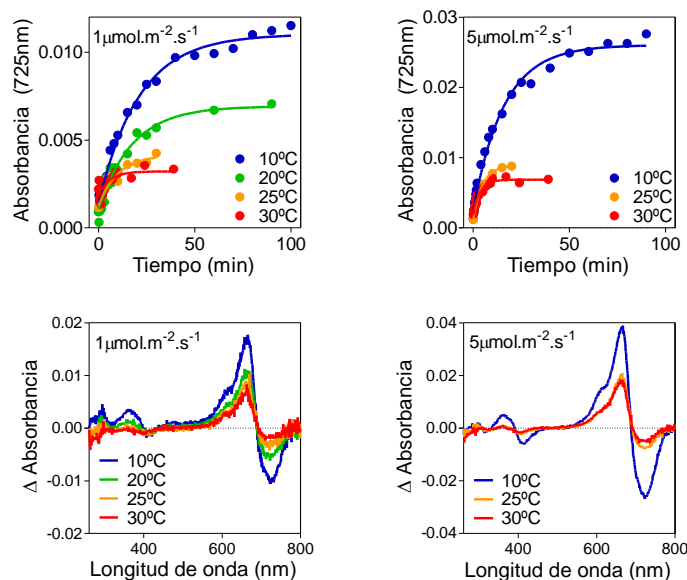


Figura 2.1. La abundancia de la forma activa de phyB, Pfr, depende de la temperatura.

Muestras de proteína phyB purificada a partir de cultivos bacterianos, y adaptadas a la oscuridad fueron irradiadas con luz roja ($\lambda=660\text{nm}$) de 1 o 5 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, a diferentes temperaturas de incubación, y se registró la abundancia de Pfr como la absorbancia a $\lambda=725\text{nm}$ durante todo el tiempo hasta alcanzar el estado estacionario (A). En el estado estacionario se midió el espectro de absorción y se lo comparó con el de oscuridad, obteniendo los valores de Δ Absorbancia como la diferencia entre la absorbancia a cada longitud de onda medida en oscuridad menos la absorbancia medida en el estado estacionario (B). Datos obtenidos en el laboratorio de Richard Vierstra, Universidad de Washington.

Como siguiente paso se analizó el efecto de la temperatura *in vivo*, utilizando plántulas etioladas (cultivadas en oscuridad) de 3 días de edad. Las plantas se cultivaron en oscuridad con el fin de evitar la acumulación de pigmentos fotosintéticos que interfieren en la medición. Para estos experimentos se utilizan plantas sobreexpresantes de phyB en un fondo mutante *phyA* ya que en plántulas etioladas el fitocromo más abundante es phyA, y su presencia interferiría en las mediciones de phyB. La detección de phyB *in vivo* por métodos espectrofotométricos fue realizada por Cornelia Klose, en el laboratorio de Eberhard Schäfer (Universidad de Friburgo, Alemania).

Utilizando esta técnica se realizaron dos experimentos. Como se mencionó en la introducción, el fitocromo se encuentra formando dímeros, y cada monómero puede adoptar la forma activa o inactiva. Esto resulta en la aparición de tres especies diferentes: el dímero inactivo Pr-Pr (D0), el heterodímero Pfr-Pr (D1) y el homodímero activo Pfr-Pfr (D2). Recientemente se ha demostrado que la reversión de un monómero depende del estado de su compañero (Klose, C. *et al.* 2015). Así, los heterodímeros D1 revierten muy rápido, mientras que el homodímero D2 revierte muy lentamente (Fig. I.3). Debido a esto, los experimentos para evidenciar su decaimiento son diferentes.

El primer experimento tiene como objetivo medir el efecto de la temperatura sobre la reversión térmica de D2, y consiste en medir la reversión en oscuridad. Para esto se induce la máxima formación de Pfr con un pulso de luz roja ($\lambda=656\text{ nm}$, 20 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 10 min), y luego

se incuban las plantas en oscuridad a diferentes temperaturas (4, 12, 17, 22 o 27 °C). Entre las 0 y 8 h de incubación se cosecharon muestras a diferentes tiempos y se determinó la proporción de Pfr con respecto al fitocromo total.

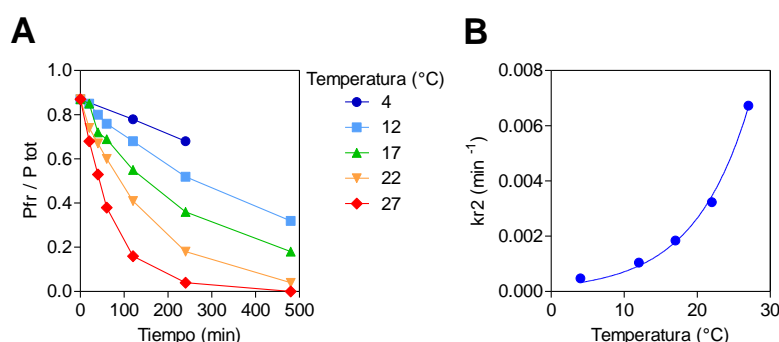


Figura 2.2 - *In vivo*, la reversión oscura del dímero Pfr-Pfr (D2) depende de la temperatura.

A - Datos de abundancia de Pfr en función del tiempo en plantas irradiadas un pulso de luz roja y posteriormente mantenidas en oscuridad (desde $t = 0$ min), a diferentes temperaturas.

B - Cálculo de la tasa de reversión en oscuridad (kr_2) en función de la temperatura calculada a partir de los datos en A y ajuste exponencial correspondiente a la ecuación 4.

Se observó que en oscuridad, a mayores temperaturas aumenta la velocidad de reversión de Pfr. Luego de 2 h de incubación en oscuridad, a 30 °C sólo quedaba un 5% de Pfr, mientras que a 10 °C aún se conservaba más del 65%. A partir de los resultados experimentales mostrados en la figura 2.2 A se calculó la velocidad de reversión térmica en oscuridad, kr_2 . kr_2 aumentó llamativamente con el aumento de la temperatura (Fig. 2.2 B), y esta respuesta pudo ser modelada con una función exponencial, de la siguiente forma:

$$kr_2 = 0.0004735 \cdot e^{0.09545 \cdot T} \quad R^2=0,95 \quad (4)$$

A pesar de que kr_2 aumentó sustancialmente con el aumento de temperatura, su magnitud continuó siendo muy pequeña comparada con las reacciones de fotoconversión. Este resultado es consistente con lo reportado anteriormente (Sweere, U. *et al.* 2001; Rausenberger, J. *et al.* 2010; Klose, C. *et al.* 2015).

El segundo experimento tiene como objetivo medir la reversión del heterodímero D1. Este experimento es similar al realizado en la figura 2.2 pero en este caso se indujo la formación de Pfr con 20 min de luz a diferentes temperaturas (4, 12, 17, 21, 27°C) y se midió el %Pfr inmediatamente después, sin incubación en oscuridad. Este experimento permite medir los niveles de Pfr formados a diferentes temperaturas pero aún en presencia de luz.

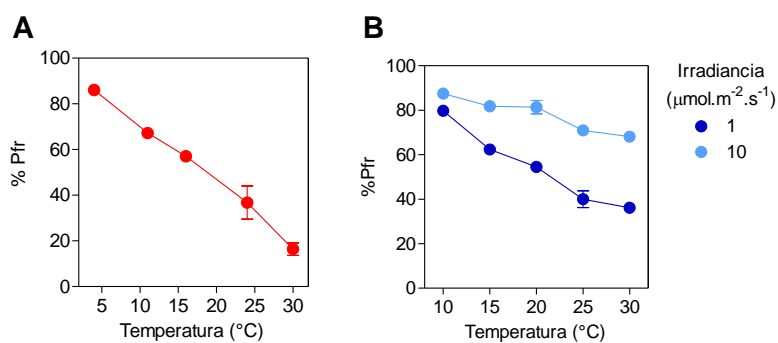


Figura 2.3 - Los niveles de Pfr *in vivo* disminuyen con el aumento de la temperatura en presencia de luz. Plántulas de *Arabidopsis* cultivadas en oscuridad por 3 días fueron irradiadas durante 20 minutos con luz roja, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (A) o con luz blanca, $R/RL=1,1$ de diferentes intensidades (B). Luego fueron congeladas y medidas en un espectrorradiómetro de doble longitud de onda (Ratiospec). Se determinó proporción de fitocromo activo (Pfr) con respecto al fitocromo total.

Así como se observó *in vitro*, *in vivo* al irradiar las plantas con $1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de luz roja la abundancia de la forma activa de phyB decae con el aumento de la temperatura, pasando de representar un 86 % del fitocromo total a $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a un 16 % a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Estas diferencias podrían ser aún mayores ya que en este caso se irradió por 20 min las muestras y según los datos *in vitro* a $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ los máximos valores de Pfr se alcanzan luego de 60 min a $1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, mientras que a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ luego de 20 min ya se deberían haber alcanzado.

Resultados preliminares muestran que en luz blanca al menos irradiando con $1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ o $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ se mantiene el efecto de la temperatura (Fig. 2.3 B). Sin embargo, no se logró reproducir este resultado a mayores irradiancias. Una explicación posible es que a estas irradiancias 20 minutos sean suficientes para inducir la acumulación de pigmentos fotosintéticos que interfieran con la medición. Por otro lado, también en base a los resultados obtenidos *in vitro*, es posible que durante los 20 min de irradiación no se alcancen las mayores diferencias posibles entre los tratamientos.

A partir de los resultados de la cuantificación de Pfr de la figura 2.3 A, los valores de reversión térmica kr_2 de la figura 2.2 B y utilizando cálculos desarrollados a partir de modelos matemáticos (Modelo de tres etapas, Fig. 1.3) (Klose, C. *et al.* 2015) se puede determinar la abundancia de los tres dímeros de phyB, D0, D1 y D2, para cada temperatura (Fig. 2.4).

Se observó que al aumentar la temperatura disminuye la abundancia del dímero D1 y más marcadamente la del dímero biológicamente activo D2 (Fig. 2.4). A partir de estas determinaciones se puede calcular la velocidad de reversión del heterodímero D1, denominada kr_1 .

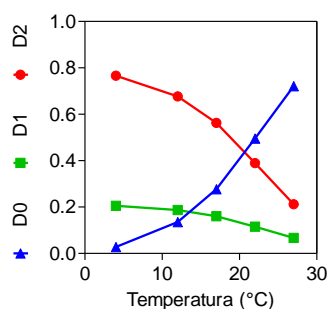


Figura 2.4 - La abundancia del homodímero D2 decae con la temperatura aún en presencia de luz. A partir de los datos de las Fig. 2.3 A y 2.2 B se calcularon los niveles de D0, D1 y D2 para cada temperatura evaluada.

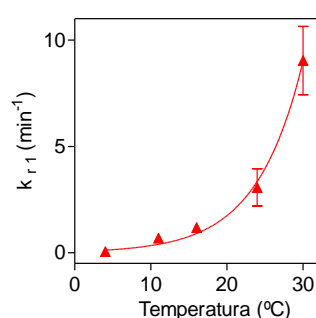


Figura 2.5 - La tasa de reversión del heterodímero D1 aumenta exponencialmente con la temperatura. A partir de los datos de la figura 2.3, la ecuación 4 y el modelo de tres etapas (Fig. 1.3) (Klose, C. et al. 2015) se pudo calcular la velocidad de reversión $kr1$ para cada condición experimental, y se la ajustó a un modelo exponencial mostrado en la ecuación 5.

Al igual que la tasa de reversión del homodímero D2, $kr2$ (Fig. 2.2 B) la tasa de reversión del heterodímero D1, $kr1$, también aumenta exponencialmente con la temperatura, de con la siguiente forma:

$$kr1 = 0.03369 \cdot e^{0.1860 \cdot T} ; R^2=0,99 \quad (5)$$

Esta tasa de reversión es comparable con las reacciones de fotoconversión (por ejemplo, con luz solar a $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ $k1 = 5,2 \text{ min}^{-1}$, $k2 = 2,2 \text{ min}^{-1}$), por lo que los diferentes niveles de phyB activo observados a diferentes temperaturas, aún en condiciones de luz, pueden ser explicados por un aumento en la tasa de reversión térmica.

La temperatura afecta a la localización de phyB.

Anteriormente mostramos que por efecto de la reversión térmica, los menores niveles de Pfr establecidos al disminuir la irradiancia causan la acumulación de phyB en gránulos nucleares pequeños. En base a esto razonamos que la disminución en los niveles de Pfr causados por las altas temperaturas podrían tener un efecto análogo en la localización nuclear de phyB. Para evaluar esta posibilidad analizamos la localización de phyB-GFP en plántulas de Arabidopsis cultivadas por tres días en luz blanca y el tercer día transferidas a diferentes combinaciones de luz blanca ($R/RL=1,1$, irradiancia variable entre 1 y $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) y temperatura. Al cabo de

3 h de tratamiento se observó la localización de phyB fusionado a YFP por microscopía confocal.

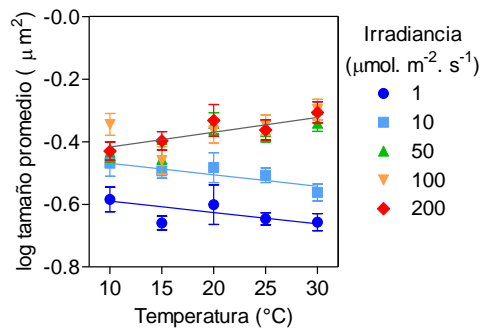


Figura 2.6 - La temperatura afecta a la localización sub-nuclear de phyB.

Plántulas de *Arabidopsis* conteniendo la construcción *pUBQ10::PHYB::YFP* fueron cultivadas durante 3 días en luz blanca, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 10 h y una hora después de comenzar el 4° día fueron transferidas a 25 combinaciones de luz (1, 10, 50, 100 y $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $R/RL=1$) y temperatura (10, 15, 20, 25 y $30 \text{ }^\circ\text{C}$). Al cabo de 3 h de tratamiento se observaron en el microscopio confocal. En cada foto se cuantificó el logaritmo del tamaño promedio de los gránulos nucleares. Las líneas corresponden al ajuste de los datos a regresiones lineales, para alta o baja irradiancia. En el caso de baja irradiancia la temperatura y la irradiancia tuvieron efectos significativos ($p < 0,05$). Para el caso de las altas irradiancias sólo se observó efecto de la temperatura ($p < 0,05$). Los datos provienen de 10 experimentos independientes. En cada experimento se ensayaron las 5 irradiancias en dos temperaturas diferentes.

La temperatura mostró diferentes efectos sobre la localización de phyB en gránulos. A bajas irradiancias, mayores temperaturas reducen el tamaño promedio de los gránulos, mientras que a altas irradiancias se ve el efecto contrario (Fig. 2.6). Una interpretación posible de este resultado es que la temperatura tenga dos efectos sobre la localización en gránulos de phyB. Por un lado, mayores temperaturas tendrían un efecto promotor de la formación de photobodies. Este sería un efecto particular de la temperatura exclusivamente sobre la localización de phyB, independiente de la actividad del receptor. Pero por otro lado, mayores temperaturas estarían aumentando la velocidad de reversión térmica, reduciendo la abundancia de phyB activo, D2 (Fig. 2.1, Fig. 2.3). Consistentemente con lo observado en el caso de la irradiancia y la relación R/RL (Fig. 1.13, Fig. 1.14, Fig. 1.15) esto causaría la desagregación de los gránulos grandes en otros más pequeños, reduciendo el tamaño promedio de los gránulos. A irradiancias altas, este efecto estaría contrarrestado por el efecto promotor de la luz sobre la actividad y la localización nuclear de phyB, y en consecuencia sólo se llega a evidenciar el efecto positivo de la temperatura sobre la formación de gránulos.

Del mismo modo que en el caso de la relación R/RL y la irradiancia, no se observó un efecto claro de la temperatura en la abundancia nuclear de phyB (Fig. 2.7).

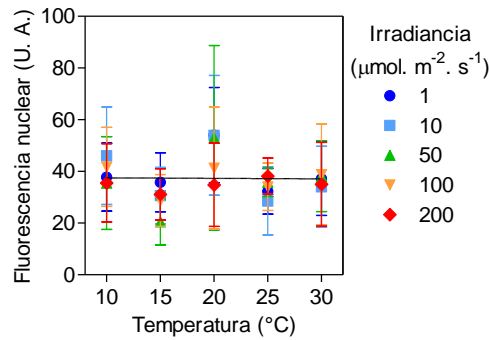


Figura 2.7 – Las mayores temperaturas no modifican la acumulación de phyB en el núcleo. En las mismas imágenes de la figura 2.6 se midió el brillo del núcleo. La regresión lineal no mostró efecto significativo de la temperatura. El ANOVA de dos factores seguido por comparaciones múltiples mostró diferencias significativas entre 20 °C y 15 °C y entre 20 °C y 25 °C.

Consistentemente con un rol de la reversión térmica en la reducción del tamaño de los gránulos de phyB, las variantes de phyB con menor reversión térmica phyB^{R582A} y phyB^{Y361F} no mostraron un efecto significativo de la temperatura en el tamaño promedio de sus photobodies (Fig. 2.8).

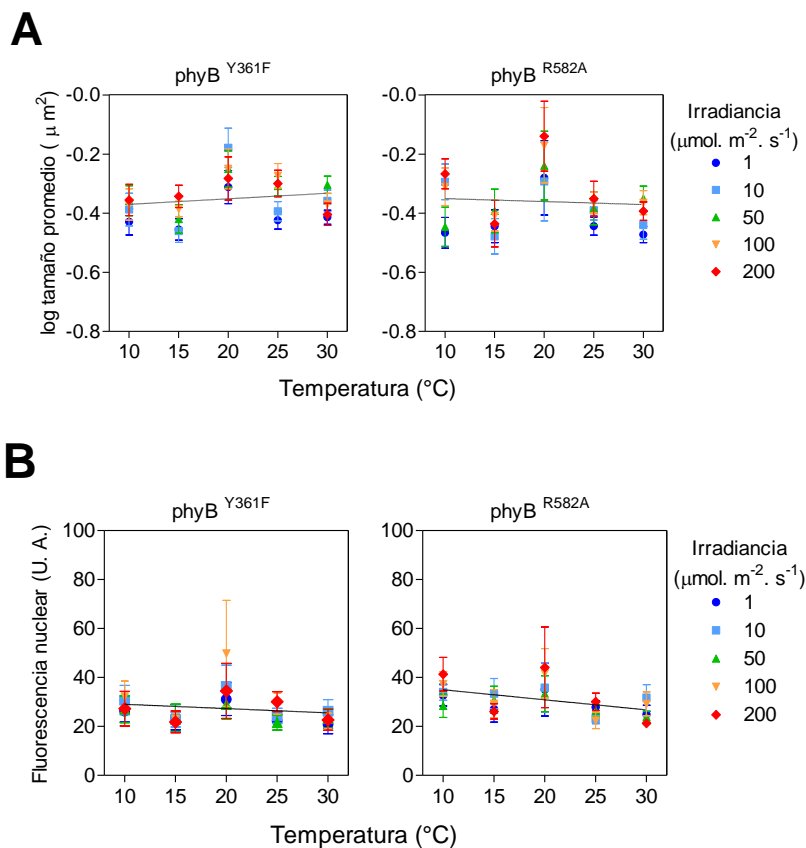


Figura 2.8 - La temperatura no afecta a la localización de phyB en las mutantes phyB^{R582A} y phyB^{Y361F}. Plántulas de Arabidopsis conteniendo la construcción pUBQ10::PHYB^{R582A}::YFP o pUBQ10::PHYB^{Y361F}::YFP fueron cultivadas durante 3 días en luz blanca, 50 μmol. m⁻². s⁻¹, fotoperíodo de 10 h y una hora después de comenzar el 4° día fueron transferidas a 25 combinaciones de luz (1, 10, 50, 100 y 200 μmol. m⁻². s⁻¹, R/RL=1) y temperatura (10, 15, 20, 25 y 30 °C). Al cabo de 3 h de tratamiento se observaron en el

microscopio confocal. En cada foto se cuantificó el logaritmo del tamaño promedio de los gránulos nucleares y el brillo nuclear. Las líneas corresponden al ajuste de los datos a regresiones lineales. Los datos provienen de 10 experimentos independientes. En cada experimento se ensayaron las 5 irradiancias en dos temperaturas diferentes. La pendiente de las regresiones lineales sólo es significativa en el caso de la fluorescencia nuclear en la línea phyB^{R582A}.

En este caso, al igual que en la fluorescencia nuclear de la línea salvaje, el único punto que se diferenció del resto es el de 20 °C. A esta temperatura se encontró una mayor localización nuclear de phyB, lo cual podría explicar el leve aumento en el tamaño de los gránulos a esta temperatura. Dado que este efecto se observó tanto en el caso del phyB salvaje como en las mutantes con menor reversión térmica no consideramos que este efecto tenga que ver con la actividad de phyB, sino que podría ser un efecto de la temperatura sobre la localización nuclear del receptor. Este efecto no se debe a la actividad del promotor *UBQ10*, ya que en plantas expresando phyB bajo el control del promotor *35S* se observó la misma tendencia (Fig. S.2). Alternativamente la temperatura podría afectar la abundancia de la proteína. Sin embargo, se ha demostrado que los cambios en la temperatura no afectan a la abundancia total de phyB (Jung, J.H. *et al.* 2016).

En base a estos resultados, podemos decir que la temperatura afecta la localización de phyB, cambiando el tamaño de los gránulos. Mayores temperaturas tienen un efecto positivo sobre la acumulación de phyB en gránulos, pero a bajas irradiancias se evidencia una reducción en el tamaño de los photobodies. Este resultado sumado a los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* por espectrofotometría, refuerza la idea de que phyB no respondería sólo a cambios en la cantidad o calidad de luz sino también a cambios de temperatura.

La respuesta termomorfogénica depende de phyB

Hasta el momento los resultados sólo indican que la abundancia de Pfr y D2 de phyB dependen de la temperatura. Sin embargo, podría ocurrir que los cambios en la actividad de phyB fueran compensados posteriormente por cambios en otros puntos de su cascada de señalización. Para poder evaluar si el efecto de la temperatura sobre la actividad de phyB tiene consecuencias funcionales se midió la elongación del hipocotilo en respuesta a tratamientos combinados de luz y temperatura. Se utilizaron plantas salvajes (Col), mutantes nulas de phyB y seis líneas transgénicas en las que la línea mutante de phyB se complementó con la versión salvaje (phyB) o mutantes phyB^{R582A} o phyB^{Y361F} bajo el control del promotor de *PHYB*. Las plantas se cultivaron en fotoperíodo de 10 h, con luz blanca de 50 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, por tres días, y una hora después de comenzado el cuarto día se transfirieron a los tratamientos. Las plantas se fotografiaron al comienzo y al final del día y se calculó el crecimiento en las 9h de tratamiento (Fig. 2.9).

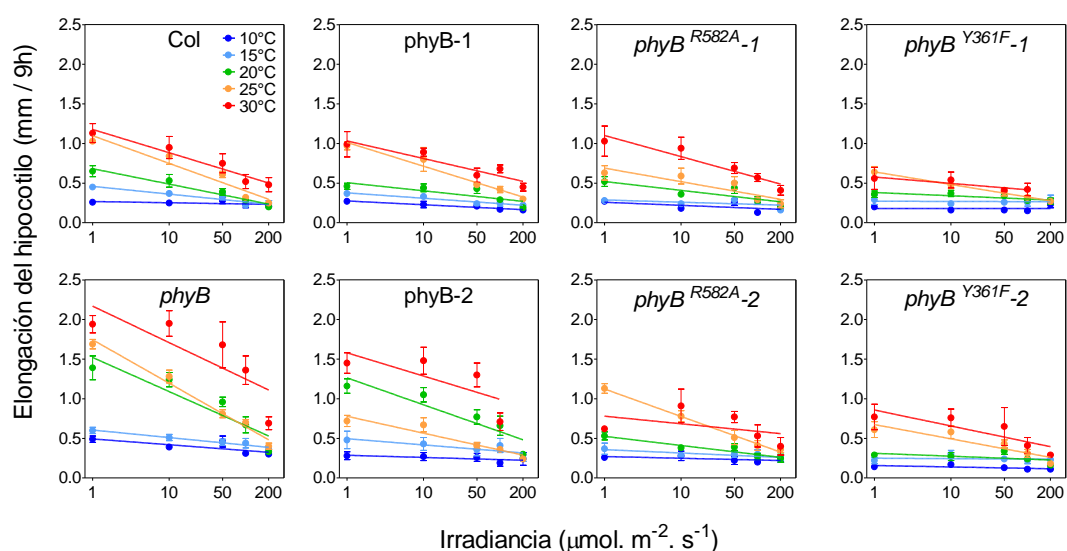


Figura 2.9 - Elongación del hipocotilo de plántulas de *Arabidopsis* en respuesta a los tratamientos de luz y temperatura combinados.

Se cultivaron plantas de *Arabidopsis* durante 3 días en condiciones de luz blanca, 50 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Una hora después del comienzo del cuarto día fueron transferidas a 25 combinaciones de luz y temperatura, resultantes de combinar 5 irradiancias (1, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) con 5 temperaturas (10, 15, 20, 25 y 30). Se midió la elongación del hipocotilo durante 9h (hasta el final del fotoperíodo). Los valores graficados corresponden a la media \pm EE de al menos dos experimentos independientes y 4 a 12 réplicas.

Como era de esperarse, la respuesta a la irradiancia mostró una pendiente negativa en todos los casos. La respuesta dependió del genotipo. La mutante nula de phyB fue la que mayor pendiente de respuesta a la irradiancia mostró, mientras que las líneas complementadas con variantes de phyB con menor reversión térmica mostraron una menor pendiente de respuesta a la irradiancia (Fig. 2.9).

Esto es consistente con que el efecto de la reversión térmica sobre la actividad de phyB impactaría sobre la respuesta a la irradiancia. Las plantas que expresan variantes estables (phyB^{R582A} y phyB^{Y361F}) responden a la luz aún cuando la irradiancia es baja. Por otro lado, se

evidencia el efecto de otros fotorreceptores en esta respuesta, ya que aún cuando *phyB* está mutado las plantas responden fuertemente al aumento de la irradiancia.

Por otro lado, se observó una fuerte interacción entre la respuesta a la irradiancia y la temperatura, lo que se evidencia en la pendiente de las regresiones lineales de la respuesta a la irradiancia. Las mayores temperaturas mostraron la mayor respuesta a la irradiancia (mayor pendiente). Esto es consistente con la idea de que a mayores temperaturas aumentaría la tasa de reversión térmica, y en consecuencia el sistema depende más de la luz para establecer ciertos niveles de *phyB* activo e inhibir la elongación. Sin embargo en las mutantes que no tienen reversión, aunque en menor medida, también se vio este efecto de la temperatura, evidenciando que la temperatura tiene otros mecanismos de acción. Excepcionalmente en algunos casos se vio que a 30 °C la pendiente disminuyó con respecto a 25 °C. Esto se debió a que a esta temperatura no se observaron diferencias en la elongación a 1 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y a 10 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, evidenciando que a altas temperaturas, a irradiancias menores a 10 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ se alcanza la máxima elongación posible, y la respuesta se satura.

Como se puede observar entonces, existe una fuerte interacción entre las condiciones lumínicas, la temperatura y la estabilidad del Pfr (en este caso dado por el genotipo) en el control de la elongación del hipocotilo. Como se mencionó anteriormente el objetivo de este experimento era discernir si el efecto de la temperatura sobre la reversión térmica del fitocromo tiene un impacto en la respuesta morfogénica de elongación del hipocotilo. Para poder extraer esta información de los datos se procedió a realizar un modelado matemático de la elongación del hipocotilo en función de las variables estudiadas.

El modelo, a grandes rasgos, consistió en expresar la elongación del hipocotilo en las 9 h de tratamiento (G) como la elongación máxima alcanzable (G_0) dividida por la suma de los factores que inhiben la elongación. Esta aproximación ha sido utilizada en otras ocasiones para modelar la elongación del hipocotilo (Sellaro, R. *et al.* 2010).

En nuestras condiciones la máxima elongación se observó en la línea mutante *phyB*, a 1 o 10 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, a 30 °C, y tomó el valor 1,9 mm/9 h.

Los factores que afectan la elongación del hipocotilo en nuestras condiciones experimentales fueron la luz, la temperatura, y la velocidad de reversión térmica de *phyB*. Tanto la luz como la temperatura tienen un efecto sobre la actividad del fitocromo, dado por su impacto sobre las reacciones de fotoconversión y de reversión térmica, así como efectos independientes de *phyB* (Fig. S.3). Dado que nuestro objetivo es discernir entre los efectos mediados por *phyB* y los independientes, nuestro modelo puede expresarse como:

$$G = \frac{G_0}{\text{Efecto de } phyB + \text{Efecto de Temperatura} + \text{Efecto de otros fotorreceptores}}$$

Para poder estimar el efecto de cada factor por separado seleccionamos subgrupos de datos donde se minimice la variación de otros parámetros y se maximice la variación del parámetro de interés. Habiendo seleccionado los datos para cada caso, el valor de cada parámetro se estimó utilizando regresiones simples.

Primero se estudió el efecto de la temperatura. En la figura 2.9 se mostró que a 30 °C en muchos casos se alcanzaba el crecimiento máximo. Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la elongación del hipocotilo se extendió el análisis a temperaturas mayores a 30 °C.

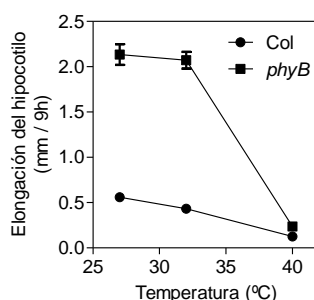


Figura 2.10 - El efecto promotor de la elongación de las altas temperaturas alcanza el umbral a 30 °C. Se muestra la elongación del hipocotilo de plantas salvajes y mutantes *phyB* sometidas al mismo diseño experimental de la figura 2.9 sometidas a $10 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y temperaturas mayores a las evaluadas anteriormente. Los datos corresponden al promedio \pm EE de 5 réplicas. Resultados similares se obtuvieron en 3 experimentos independientes.

A pesar de que en el rango evaluado previamente (10-30 °C), las altas temperaturas tenían un efecto promotor de la elongación, esta respuesta tiene un límite. Temperaturas mayores a 30°C tienen un efecto inhibitorio de la elongación, probablemente debido a la generación de estrés térmico. Este efecto se observó tanto en plantas salvajes como en mutantes de *phyB*, mostrando que esta respuesta a las temperaturas muy altas es independiente de la acción del receptor (Fig. 2.10).

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la elongación del hipocotilo se utilizó el subgrupo de datos correspondiente a plantas mutantes de *phyB* (se evita el efecto de la temperatura a través de la reversión térmica), sometidas a muy baja irradiancia ($1 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, a esta irradiancia, a 30°C ya no se observa efecto inhibitorio de la luz). Dado que el modelo de elongación del hipocotilo se basa en los factores que inhiben la elongación, no se utilizó el valor de la temperatura sino su inversa. Además, teniendo en cuenta los resultados de la figura 2.10, se puso un tope al efecto de la temperatura en 30°C, con lo que el término de la temperatura resultó $(1/T)-(1/30^\circ\text{C})$. Las temperaturas evaluadas (10, 15, 20, 25 y 30°C) mostraron un efecto continuo en la promoción de la elongación del hipocotilo, que se ajustó a una función lineal (Fig. 2.11)

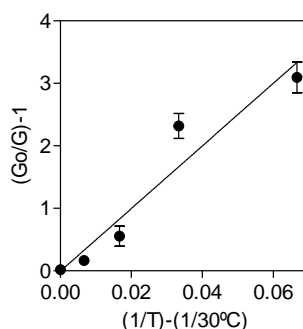


Figura 2.11 - Efecto de la temperatura independiente de *phyB* sobre la elongación del hipocotilo.

Regresión lineal de la elongación del hipocotilo en función de la inversa de la temperatura corregida por el valor umbral de 30°C. Los datos corresponden al mutante *phyB*, a $1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Se grafica el promedio \pm EE de 7 a 12 réplicas por punto. $R^2 = 0,9238$. Pendiente = 50 ($p < 0,01$). Ordenada al origen = $-6,1 \cdot 10^{-4}$ ($p > 0,05$).

En segundo lugar se evaluó el efecto de la luz percibida por otros fotorreceptores (por ejemplo criptocromos, o los restantes fitocromos A, C, D y E). Para esto se utilizaron las plantas mutantes de *phyB*, cultivadas a 30°C para evitar el efecto inhibitorio de las bajas temperaturas sobre la elongación, en todas las irradiancias de luz blanca utilizadas (1, 10, 50, 100 y 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Como era esperado, a mayor irradiancia de luz blanca se observó una mayor inhibición de la elongación, que también se ajustó a una función lineal (Fig 2.12).

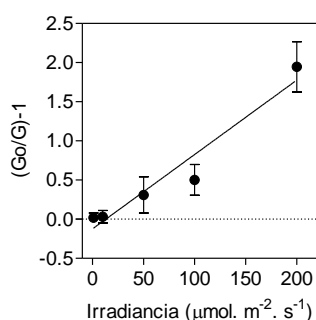


Figura 2.12 - Efecto de la luz percibida por otros fotorreceptores (no *phyB*) sobre la elongación del hipocotilo.

Regresión lineal de la elongación del hipocotilo en función de la irradiancia. Los datos corresponden al mutante *phyB*, a 30°C. Se grafica el promedio \pm EE de 4 a 7 réplicas por punto. $R^2 = 0,9386$. Pendiente = 0,009 ($p < 0,01$). Ordenada al origen = $-0,1$ ($p > 0,05$).

En tercer lugar se evaluó el efecto de la actividad de *phyB* sobre la elongación del hipocotilo. En nuestro diseño experimental la actividad de *phyB* dependerá de la presencia de la proteína (en el mutante de *phyB* será cero), de la temperatura a través de la reversión térmica, de la luz a través de las reacciones de fotoconversión, y del efecto de las mutaciones que inhiben la reversión térmica. En consecuencia, para calcular la abundancia del homodímero activo D2 en cada condición se utilizó el método analítico basado en el modelo de tres etapas (Fig. 1.3) (Klose, C. *et al.* 2015). Las constantes de fotoconversión k_1 y k_2 para cada irradiancia se calcularon según (Kelly, J.M. *et al.* 1985), a partir del espectro medido de la fuente de luz utilizada (ver Materiales y Métodos, Fig. M.1 B). Las constantes de reversión térmica kr_1 y kr_2 se calcularon según las ecuaciones 4 y 5, (Fig 2.2 y 2.5), para cada temperatura. Además en el caso de las mutantes *phyB*^{R582A} y *phyB*^{Y36F} la tasa de reversión se corrigió por el factor informado en (Burgie, E.S. *et al.* 2014). Habiendo calculado el valor de D2 para cada condición, se modeló la elongación del hipocotilo de todos los genotipos, en todas las irradiancias, a 30°C para evitar el efecto inhibitorio de la elongación de las bajas temperaturas (Fig. 2.10).

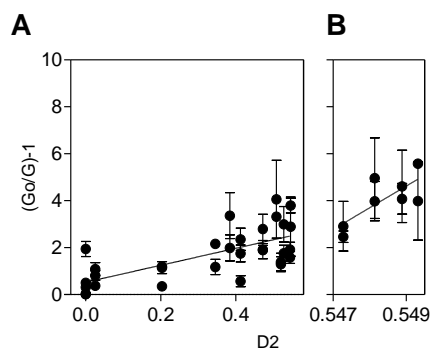


Figura 2.13 - Efecto inhibitorio de la elongación de los niveles de phyB activo (D2).

Regresión bi lineal de la elongación del hipocotilo en función de los niveles de dímero D2. Los datos corresponden a todos los genotipos, en todas las irradiancias, a 30°C. Se grafica el promedio \pm EE de 4 a 12 réplicas por punto. A- Valores bajos de D2. Pendiente= 3,6 ($p < 0,001$). Ordenada al origen = 0,5 ($p > 0,05$). $R^2=0,48$. B- Valores altos de D2. Pendiente= -926 ($p < 0,05$). Ordenada al origen = -503 ($p < 0,05$). $R^2=0,56$.

El efecto de la actividad de phyB sobre la elongación no pudo ser modelado por una regresión lineal sino que mostró un efecto bifásico (Fig. 2.13). A valores bajos se observa que aumentos en la actividad de phyB tienen poco efecto sobre la elongación, mientras que a valores muy altos se observa un efecto mayor. El punto de corte estimado fue $D2=0.547$.

Habiendo estimado los efectos particulares se procedió a analizar el efecto de la interacción entre estos. Se probaron todas las posibilidades de interacciones simples y sus combinaciones (Tabla 1).

Tabla 1: Evaluación de la significancia de los efectos de interacción simples y sus combinaciones sobre la elongación del hipocotilo.

Interacción	Valor estimado	P	R ²
(1/T-1/30) * D2	66,56	<0.0001	0,19
(1/T-1/30) * Irradiancia	-0,0039	0,95	
Irradiancia * D2	-0,01	0,17	
(1/T-1/30) * D2	69,05	<0.0001	0,18
(1/T-1/30) * Irradiancia	-0,05	0,34	
(1/T-1/30) * Irradiancia	0,17	0,0013	0,05
Irradiancia * D2	-0,01	0,0335	
(1/T-1/30) * D2	66,14	<0.0001	0,19
Irradiancia * D2	-0,01	0,096	
(1/T-1/30) * D2	63,24	<0.0001	0,18
Irradiancia * D2	-0,001	0,67	0,0009
(1/T-1/30) * Irradiancia	0,11	0,014	0,03

La única interacción significativa fue entre la temperatura y el nivel de D2 (Tabla 1). Entonces, el modelo final fue:

$$G = \frac{G_0}{1+K \cdot D2 + a \cdot ([1/T] - [1/30^\circ C]) + b \cdot I + c \cdot D2 \cdot ([1/T] - [1/30^\circ C])} \quad (6)$$

donde G indica el crecimiento durante las 9h de tratamiento, G_0 es el crecimiento máximo observado, K , el parámetro asociado a la actividad de phyB (D2) que mostró tomar dos valores dependiendo del nivel de D2, a el efecto de la temperatura (T), que a su vez tiene un límite en 30°C, b es el efecto de la irradiancia percibido por otros fotorreceptores diferentes a phyB (I), y c el efecto de la interacción entre D2 y la temperatura.

Para probar la bondad de ajuste de los datos al modelo graficamos la elongación del hipocotilo durante las 9 h de tratamiento medida en nuestros experimentos (Fig. 2.9, “observado”) en función del valor estimado por el modelo (“predicho”).

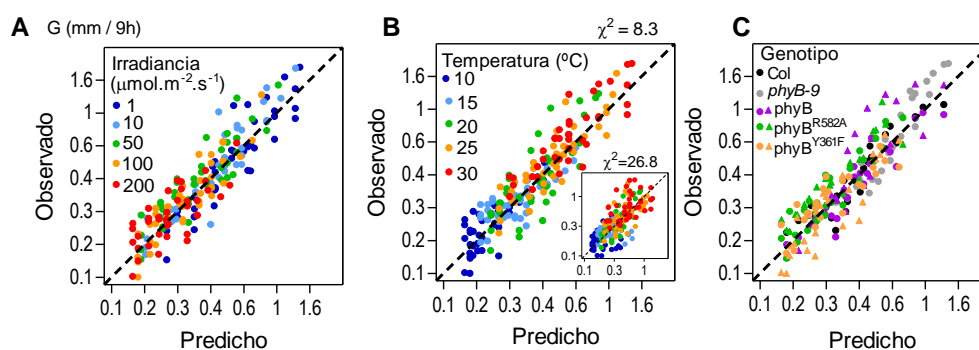


Figura 2.14 - Evaluación del modelo de crecimiento del hipocotilo.

Para cada condición experimental (irradiancia, temperatura y genotipo) se muestra el valor de elongación del hipocotilo medido durante las 9h de tratamiento en función del valor estimado en base al modelo presentado (Ecuación 6). En línea punteada se muestra la relación 1:1.

A- Se asignaron colores a cada irradiancia. B- Se asignaron colores diferentes a cada temperatura. Además se indica el valor obtenido en la prueba de Chi-cuadrado de bondad de ajuste del modelo. Recuadro: se calculó el largo del hipocotilo desestimando el efecto de la temperatura sobre la actividad de phyB, utilizando los valores de D2 fijos para 10°C. Se indica el valor obtenido en la prueba de Chi-cuadrado en este caso. C- Se asignaron colores diferentes a cada genotipo, y en este último caso también se adjudicaron formas diferentes a las dos líneas independientes de cada construcción (phyB, phyB^{R582A} o phyB^{Y361F}) evaluadas.

El modelo mostró una buena capacidad predictiva, no mostrando desviaciones sistemáticas de la línea 1:1 en ninguna irradiancia (Fig. 2.14 A), temperatura (Fig. 2.14 B) o genotipo (Fig. 2.14 C). El único genotipo que se separa un poco del grupo es la línea 2 de la mutante phyB^{R582A} (triángulo naranja). Esto puede explicarse en base a la cantidad de proteína, ya que esta línea tiene niveles más bajos que el resto (Zhang, J. *et al.* 2013).

Para probar la significancia del efecto de la temperatura sobre los niveles de phyB activo (D2) recalculamos el modelo, pero en este caso calculando D2 sólo en base al genotipo y la irradiancia, manteniendo las reacciones de reversión térmica fijas para 10°C. Para comparar la bondad de ajuste de este modelo y el modelo original utilizamos la prueba de Chi-cuadrado. Dado que ambos modelos tienen el mismo número de parámetros se pueden comparar directamente los valores, siendo un menor valor indicador de un mejor ajuste. El resultado obtenido indicó que desestimar el efecto de la temperatura sobre phyB empeora la capacidad predictiva del modelo (Fig. 2.14 B, recuadro). Esto indica que la percepción de la temperatura por parte de phyB tiene un efecto significativo sobre la respuesta termomorfogénica.

Para poder evaluar la magnitud de este efecto, calculamos el efecto de la temperatura dependiente de phyB, la interacción entre el efecto de phyB y la temperatura, y el efecto independiente de phyB. Esto se realizó calculando la elongación del hipocotilo según el modelo, pero desestimando el efecto de la temperatura en ciertos términos en cada caso (ver Materiales y métodos, Fig. M2).

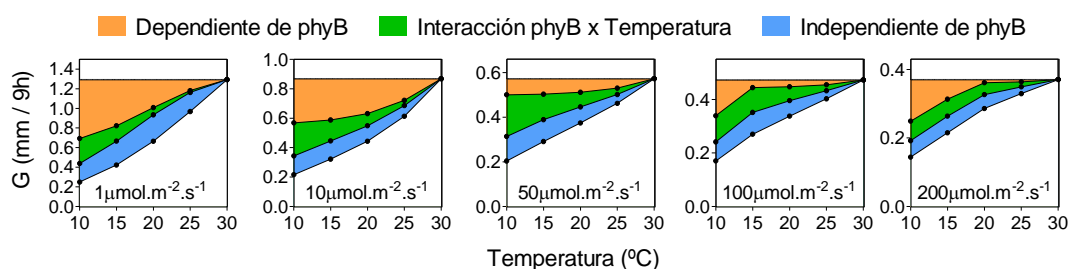


Figura 2.15 - Contribución de phyB a la respuesta termomorfogénica.

Para cada irradiancia se calculó el crecimiento máximo alcanzable, manteniendo D2 correspondiente a 30°C y la temperatura también constante a 30°C, en los términos particulares y en la interacción. Esto se graficó como una línea horizontal ya que ningún parámetro cambia en función de la temperatura. Para estimar el efecto dependiente de phyB calculamos el crecimiento manteniendo la temperatura constante para el término de la temperatura y la interacción, pero contemplando el efecto de la temperatura sobre D2. Para estimar el efecto de la interacción mantuvimos $T=30^{\circ}\text{C}$ sólo para el término de temperatura, modificando para cada temperatura el término de D2 y el de interacción. Finalmente calculamos el crecimiento con el modelo completo, con todos los términos siendo afectados por la temperatura.

Observamos que el efecto de la temperatura dependiente de phyB fue significativo en todas las irradiancias y a todas las temperaturas. A bajas irradiancias el efecto se hace más evidente. Esto se debe a que en estas condiciones las reacciones de fotoconversión serían muy lentas, por lo que las reacciones de reversión térmica tendrían un efecto más importante. Al ir aumentando la irradiancia la contribución del efecto dependiente de phyB disminuye, lo que sería consistente con un mayor efecto de la luz en el establecimiento de los valores de D2, en detrimento del efecto de la temperatura. En cualquier caso, independientemente de la irradiancia, las bajas temperaturas permitirían que se establezcan mayores niveles de phyB, permitiendo una mayor inhibición de la elongación del hipocotilo.

En base a toda la evidencia presentada en este trabajo proponemos que phyB actuaría como un receptor de temperatura. La temperatura impactaría sobre la velocidad de la reversión térmica, reduciendo los niveles de phyB activo a altas temperaturas, y consecuentemente se desreprimiría el crecimiento del hipocotilo, permitiendo que aún en condiciones de luz, la plántula aleje los tejidos fotosintéticos del suelo caliente.

3.Otras consecuencias funcionales de la integración de señales por parte de phyB

phyB integra señales de luz y temperatura en ciclos diarios de luz y oscuridad.

Los experimentos hasta aquí descritos se basan en la respuesta a un cambio abrupto, en medio del día, en las condiciones de luz y temperatura. Una posibilidad sería que luego de este cambio el sistema volviera a su estado basal y la planta se aclimate a estas nuevas condiciones. Sin embargo, cuando estas señales son constantes se observa que la respuesta de elongación del hipocotilo o de hiponastia también se mantienen. Por otro lado, las condiciones de luz varían entre el día y la noche, y no conocemos cómo la temperatura interactúa con la luz en esta situación en el control de la actividad de phyB. Es por esto que nos resultó interesante evaluar el estado del receptor phyB en tratamientos de alta temperatura constante y condiciones alternadas de luz entre el día y la noche. Para esto se cultivaron plantas de Arabidopsis del genotipo PGB en fotoperiodo de 8 h de luz blanca $50 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, a 22 °C o 28 °C. Al cabo de 7 días se estudió durante un día completo la localización subcelular de phyB.

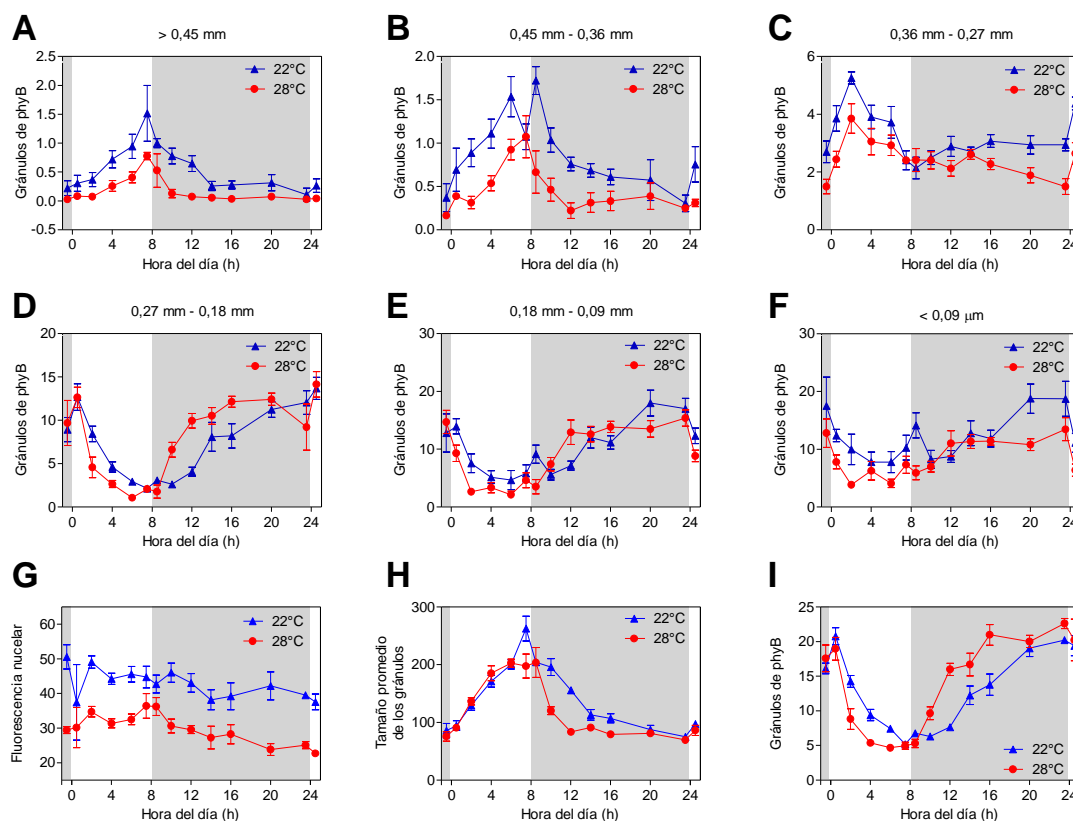


Figura 3.1 - phyB integra las señales de luz y temperatura en ciclos de luz/oscuridad a temperatura constante.

Plantas del genotipo PGB (transgénicas acarreando la construcción $35S::PHYB::GFP$ en fondo genético Ler) fueron cultivadas durante 7 días en fotoperiodo de 8h, con luz de $50 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, a 22°C o 28°C. Entre el séptimo y el octavo día se analizó la localización de phyB mediante microscopía confocal.

A a F - Número de gránulos clasificado por categorías de tamaño, en μm , medidos con el programa Matlab. G - Brillo promedio del núcleo. H - Tamaño promedio de los gránulos, en píxeles, medidos con el programa Icy. I - Número de gránulos medidos con el programa Icy.

Aún en condiciones de temperatura constante se observó el efecto de la temperatura en la localización de phyB. A 28°C se observa menor abundancia nuclear total y menos gránulos grandes durante todo el fotoperiodo que a 22 °C. Estos efectos de la temperatura a largo plazo son diferentes a los efectos observados a tiempos cortos. Probablemente, a largo plazo se evidencie un efecto acumulativo de la temperatura en los niveles de phyB activo. Mientras que en las figuras 2.6 y 2.7 se partió de una condición donde phyB ya estaba en el núcleo y los gránulos estaban formados, en este caso las plantas experimentan alta temperatura durante los días previos, la noche anterior y durante todo el día, y en ningún momento se dan las condiciones óptimas para la activación de phyB y la consecuente entrada al núcleo.

En cuanto al efecto de la luz, como se había observado en casos anteriores (Fig. 1.4), tampoco se observaron cambios en la abundancia nuclear, excepto por una sutil disminución de la fluorescencia durante la noche. Sin embargo, sí se ve un efecto muy claro en el control del tamaño de los gránulos, el cual es consistente con lo esperado en base a los resultados anteriores. Durante el día, en presencia de luz, aumentan los gránulos grandes, y los chicos aumentan durante la noche cuando la abundancia de Pfr disminuiría como consecuencia de la falta de luz. El tamaño promedio de los gránulos mostró el mismo efecto de la luz que el observado previamente (Fig. 1.14). Sin embargo, cabe destacar que la velocidad de respuesta a los cambios en las condiciones de luz y oscuridad fueron mucho más lentos que en el caso de los tratamientos anteriores, donde el estímulo se percibía en medio del día. Mientras que en respuesta a cambios rápidos en las condiciones ambientales los gránulos responden en 30 min y se mantienen estables durante al menos 4h (Fig. 1.2, Fig. 1.9), en condiciones de fotoperiodo la respuesta a la luz no se estabiliza a las 4 h, sino que sigue en aumento hasta el final del día, y cuando se oscurece nuevamente la respuesta se ve durante toda la noche. Esto indica que dependiendo de la historia de vida de la planta, diferentes mecanismos actúan para definir la localización de phyB.

En la transición día-noche se observó un efecto de interacción entre la luz y la temperatura. En casi todos los casos se observó que mayores temperaturas aceleraron las respuestas observadas en oscuridad, disminuyendo más rápidamente el número de gránulos grandes, aumentando el número de gránulos chicos, y el tamaño promedio de los gránulos. Esto sería consistente con el efecto de la temperatura observado sobre la reacción de reversión térmica del homodímero activo D2, kr2. A mayores temperaturas esta reacción es más rápida, con lo que en oscuridad los niveles de Pfr se reducirían más rápido a 28°C que a 22°C. Esto es consistente con lo propuesto por Jung *et. al.* (2016) donde proponen que las temperaturas de la noche afectan a la elongación de las plántulas debido a una inactivación más rápida de phyB.

Señalización río debajo de phyB

Hasta este punto hemos demostrado que phyB tiene la capacidad de percibir e integrar las señales de luz y temperatura, y tanto en ciclos de luz/oscuridad como en cambios repentinos en las condiciones ambientales, la luz y la temperatura afectan a la localización de phyB. Sin embargo, no conocemos el significado biológico de este cambio de localización. En esta última sección evaluaremos si los cambios en la localización de phyB impactan sobre la abundancia nuclear de algunos de sus blancos de acción.

Las vías de acción de phyB se pueden dividir en dos grandes ramas. En ambos casos su función consiste en inactivar o degradar proteínas nucleares. Una rama involucra a los factores de transcripción bHLH de la familia PIF. Entre los miembros de esta familia evaluamos a PIF4, que ha sido descrito como un integrador de señales de luz y alta temperatura, y tiene un fuerte impacto sobre la morfogénesis en plantas adultas (Leivar, P. *et al.* 2008; Koini, M.A. *et al.* 2009; Ma, D. *et al.* 2016; Quint, M. *et al.* 2016). Esta proteína se localiza en el núcleo y gran parte de su regulación depende del control de su abundancia nivel transcripcional y post-traducciona (Lorrain, S. *et al.* 2008; Koini, M.A. *et al.* 2009; Stavang, J.A. *et al.* 2009; Foreman, J. *et al.* 2011). Por otro lado, la segunda rama de la señalización río debajo de phyB implica la regulación de la E3 ligasa COP1. Mutantes de este gen tienen fuertemente impedida la repuesta a la luz y la temperatura. Durante la des-etiolación y la repuesta de escape al sombreado su actividad depende de su localización, promoviendo el crecimiento cuando se encuentra en el núcleo (von Arnim, A.G. *et al.* 1994; von Arnim, A.G. *et al.* 1997; Pacín, M. *et al.* 2013; Pacín, M. *et al.* 2014). En base a estos antecedentes, decidimos evaluar la abundancia y localización de estas proteínas y la elongación del hipocotilo en diferentes condiciones de crecimiento, en las cuales conocemos el estado de phyB.

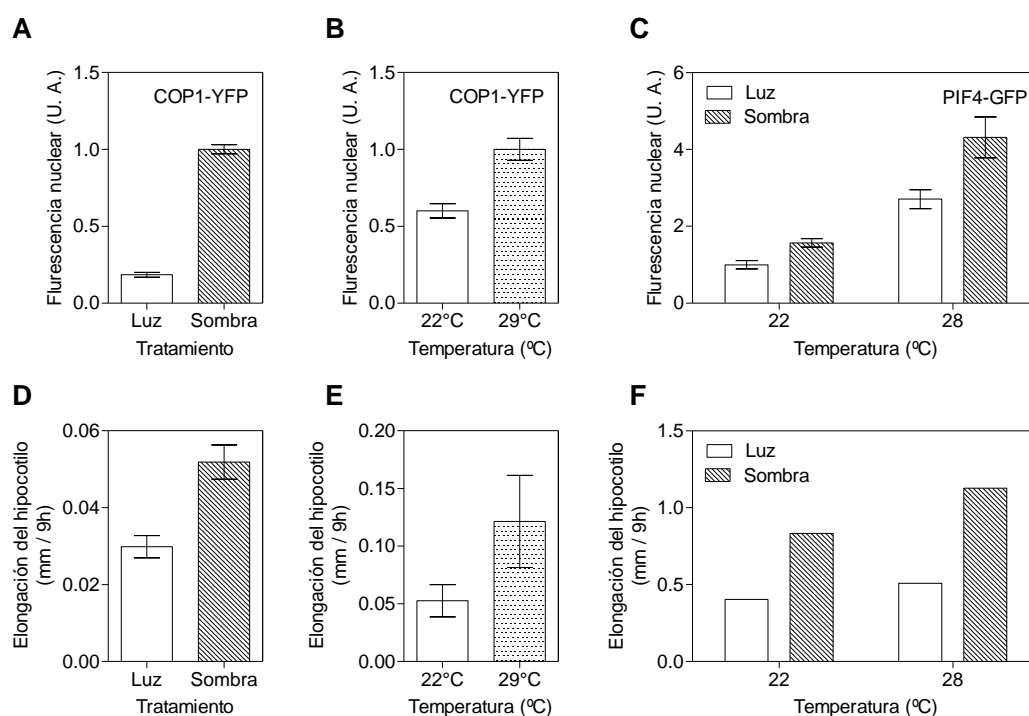


Figura 3.2 - Los blancos de phyB, COP1 y PIF4, integran señales de sombra y temperatura.

A - Plantas transgénicas conteniendo la construcción 35S::YFP::COP1 fueron cultivadas durante 3 días en condiciones de luz, fotoperiodo 10h. A las 6h del cuarto día la mitad de las plantas fueron transferidas a condiciones de sombreado utilizando filtros verdes, mientras que el resto de las plantas se mantuvo en condiciones de luz hasta el final del fotoperiodo. Los datos corresponden a la media \pm EE de al menos 5 réplicas.

B - Plantas transgénicas conteniendo la construcción 35S::YFP::COP1 fueron cultivadas durante 4 días en condiciones de luz continua. El quinto día la mitad de las plantas se transfirieron a 29°C mientras que el resto se mantuvo a 22°C por 4h antes de ser tomadas las imágenes. Los datos corresponden a la media \pm EE de al menos 8 réplicas en 4 experimentos.

C - Plantas transgénicas conteniendo la construcción pPIF4::PIF4::GFP fueron cultivadas por tres días en condiciones de fotoperiodo de 8h, en luz blanca o sombra obtenida interponiendo 2 filtros verdes, a 22°C

o 28°C. Las imágenes se tomaron entre las 3 y 4h del tercer día. Los datos corresponden a la media \pm EE de 6 réplicas.

D - Elongación del hipocotilo de plantas salvajes cultivadas en las mismas condiciones de A, plantas transferidas a sombra 1h después del inicio del día.

E - Elongación del hipocotilo de plantas salvajes cultivadas en las mismas condiciones de B, plantas transferidas a 29°C 1h después del inicio del día.

F - Tasa de crecimiento del hipocotilo de plantas salvajes des-etioladas transferidas a las mismas condiciones de C, calculado según el modelo de la ecuación 6.

Las dos proteínas estudiadas mostraron una fuerte respuesta a las condiciones de luz y temperatura del ambiente. La fluorescencia nuclear de COP1 y PIF4 aumentó en respuesta al sombreado y a las altas temperaturas (Fig. 3.2 A, B, C). Como era de esperarse, en ambos casos, el aumento de la fluorescencia nuclear correlacionó con una mayor elongación del hipocotilo (Fig. 3.2 D, E, F). En todos estos casos, la mayor abundancia nuclear de COP1 y PIF4 correlaciona con una menor actividad de phyB, ya sea por efecto de la luz o la temperatura. En base a lo reportado en otros trabajos (Lorrain, S. *et al.* 2008; Li, J. *et al.* 2011; Pacín, M. *et al.* 2013; Pacín, M. *et al.* 2014), entonces, podemos suponer que tanto en respuesta a la luz como a la temperatura phyB regularía la elongación del hipocotilo modulando la abundancia nuclear de al menos dos de sus targets conocidos. Dado que en respuesta a la luz a corto plazo la abundancia nuclear de phyB no cambia pero sí cambia su localización, de manera acorde con la menor abundancia de phyB activo D2, probablemente la formación de gránulos sea importante en la vía de señalización para la exclusión de COP1 y PIF4. Por el contrario, en respuesta a la temperatura, a la irradiancia utilizada en estos experimentos, no se espera una reducción en el tamaño promedio de los gránulos de phyB. Sin embargo la abundancia de COP1 y PIF4 disminuye, por lo que la localización en gránulos no parecería reflejar actividad del receptor. En el caso de PIF4 esta afirmación no es concluyente ya que el tratamiento de temperatura duró dos días, por lo que la abundancia nuclear de phyB y la cantidad de gránulos grandes podría haber disminuido, pero en el caso de COP1 el tratamiento es igual al de la figura 2.6.

En segundo lugar evaluamos la acumulación nuclear de COP1 y PIF4 en ciclos diarios de luz/oscuridad a 22°C o 28°C, en un experimento análogo al de la figura 3.1, utilizando plantas transgénicas con la construcción 35S::YFP::COP1 o pPIF4::PIF4::GFP.

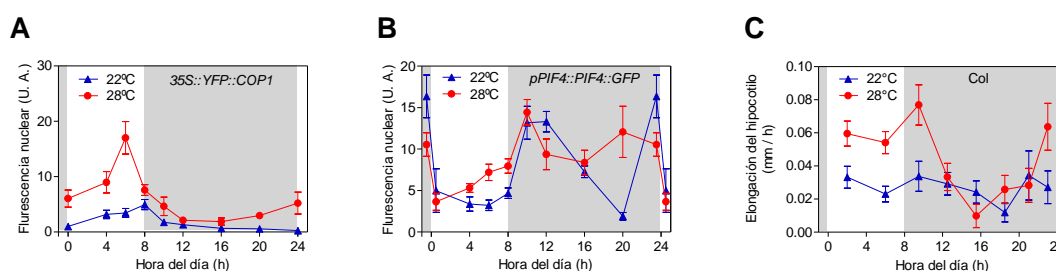


Figura 3.3 - Los blancos de phyB, COP1 y PIF4, integran señales de luz y temperatura a lo largo del día.

A y B - Plantas de *Arabidopsis* conteniendo 35S::YFP::COP1 (A), pPIF4::PIF4::GFP (B) fueron cultivadas durante 7 días en fotoperíodo de día corto (8h luz – 16h oscuridad), a 22°C o 28°C. El día del experimento se tomaron imágenes de microscopía confocal cada 2h o 4h. Los datos corresponden a la media \pm EE de 4 o 5 (A) o 2 a 8 (B) cajas independientes, cada una representada por al menos 3 plantas.

C - Plantas salvajes fueron cultivadas en las mismas condiciones que las mencionadas anteriormente. Se tomaron fotografías de las mismas a las 0, 4, 8, 11, 14, 17, 20, 22 y 24hs del día (las 0h representan el momento en el que se enciende la luz). Se calculó la elongación del hipocotilo promedio por hora en cada intervalo. Se grafica la tasa de crecimiento promedio en medio de cada intervalo.

Como era de esperarse, a mayor temperatura en general se observa una mayor acumulación de PIF4 y COP1. Sin embargo, el patrón de acumulación nuclear de estas proteínas en muchos momentos del día no puede explicarse tomando en cuenta sólo la actividad de phyB.

En el caso de PIF4 (Fig. 3.3 B), a grandes rasgos, la proteína se acumula durante la noche mucho más que durante el día, siendo este patrón consistente con el modelo propuesto hasta el momento, en el que la abundancia de PIF4 sería inversa a la actividad de phyB. La mayor abundancia se observa al final de la noche, tanto a 22°C como a 28°C. Esto es consistente con lo observado previamente (Nozue, K. *et al.* 2007; Nusinow, D.A. *et al.* 2011). Este punto del día coincide con el menor tamaño promedio y la mayor abundancia de gránulos pequeños de phyB. A su vez, en este momento del día la abundancia de phyB activo, D2, sería mínima debido a que durante la noche se inactiva por efecto de la reversión térmica, y según los datos *in vivo* a las 8 h ya no quedaría Pfr (Fig. 2.2 A). Es por esto que el aumento de la abundancia de PIF4 en estos momentos puede explicarse por una menor actividad del receptor. Por otro lado en este momento del día la expresión de PIF4 aumenta debido a la inactivación del EVENING COMPLEX, un componente del reloj circadiano que regula negativamente la transcripción del gen *PIF4* (Nusinow, D.A. *et al.* 2011), por lo que en este punto coincidirían la mayor expresión con una menor inactivación por parte de phyB favoreciendo la acumulación de la proteína.

Al principio del día y al principio de la noche, la degradación y acumulación de PIF4 fueron muy rápidas. Al principio del día, esto sería consistente con una mayor activación de phyB por efecto de la luz, la cual es rápida. Según los datos *in vitro*, en 30 min se alcanzarían los valores máximos de Pfr (Fig. 2.1). Al principio de la noche, por el contrario, la acumulación de PIF4 es muy rápida mientras que la inactivación de phyB sería lenta, ya que es principalmente mediada por la reacción de reversión térmica kr2 (Fig. 2.2). En ninguno de estos casos la acumulación o degradación de PIF4 parecería estar mediada por la localización de phyB en gránulos, ya que no se observa una correlación en ningún caso. Finalmente, durante el transcurso del día mientras que a 22°C la abundancia de PIF4 se mantiene baja, a 28°C llamativamente aumenta durante el período de luz. A esta temperatura la actividad de phyB sería menor que a 22°C, lo cual podría explicar mayores niveles de PIF4. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, durante todo el día se siguen formando gránulos de phyB, aun cuando su actividad debería mantenerse estable, y a pesar de la mayor formación de gránulos PIF4 también continua acumulándose. En base a estos resultados, en estos momentos del día los gránulos de phyB no parecerían tener una función directa en el control de PIF4.

En cuanto a COP1, la abundancia nuclear de la proteína en función de la temperatura es inversa a la abundancia nuclear total de phyB, siendo mayor a 28°C que a 22°C durante todo el fotoperiodo (figura 3.1 G). A su vez las mayores temperaturas impactan negativamente sobre la abundancia de la forma activa de phyB, D2. Esto coincide con un posible rol directo de phyB en la exclusión nuclear de COP1, el cual estaba reportado en respuesta a la luz pero no en respuesta a la temperatura (von Arnim, A.G. *et al.* 1994; von Arnim, A.G. *et al.* 1997; Osterlund, M.T. *et al.* 2000). Sin embargo, con respecto al fotoperiodo, la abundancia de COP1 está totalmente desacoplada de la actividad de phyB. Lo más llamativo de este resultado es la mayor acumulación de COP1 durante el día que durante la noche. La regulación de COP1 por luz fue ampliamente estudiada durante la des-etiolación. Durante esta etapa del desarrollo la

luz promueve la exclusión nuclear de COP1, mediada por los criptocromos y los fitocromos (Pacín, M. *et al.* 2014). Debido a esto, se asumía que durante la noche, al inactivarse estos receptores, aumentaría la acumulación de COP1 en el núcleo, mientras que durante el día esta sería mínima (Cho, S.K. *et al.* 2014). En base a nuestros resultados podemos decir que en ciclos de luz oscuridad no se repite el efecto de phyB sobre la abundancia nuclear de COP1. Vale la pena destacar que exactamente el mismo patrón de acumulación de COP1 se observó utilizando la técnica de *western blot*, por lo que la abundancia nuclear de COP1 en esta situación se debería a una mayor abundancia total de la proteína (Nieto *et al.*, sin publicar). Por el contrario, durante la des-etiolación los cambios en la abundancia nuclear de COP1 se deberían a una re-localización de la proteína y no a cambios en su abundancia, indicando que la regulación de esta E3 ligasa es muy diferente a varios niveles en estas condiciones.

Finalmente evaluamos la elongación del hipocotilo de plantas salvajes en las mismas condiciones (Fig. 3.3 C). Como era de esperarse, la tasa de elongación mostró un patrón rítmico, con una mayor elongación durante el día que durante la noche. Esto es consistente con lo observado previamente (Nozue, K. *et al.* 2007). Mayores temperaturas promovieron la elongación del hipocotilo. El efecto de la temperatura fue muy marcado durante el día y al final de la noche, y correlacionó con los momentos de mayor elongación.

En respuesta a cambios repentinos en las condiciones ambientales durante el día la elongación del hipocotilo pudo ser explicada por cambios en la localización nuclear de COP1 y PIF4 (Fig. 3.2). En el caso de plantas creciendo en fotoperiodo la relación no es total, pero en gran parte se repitió este patrón. Durante el día la tasa de crecimiento es alta, al igual que la acumulación de COP1. Además, la acumulación de COP1 y PIF4 es mayor a 28°C que a 22°C, lo cual también explicaría una mayor elongación a esta temperatura.

El factor más informativo fue COP1. Prácticamente en todos los puntos estudiados, el crecimiento del hipocotilo se pudo explicar por la abundancia de COP1 en respuesta a la luz, el momento del día y la temperatura. El único desfasaje podría observarse en el pico de abundancia. Mientras que la abundancia de COP1 es máxima a las 6 h, el crecimiento es máximo entre las 8 y las 12 h. Este desfasaje podría deberse a que la acción de COP1 sobre el crecimiento es indirecta, requiere la transcripción y traducción de nuevas proteínas las cuales a su vez podrían ejercer su función aumentando los niveles de hormonas de crecimiento, con lo cual el efecto del aumento de la actividad podría verse reflejado con un cierto retraso.

La acumulación de PIF4 en algunos puntos correlaciono con el crecimiento, aunque en general el efecto no fue tan directo. El patrón de crecimiento fue contrario al de abundancia de PIF4, que se acumuló más durante la noche que durante el día. Evidentemente, la acción de PIF4 estaría siendo contrarrestada por otros factores, haciendo que aún al acumularse en grandes cantidades por la noche, este factor no pueda promover la elongación.

En general, a diferencia de los casos anteriores en los que los cambios en las condiciones ambientales durante el día generaban un efecto sobre la actividad y localización de phyB, que a su vez impactarían sobre la abundancia de COP1 y PIF4 regulando el crecimiento, en condiciones de fotoperiodo y temperatura constante otros mecanismos tendrían mayor efecto. A pesar de que durante el día la actividad de phyB (D2) sería máxima, la elongación también lo es, y lo contrario ocurre durante la noche. Las mayores diferencias se encuentran

en el efecto de phyB sobre sus blancos, ya que a pesar de que las señales de luz y temperatura afectan a phyB de manera predecible, su actividad no explica la abundancia de COP1 y PIF4, mientras que estos factores sí explican el crecimiento. Esto pone de manifiesto la fuerte especialización de phyB en la transducción de señales altamente variables del ambiente, mientras que en condiciones constantes a lo largo de los días el crecimiento parecería estar regulado más fuertemente por otros mecanismos.

Discusión

Discusión

La reversión térmica tiene un fuerte rol en el control de los niveles de phyB activo.

En plantas desetiadas, la percepción de vecinas induce las respuestas de escape al sombreado. La percepción de plantas vecinas está mediada en gran parte por la acción de phyB, que percibe la disminución en la relación R/RL de la luz causada por la absorción de luz roja y la transmisión o reflexión de la luz rojo lejana por los tejidos fotosintéticos (Casal, J.J. 2012; Casal, J.J. 2013). Los cambios en la calidad de luz impactan sobre la velocidad relativa de las reacciones de fotoconversión, k_1 y k_2 , de modo que dependiendo del espectro de la luz incidente se establecen diferentes niveles de las formas activa (Pfr) e inactiva (Pr) de phyB, y consecuentemente se regulan las respuestas fisiológicas. En canopeos densos no sólo cambia la relación R/RL de la luz sino que también disminuye la irradiancia de luz fotosintéticamente activa. Las respuestas fisiológicas a los cambios en la irradiancia son muy similares a las desencadenadas en respuesta a bajas relaciones R/RL (Vandenbussche, F. *et al.* 2003; Millenaar, F.F. *et al.* 2009). La reducción de la irradiancia de luz azul es percibida por los criptocromos y contribuye a la respuesta fisiológica (Sellaro, R. *et al.* 2010; Keller, M.M. *et al.* 2011). En cambio, la capacidad de phyB de percibir los cambios en la irradiancia de luz roja en estas condiciones no había sido evaluada. En parte esto se debía a que durante la desetiación las respuestas del fitocromo a la luz se saturan al superar los $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de luz roja (Chen, M. *et al.* 2003), y en condiciones naturales, aún en condiciones de sombreado, estos valores son ampliamente superados, por lo que el rol de phyB en esta respuesta había sido desestimado hasta el momento.

En nuestras condiciones de crecimiento, la disminución en la irradiancia sin modificar la relación R/RL tuvo un fuerte impacto sobre la arquitectura de la roseta, el cual dependió de phyB (Fig. 1.1, Fig. 1.5). Consistentemente, la localización sub-nuclear de phyB respondió de igual forma a la reducción en la irradiancia como a la reducción en la relación R/RL (Fig. 1.2). Al reducir selectivamente la irradiancia o la relación R/RL phyB se localizó en gránulos pequeños, probablemente formados a partir del fitocromo localizado en gránulos grandes, que se forman en respuesta a la luz de alta irradiancia y alta relación R/RL.

Teniendo en cuenta que los criptocromos perciben los cambios en la irradiancia de luz azul y en consecuencia modulan la respuesta de escape al sombreado (Keller, M.M. *et al.* 2011), que los diferentes fotorreceptores interactúan entre sí, afectando mutuamente sus respuestas (Sellaro, R. *et al.* 2010) y que en ciertas condiciones los gránulos de phyB también contienen cry2 (Mas, P. *et al.* 2000), podría argumentarse que la respuesta de los gránulos de phyB a la irradiancia no es resultado de la percepción de la irradiancia por phyB sino de la percepción por criptocromos y su posterior interacción con phyB. Sin embargo, al reducir la irradiancia de luz azul parcialmente con un filtro naranja (Fig. M1 C) o totalmente utilizando LEDs rojos no se observó la aparición de nuevos gránulos, mientras que altas irradiancias de luz azul no fueron suficientes para inhibir la respuesta (Fig. 1.6). Además, cambios en la irradiancia de luz roja fueron suficientes para inducir no sólo el cambio de localización de phyB sino también la respuesta de hiponastia (Fig. 1.7). Estos resultados indican que los cambios en la localización de phyB, al menos en estas condiciones, reflejarían cambios en actividad de phyB y no efectos indirectos de los criptocromos.

El cambio en la localización de phyB precede a la respuesta fisiológica de hiponastia. Cabe destacar que en mutantes nulos de phyB se pierde la respuesta fisiológica, lo cual es consistente con un rol de este receptor en la percepción de esta señal. Por otro lado, la respuesta se conserva en las plantas conteniendo phyB fusionada a GFP, utilizada en los experimentos de microscopía confocal, indicando que la proteína marcada sigue siendo funcional y los mecanismos descritos en base a la localización de esta proteína podrían mediar la respuesta fisiológica (Fig. 1.1, Fig. 1.5). Por lo tanto, el phyB media no sólo la respuesta a la relación R/RL sino también a la irradiancia de luz roja.

En base a los mecanismos de regulación de la actividad del fitocromo conocidos hasta el momento (Fig. 1.3), pensamos que la respuesta a la irradiancia podría deberse a la influencia de la reversión térmica sobre la actividad de phyB. Para evaluar esta posibilidad utilizamos dos líneas transgénicas conteniendo versiones mutadas de phyB, phyB^{R582A} y phyB^{Y361F}, las cuales impiden su reversión térmica pero no afectan su capacidad de fotoconversión (Zhang, J. *et al.* 2013; Burgie, E.S. *et al.* 2014). En primer lugar constatamos que tanto en las plantas conteniendo la versión salvaje de phyB como en las plantas conteniendo las versiones mutadas, las menores relaciones R/RL causaron una aparición de gránulos pequeños y una reducción en la cantidad de gránulos grandes, lo cual se reflejó en un menor tamaño promedio de los gránulos (Fig. 1.13, Fig. 1.14). Luego, las sometimos a diferentes irradiancias de luz blanca de relación R/RL=1,1. En este caso, sólo la línea salvaje mostró una reducción del tamaño promedio de los gránulos en respuesta a las bajas irradiancias, mientras que las líneas mutantes no mostraron diferencias en la localización de phyB (Fig. 1.15). En base a estos resultados, podemos decir que los cambios en la distribución nuclear de phyB observados en respuesta a los cambios en la irradiancia reflejan una menor actividad del receptor, debida a un aumento del impacto de la reversión térmica comparada con las reacciones de fotoconversión.

Hasta el momento el rol de la reversión térmica en el establecimiento de los niveles de Pfr durante la iluminación había sido desestimado, debido a que en base a mediciones *in vitro* de la reversión esta era muy lenta para competir con las reacciones de foto-conversión (Sweere, U. *et al.* 2001; Rausenberger, J. *et al.* 2010). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la reversión de phyB tiene dos fases. Dado que phyB forma dímeros, y cada uno puede encontrarse en la forma activa o inactiva, se pueden encontrar tres formas: el homodímero inactivo (Pr-Pr, D0), el heterodímero (Pfr-Pr, D1) y el homodímero activo (Pfr-Pfr, D2), siendo este último el biológicamente activo. La reversión térmica previamente medida, corresponde al dímero D2 (Klose, C. *et al.* 2015). En efecto, esta reversión es muy lenta y para evidenciarla es necesario someter a las plantas a tratamientos de oscuridad prolongados, por lo que esta reacción es relevante durante la noche (Jung, J.H. *et al.* 2016). Por el contrario, la reversión del heterodímero D1 es muy rápida, de modo que puede contrarrestar el efecto de las reacciones de fotoconversión aún en condiciones naturales (Fig. 1.3). Consecuentemente, esta reacción es importante durante el día, ya que se establecería un balance entre la reversión rápida de D1 y la rápida regeneración de esta especie por efecto de la luz. En condiciones de baja irradiancia, entonces, no sólo se reduciría la tasa de formación de D2 a partir de D1, sino que también se reduciría el pool de D1 por efecto de la reversión térmica estableciendo menores niveles de phyB activo.

La reversión de Pfr tiene una fuerte dependencia de la temperatura. Mayores temperaturas aumentan la tasa de reversión de D2 (kr2, Fig. 2.2) y la de D1 (kr1, Fig. 2.5). En base al modelo de tres etapas (Fig. 1.3), (Klose, C. *et al.* 2015) estimamos matemáticamente la abundancia de los dímeros D0, D1 y D2 en plantas sometidas a $5 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de luz roja, a diferentes temperaturas (Fig. 2.4). Como era de esperarse, los niveles de phyB activo, representados por el dímero D2 se redujeron fuertemente entre 4 y 27°C. *In vitro*, utilizando la proteína PHYB completa, purificada a partir de cultivos bacterianos, y unida al cromóforo fitocromobilina, observamos que tanto a 1 como a $5 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de luz roja la temperatura también tuvo un fuerte efecto sobre los niveles de Pfr alcanzados. No sólo se establecieron diferentes valores a diferentes temperaturas sino que además a menores temperaturas se alcanzó más rápidamente el estado estacionario (Fig. 2.1).

En base a estos resultados, podemos determinar que la reacción de reversión térmica tiene un fuerte rol en el control de los niveles de phyB activo, haciendo de esta proteína una integradora de señales luz (relación R/RL e irradiancia) y temperatura.

phyB es un receptor de luz y temperatura.

Los datos hasta acá descriptos indican que la abundancia de Pfr de phyB no solo depende de la calidad de la luz sino también de la irradiancia y de la temperatura. Tomando la definición de Sengupta y Garrity (2013) consideramos que un receptor sensorial debe no sólo cambiar su actividad en respuesta a ciertas variables ambientales sino también modificar la fisiología de la planta de modo de resultar en cambios favorables para la aclimatación a las nuevas condiciones. Para probar si el efecto de la temperatura sobre la actividad de phyB se refleja en su actividad biológica, analizamos la elongación del hipocotilo en plantas salvajes, mutantes nulas de *phyB* y mutantes *phyB* complementadas con las variantes phyB, phyB^{R582A} y phyB^{Y361F} expresadas bajo su propio promotor, en 25 combinaciones de temperaturas e irradiancias (Fig. 2.9). A partir de esos datos modelamos el crecimiento como el crecimiento máximo alcanzable dividido los factores que inhiben la elongación, una aproximación utilizada en trabajos anteriores (Sellaro, R. *et al.* 2010). En nuestro caso, los factores inhibitorios de la elongación fueron la luz percibida por otros fotorreceptores, la actividad de phyB, que integra señales de luz y temperatura, y las bajas temperaturas (efecto de la temperatura no mediado por cambios en el estado de phyB), además del efecto de interacción entre la temperatura y phyB (Ecuación 6). El método utilizado nos permitió generar un modelo sin desviaciones sistemáticas para los diferentes genotipos, irradiancias o temperaturas (Fig. 2.14).

En la estimación de los parámetros del modelo no se asumió un efecto de la temperatura sobre phyB, ya que el efecto de la abundancia del dímero de phyB biológicamente activo, D2, se estimó utilizando plantas cultivadas a 30 °C solamente (Fig. 2.13). Para probar si la acción de la temperatura sobre la actividad de phyB es importante para la regulación de la elongación del hipocotilo, calculamos el crecimiento en base al modelo, pero desestimando este efecto. Consistentemente con la hipótesis propuesta, al liberar a phyB del control por la temperatura, el modelo mostró un peor ajuste a los datos, evidenciado por un mayor valor del estimador χ^2 (Fig. 2.13 B recuadro). Esto indica que la temperatura tiene un efecto biológicamente relevante sobre la actividad de phyB. Utilizando este modelo estimamos la contribución de cada término en la elongación del hipocotilo (Fig. 2.15). Pudimos determinar que en todo el

rango de irradiancias el efecto de la temperatura sobre la actividad de phyB, a través del aumento de la reversión térmica, tiene un fuerte impacto sobre la elongación del hipocotilo. Esta contribución depende de la irradiancia, siendo mayor a irradiancias bajas, pero se mantiene aún a altas intensidades de luz. De este modo podemos decir que phyB actúa como un receptor de luz y temperatura en el control del desarrollo de *Arabidopsis*.

La idea de que phyB podría funcionar como receptor de temperatura ya había surgido anteriormente, al evaluar el impacto de la falta de cada fitocromo (A-E) en la inducción de la germinación y la floración en respuesta a la temperatura. En estos procesos, phyE parecería ser necesario a bajas temperaturas, mientras que phyD sería necesario a altas temperaturas y phyA y phyB responderían en todo el rango (Halliday, K.J. *et al.* 2003; Halliday, K.J. *et al.* 2003; Penfield, S. 2008). Sin embargo nunca se había probado formalmente que phyB pudiera percibir la señal y regular la termomorfogénesis. Llamativamente, phyB de *Arabidopsis* no es el único fitocromo que puede percibir la temperatura. En la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* se ha determinado que una de las funciones de su fitocromo es modular la respuesta a la temperatura, ya que este factor ambiental modula su actividad kinasa (Njimonu, I. *et al.* 2011). En el caso de *Arabidopsis* aún no se conoce precisamente cómo phyB logra completar su actividad. Por un lado, la proteína contiene un dominio relacionado con kinasas (Fig. 1.2). Sin embargo existe controversia acerca de la capacidad de phyB de fosforilar proteínas directamente (Fankhauser, C. *et al.* 1999; Krall, L. *et al.* 2000; Li, J. *et al.* 2011). Trabajos recientes indican que las mayores temperaturas impedirían que phyB controle la transcripción mediante su asociación a la cromatina (Jung, J.H. *et al.* 2016). En base a nuestros resultados, en respuesta a la temperatura phyB podría modular a los mismos blancos de acción que en respuesta a la luz, como PIF4 y COP1, regulando su abundancia nuclear (Fig. 3.2).

Cabe destacar que phyB no es el único receptor de temperatura en plantas. En nuestro modelo, la temperatura tuvo efectos independientes de la actividad de phyB, de magnitud similar a los efectos dependientes de phyB (Fig. 2.15). Una alternativa es que otros fotorreceptores actúen como receptores de temperatura. En la respuesta a la temperatura durante la germinación o la floración las mutantes de pérdida de función de phyA, phyC, phyD y phyE mostraron tener efectos particulares dependiendo del rango de temperaturas, por lo que estos mismos fotorreceptores podrían estar directamente involucrados en la percepción de la temperatura mediante mecanismos similares a los de phyB (Penfield, S. 2008; Quint, M. *et al.* 2016). Sin embargo la abundancia de estas proteínas en plantas cultivadas en luz es baja, por lo que el impacto relativo sería menor al de phyB. Además, al menos en la accesión Columbia, phyA no mostró reversión térmica, por lo que el rol de este fitocromo en la percepción de la temperatura es muy poco probable (Eichenberg, K. *et al.* 2000). El receptor de luz UV-B, UVR8, se encuentra en forma de dímeros, y luego de percibir luz ultravioleta los dímeros se disocian, y en forma de monómero cumple la actividad biológica. La inactivación por dimerización es independiente de la luz y depende de las proteínas REPRESSOR OF UV-B PHOTOMORPHOGENESIS 1 (RUP1) and RUP2 (Heijde, M. *et al.* 2013). Estudios en condiciones naturales mostraron que los niveles de UVR8 en las formas de dímero y monómero están influenciados por la temperatura, ya que las bajas temperaturas (8-10 °C) reducen la tasa de reversión dímero-monómero (Findlay, K.M. *et al.* 2016). De todos modos aún no se conoce si estos efectos impactan sobre la morfogénesis. El receptor de luz zeitlupe (ZTL) también podría tener un efecto promotor de la elongación del hipocotilo en respuesta a las altas

temperaturas, pero este efecto podría estar mediado por la interacción con phyB (Miyazaki, Y. *et al.* 2015). Además de los fotorreceptores, otros receptores de temperatura actuarían independientemente de la percepción de luz. Luego de inactivar a los fitocromos con rojo lejano y cultivando las plantas en oscuridad, de modo de inactivar a los otros receptores de luz, las plántulas salvajes y mutantes de phyB aún responden a la temperatura (Fig. S.3). En la bibliografía se ha propuesto que estos receptores podrían ser proteínas de membrana que percibirían cambios en la fluidez de las membranas biológicas causados por los cambios de temperatura. Este mecanismo se ha encontrado en bacterias y mamíferos (Sengupta, P. *et al.* 2013). Sin embargo, hasta el momento no se identificó ningún potencial receptor de este tipo en plantas (Penfield, S. 2008; Quint, M. *et al.* 2016).

Vale la pena aclarar que el hecho de que phyB sea un receptor de temperatura no implica que las mutantes *phyB* respondan menos a la temperatura, sino por el contrario responden más. Esto ya se había reportado en mutantes de fitocromos y criptocromos durante la elongación del hipocotilo y la elongación de los entrenudos en respuesta a la temperatura (Mazzella, M.A. *et al.* 2000; Halliday, K.J. *et al.* 2003; Ma, D. *et al.* 2016). Como se mencionó anteriormente tienen que existir otros receptores de temperatura además de phyB, los cuales promoverían el crecimiento a altas temperaturas. Consecuentemente, en ausencia de phyB se generaría una des-represión general de la elongación y en estas condiciones el efecto de los otros receptores sería más notorio.

La localización de phyB responde al sombreado por plantas vecinas, a los ciclos de luz/oscuridad y a la temperatura ambiente.

Durante la des-etiolación, uno de los primeros pasos en la señalización de phyB en respuesta a la luz es su traslocación al núcleo y la formación de gránulos nucleares (Chen, M. *et al.* 2003). La localización nuclear de phyB es necesaria para que se desencadenen las respuestas mediadas por este receptor (Huq, E. *et al.* 2003). En plantas des-etioladas, phyB media las respuestas de escape al sombreado (Casal, J.J. 2013). Sin embargo, no se conocía si en respuesta a la sombra de plantas vecinas se producía un cambio en la localización del receptor. Sometiendo plantas adultas a una disminución en la relación R/RL, lo que causa una reducción en los niveles de phyB activo, D2, identificamos que la abundancia nuclear de phyB no se modifica (Fig. 1.4), pero aparecen nuevos gránulos nucleares. Estos gránulos son de tamaño pequeño y poco brillantes (Fig. 1.2). Al mismo tiempo, los gránulos grandes, formados previamente en condiciones de alta relación R/RL, no cambian su abundancia, pero sí se pudo determinar una reducción en su tamaño (Fig. 1.3). Estos resultados indicarían que los gránulos pequeños se formarían a partir de los grandes. Esto es consistente con lo observado por Rausenberger *et al.* (2010). Utilizando experimentos de FRAP (recuperación de la fluorescencia luego del fotoblanqueado) determinaron que el phyB presente en los gránulos se encuentra en constante intercambio con el phyB presente en el nucleoplasma. Hasta el momento el aumento en la cantidad y tamaño de los gránulos se interpretaba como una mayor actividad de phyB, en base a resultados obtenidos durante la des-etiolación (Chen, M. *et al.* 2003). Llamativamente, en nuestro caso en respuesta a una reducción en la actividad de phyB aumenta la cantidad de gránulos. Los gránulos pequeños que aparecen en respuesta a las bajas relaciones R/RL tendrían una función diferente a la de los gránulos formados en respuesta a altas relaciones R/RL o en respuesta a la luz durante la des-etiolación. A favor de

esta idea, se ha demostrado que la composición de los gránulos de phyB no es siempre igual. Por ejemplo durante la des-etiolación PIF3 se localiza en gránulos transitoriamente al principio de la exposición a la luz, pero PIF3 ya no se encuentra en los gránulos estables, sugiriendo que los gránulos de phyB tienen diferentes funciones a lo largo del tiempo (Bauer, D. *et al.* 2004). Del mismo modo, cry2 colocaliza con phyB sólo en algunos gránulos nucleares, indicando que a un mismo tiempo diferentes gránulos con diferente función coexisten (Mas, P. *et al.* 2000). Durante la des-etiolación también se ha reportado la aparición de dos tipos de gránulos. Los gránulos formados en un primer momento son pequeños, de brillo tenue, e inestables. Al cabo de un tiempo desaparecen y se observan solamente los gránulos grandes, estables. Se ha propuesto que estos dos tipos de gránulos tendrían funciones diferentes en la respuesta de des-etiolación (Chen, M. 2008).

Habiendo encontrado que en plantas adultas, en respuesta a los cambios en la relación R/RL de la luz aparecen nuevos gránulos de phyB, evaluamos la localización de este receptor en respuesta a los cambios de irradiancia típicos del sombreado por plantas vecinas. Midiendo la cantidad y tamaño de los gránulos de phyB pudimos determinar que los cambios en la irradiancia tienen un efecto análogo al de la reducción en la relación R/RL de la luz. En respuesta a la disminución de la irradiancia aparecen gránulos pequeños, manteniendo el número de gránulos grandes pero reduciendo su tamaño y manteniendo constante la abundancia total de phyB en el núcleo (Fig. 1.2, 1.4, 1.3).

La aparición de gránulos pequeños en respuesta a la reducción de la irradiancia o de la relación R/RL es inmediata, completando la respuesta en menos de media hora, se mantiene mientras las condiciones se mantienen constantes, y es inmediatamente reversible ante un aumento de la irradiancia o de la relación R/RL (Fig. 1.2, Fig 1.9). Estas características apuntan a un fuerte rol de phyB en la respuesta a cambios rápidos en las condiciones ambientales. Llamativamente, la respuesta de hiponastia es igualmente reversible. Plantas cultivadas en alta irradiancia responden a la disminución de irradiancia en menos de 4 h, mientras que al retornar a condiciones de alta irradiancia reposicionan sus hojas al estado basal. Por otro lado, al cultivarlas en condiciones de baja irradiancia se mantiene la posición erecta de las hojas a lo largo de los días (Trupkin, S.A. *et al.* 2014). Esto indica que los cambios observados en la distribución de tamaños de los gránulos de phyB tendrían una alta correlación con la actividad del receptor, controlando la fisiología de la planta permitiéndole responder dinámicamente a las condiciones ambientales preponderantes.

La respuesta de phyB a la irradiancia se mantuvo en todos los órganos estudiados (Fig. 1.8). En respuesta al sombreado por plantas vecinas todos los órganos de la planta presentan alguna respuesta. Las hojas cambian su posición con respecto al suelo, los entrenudos se alargan, y las hojas en desarrollo presentan láminas más pequeñas y pecíolos más largos. En base a este resultado, todas estas respuestas podrían estar inducidas por la percepción de las señales por parte de phyB en cada órgano. En este experimento también observamos que dependiendo del tamaño de las células varió el tamaño de los núcleos y consecuentemente de los gránulos. Es probable que en células grandes, gránulos identificados como “grandes” se comporten como pequeños y en células pequeñas ocurra lo contrario, por lo que para cada órgano probablemente habría que fijar un tamaño de gránulo umbral diferente. Una medida más integradora y extrapolable a otras situaciones es el tamaño promedio de los gránulos, que

demonstró ser igual o mejor reflejo de la actividad de phyB que la cantidad de gránulos pequeños (Fig. 1.13, Fig. 1.14)

Llamativamente, los gránulos de phyB respondieron en un amplio rango de irradiancias, compatibles con las que se esperarían en la naturaleza en condiciones de luz plena o sombreado por plantas vecinas (Fig. 1.10). No sólo aumentó la abundancia de gránulos en respuesta a bajas irradiancias sino que disminuyó su abundancia en respuesta a altas irradiancias, entre 200 y 485 $\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$, mostrando que aún en estas irradiancias la respuesta no se satura. Lo que es más, tanto con luz natural o con luz artificial, los gránulos de phyB respondieron aditivamente a los cambios en la irradiancia y la relación R/RL (Fig. 1.11, Fig. 1.12). Dado que en respuesta a la luz, la localización de phyB correlacionó con la respuesta fisiológica, y que los cambios en la irradiancia afectaron a la abundancia de Pfr por efecto de la reacción de reversión térmica, podemos decir que phyB percibe no sólo la relación R/RL sino también la disminución en la irradiancia causada por el sombreado de plantas vecinas en condiciones naturales.

La temperatura tuvo dos efectos sobre el tamaño promedio de los gránulos de phyB (Fig. 2.6). Por un lado, mayores temperaturas promovieron la acumulación de phyB en gránulos. Esto se evidenció en irradiancias mayores a 50 $\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$. Por otro lado, a 1 y 10 $\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ se evidenció un efecto negativo de la temperatura sobre el tamaño promedio de los photobodies. Este resultado es consistente con lo observado en los experimentos previos. Por un lado, mayores temperaturas aumentan la reversión térmica, reduciendo los niveles de phyB activo, D2 (Fig. 2.1, Fig. 2.3) (Schäfer, E., Schmidt W. 1974). Por otro lado, en respuesta a la irradiancia y a la relación R/RL menores niveles de D2 correlacionaron con un menor tamaño promedio de los gránulos de phyB (Fig. 1.13, Fig. 1.14, Fig. 1.15). Lo que es más, el efecto de la temperatura sobre los gránulos no se observó en las líneas en las que phyB contiene una mutación puntual que inhibe su reversión térmica (Fig. 2.8), lo cual indicaría que el mecanismo involucrado en el efecto negativo de la temperatura sobre la acumulación de phyB en gránulos sería la reversión térmica. El hecho de que el efecto se vea sólo a bajas irradiancias apunta en el mismo sentido. A mayores irradiancias, el efecto de la reversión térmica en el establecimiento de los niveles de D2 tendría un menor impacto, por lo que el efecto promotor de la formación de gránulos por parte de la temperatura cobraría mayor relevancia. El efecto positivo de la temperatura sobre la formación de gránulos de phyB no se debería a un aumento en la abundancia total de la proteína, ya que en ningún caso se observó un efecto positivo de la temperatura sobre la fluorescencia nuclear (Fig. 2.7, Fig. 2.8), lo cual es consistente con lo observado en respuesta a la luz (Fig. 1.4, Fig. 1.6). Además, se ha demostrado que en respuesta a la temperatura la abundancia de phyB no cambia significativamente (Jung, J.H. *et al.* 2016).

En plantas cultivadas a temperatura constante, en fotoperíodo de día corto, durante las transiciones entre el día y la noche los gránulos de phyB respondieron de forma acorde a lo esperado en base a los resultados anteriores y a otros trabajos (Kircher, S. *et al.* 2002) (Fig. 3.1). Al comenzar el día desaparecen los gránulos chicos y aparecen los gránulos grandes, y lo contrario se ve al final del día, donde los grandes desaparecen muy rápido y los chicos aparecen nuevamente. Sin embargo, la velocidad de respuesta fue diferente a lo observado en el caso de los cambios de condiciones ambientales durante el día. Mientras que reducciones de la irradiancia o de la relación R/RL durante el día tuvieron un efecto inmediato en la

distribución de phyB, completando la respuesta en aproximadamente 30 min, en el caso de plantas cultivadas bajo fotoperíodo de día corto, las transiciones noche/día y día/noche tuvieron un efecto gradual, aunque tampoco se observó un retardo en la respuesta. A juzgar por los datos obtenidos con proteína *in vitro*, en 30 min se deberían alcanzar los máximos niveles de Pfr (Fig. 2.1). Sin embargo, la formación de gránulos continúa en aumento por 8 h. Entonces, a pesar de que a grandes rasgos la mayor acumulación de phyB en gránulos correlacionaría con mayores niveles de D2, a juzgar por los patrones de los gránulos de phyB, el ensamblado y/o desensamblado estarían controlados por otros factores además de la actividad de phyB y la temperatura. Estos factores podrían incluir señales derivadas del reloj circadiano. Se ha demostrado que el reloj circadiano no sólo modula la formación de gránulos sino que también la acción de phyA y phyB se ve atenuada por este mecanismo, consistentemente con lo observado en nuestros experimentos (Anderson, S.L. *et al.* 1997; Kircher, S. *et al.* 2002; Kaiserli, E. *et al.* 2015). Vale la pena mencionar que debido a que usamos una línea sobreexpresante podemos excluir el efecto del reloj circadiano sobre la transcripción del gen, pero en plantas salvajes el reloj podría impactar sobre la abundancia y/o localización de la proteína en ciclos de luz-oscuridad.

En plantas cultivadas en fotoperíodo a temperatura constante se observaron dos efectos de la temperatura sobre la localización de phyB. Por un lado, a 22 °C se detectó la mayor fluorescencia nuclear de phyB, con una marcada disminución a 28 °C (Fig. 3.1 G). Este efecto no mostró una dependencia clara con el momento del día, sino que se mantuvo prácticamente constante durante todo el fotoperíodo. Esta respuesta a la temperatura es diferente a la observada en tratamientos cortos (Fig. 2.7). Este resultado podría reflejar un efecto acumulativo de la temperatura sobre phyB a lo largo de los días. Las mayores temperaturas establecerían constantemente menores niveles de Pfr, lo cual a su vez se podría ver reflejado en una menor tasa de entrada de phyB al núcleo. Mientras que estos efectos no llegan a verse a tiempos cortos, a tiempos largos de tratamiento podrían tener un impacto significativo. Resultados similares se encontraron en casos donde se reduce la relación R/RL y la irradiancia durante varios días (Pucciariello *et al.*, sin publicar), apuntando a que este efecto de la temperatura sobre la localización podría reflejar menores niveles de phyB activo. Por otro lado, a mayores temperaturas se observaron menos gránulos grandes. El efecto de la temperatura sobre los gránulos grandes fue constante, observándose menos gránulos grandes a 28°C que a 22°C en casi todos los momentos del día analizados (Fig. 3.1, A, B). Dado que en este caso también se redujo la abundancia nuclear total de phyB, no podemos asignar este efecto de la temperatura a la regulación de mecanismos de la localización sub-nuclear.

En la transición entre el día y la noche se observó un efecto de interacción entre la luz y la temperatura. En estos puntos también se observó una inversión en la cantidad de gránulos en los dos tratamientos (Fig. 3.1 I). A 22 °C hay más gránulos durante el día que durante la noche, mientras que a 28 °C hay más gránulos durante la noche que durante el día. El aumento en el número de gránulos durante la noche a 28 °C se debe a un aumento abrupto en el número de gránulos pequeños (Fig. 3.1 D, E), formados probablemente a partir del phyB localizado en los gránulos muy grandes, que desaparecen rápidamente luego del final del día (Fig. 3.1 A, B). Mayores temperaturas aceleraron el proceso de des-ensamblado de los gránulos grandes y el tamaño promedio de los gránulos se redujo más rápidamente (Fig. 3.1 H). Este efecto podría deberse a que a mayores temperaturas se acelera la reversión térmica de el dímero de phyB

activo, D2, kr2 (Fig. 2.2). Recientemente, el grupo de Philip Wigge en la universidad de Cambridge (Jung, J.H. *et al.* 2016) propuso que la actividad de phyB decae más rápido por la noche a altas temperaturas. En consecuencia, disminuiría la capacidad de phyB de interactuar con la cromatina y de regular la actividad transcripcional.

En resumen, en respuesta a cambios rápidos en las condiciones lumínicas, la localización de phyB en general correlaciona con la abundancia del dímero activo, D2. En respuesta a la temperatura, este efecto también existiría, pero además la temperatura promovería la agregación de phyB en gránulos, por lo que el tamaño de los gránulos no sería un reflejo fiel de la abundancia de la forma activa de phyB. En respuesta al fotoperíodo existen otros efectos controlando la localización de phyB, ya que la abundancia de D2 aumentaría más rápido que la formación de gránulos, que siguen formándose durante el día. Estos factores podrían retrasar la formación de gránulos, aún cuando D2 es máximo, o promoverla aún cuando D2 ya no aumenta. Durante la noche el decaimiento de los gránulos sí podría reflejar cambios en la actividad de phyB, ya que según datos de espectrofotometría tanto a 22 °C como a 27 °C luego de 8h de oscuridad (16 h del fotoperíodo) ya prácticamente no queda D2, y en ese momento se observa que frena el desensamblado de los gránulos. En cualquier caso, la localización de phyB respondió a los cambios en las condiciones ambientales en todas las situaciones evaluadas.

Efecto río debajo de la localización de phyB.

A pesar de que los gránulos de phyB se describieron por primera vez hace más de 15 años, su función aún no ha sido establecida definitivamente, y sigue siendo objeto de estudio. Entre las otras alternativas se sugirió que los gránulos podrían ser sitios de acumulación de phyB activo en los que se inhibiría la respuesta a la luz, o sitios de degradación de proteínas, o sitios de regulación de la actividad transcripcional (Van Buskirk, E.K. *et al.* 2012).

En los tratamientos de sombreado partimos de una situación en la que phyB ya se encontraba en gránulos, debido a que el día comenzó unas horas antes del tratamiento. Ya sea a través de las reacciones de fotoconversión o de reversión térmica, las bajas relaciones R/RL como la baja irradiancia reducen la abundancia de phyB activo, D2. En estas condiciones, aparecen gránulos chicos, probablemente a partir del fitocromo localizado en gránulos grandes, mientras que no cambia la abundancia nuclear en el corto plazo. Al mismo tiempo, aumenta la abundancia nuclear de COP1 y PIF4 (Fig. 3.2 A, C). En base a estos resultados, el phyB localizado en gránulos grandes podría estar relacionado con la degradación de PIF4, y con la exclusión de COP1 del núcleo, y al inactivarse phyB estos gránulos grandes se des-agregarían permitiendo la acumulación de sus blancos. Del mismo modo, a mayores temperaturas se establecerían menores niveles de D2. Al igual que en respuesta al sombreado, en este caso la abundancia de COP1 y PIF4 aumenta (Fig. 3.2 B, C), indicando que en respuesta a la temperatura, la actividad de phyB implicaría la degradación y/o la exclusión nuclear de los mismos blancos que en respuesta al sombreado. En las condiciones de estos experimentos, sin embargo, el efecto de phyB sobre COP1 no correlaciona con la localización en gránulos, ya que a la irradiancia utilizada ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) no se observó un decaimiento del tamaño promedio de los gránulos en respuesta a la temperatura. En cuanto a PIF4, el tratamiento de temperatura fue más largo,

por lo que en esas condiciones la abundancia de phyB en el núcleo y su localización en gránulos grandes podría haber disminuido, explicando la menor abundancia nuclear de PIF4.

La abundancia y localización de phyB, COP1 y PIF4 también fue evaluada durante un día completo en plantas cultivadas en condiciones de fotoperíodo, a temperatura constante. Por un lado, a mayores temperaturas se observó mayor abundancia nuclear de COP1 y PIF4. Esto es consistente con un control de estas proteínas por parte de phyB, ya que a mayores temperaturas se acumularía menos phyB activo, D2, que se reflejó en una menor abundancia nuclear de phyB durante todo el día y la noche a 28 °C. En cuanto al efecto de la luz, a grandes rasgos la abundancia de D2 es mayor de día que de noche. Consistentemente con el rol de phyB en la degradación de PIF4, la acumulación de este factor de transcripción es menor de día que de noche. Por el contrario, el patrón de acumulación nuclear de COP1 no correlaciona con la actividad de phyB. Llamativamente durante el día se promueve la acumulación de esta proteína en el núcleo.

Durante el transcurso del día los gránulos no son un buen reflejo de la actividad de phyB, ya que como se discutió anteriormente la cinética de ensamblado no es consistente con las cinéticas de acumulación de D2. Del mismo modo, durante el transcurso del día el phyB localizado en gránulos no parecería regular la abundancia de COP1 y PIF4, ya que al menos a 28 °C, mientras que la cantidad de gránulos grandes de phyB va en aumento, también aumenta la abundancia de COP1 y PIF4. Estos resultados serían consistentes con la hipótesis de que durante el día, los gránulos funcionarían como reservorios de phyB. En estas condiciones, phyB no sería eficaz en la exclusión nuclear o en la degradación de sus targets, ya que en este momento aun cuando la acumulación de phyB en gránulos es máxima, se observa la mayor tasa de elongación del hipocotilo. Sin embargo ante reducciones de la irradiancia o de la relación R/RL los gránulos podrían responder rápidamente ante reducciones de la actividad de phyB, ajustando la arquitectura de la planta a las nuevas condiciones.

Otra hipótesis acerca de la función de los gránulos es que al promover la interacción de phyB con otras proteínas se inhibiría la reacción de reversión térmica (Van Buskirk, E.K. *et al.* 2012). A pesar de que no probamos esta hipótesis formalmente, nuestros datos tampoco la avalan. Por un lado, durante el día cuando prácticamente todo el phyB se encuentra en gránulos, las plantas responden a la irradiancia, mediante un mecanismo que involucra la reversión térmica. Por otro lado, según los experimentos realizados *in vivo* por espectrofotometría (Fig. 2.2), 8 h en oscuridad son suficientes para que se inactive todo el Pfr por reversión. En estos experimentos el pulso de luz no es suficiente para formar gránulos, por lo que en caso de que phyB se encontrara en gránulos se esperaría que su reversión fuera más lenta. Sin embargo, al principio de la noche los gránulos de phyB desaparecen con una velocidad que depende de la temperatura, del mismo modo que la reversión, y a las 8 h se observa que la respuesta se estabiliza. Estos resultados no son concluyentes pero sugieren que aunque phyB se localice en gránulos la reversión térmica no se inhibe.

En respuesta a cambios en las condiciones de luz o temperatura la mayor abundancia de COP1 correlacionó con un mayor crecimiento del hipocotilo (Fig. 3.2). El efecto de la localización nuclear de COP1 en la respuesta de escape al sombreado fue caracterizado en (Pacín, M. *et al.* 2013) encontrando que esta proteína controlaría los patrones diarios de sensibilidad a la

sombra en ambientes naturales. Al menos en parte, COP1 llevaría adelante su función regulando la abundancia de su blanco HFR1 (Pacín, M. *et al.* 2016).

En el caso de PIF4 pudimos evaluar el efecto de interacción entre la sombra y las altas temperaturas sobre la acumulación nuclear de la proteína, evidenciando un efecto sinérgico. La elongación del hipocotilo predicha por el modelo desarrollado en este trabajo (Ecuación 6, Fig. 2.14) coincide en gran medida con el patrón de acumulación de PIF4, poniendo de manifiesto la capacidad de PIF4 de integrar señales ambientales y controlar el crecimiento de manera acorde. El rol de los PIF en la transducción de las señales percibidas por phyB también se encuentra conservado en respuesta a los cambios de la irradiancia en plantas adultas. Las mutantes de los genes PIF también pierden la respuesta de hiponastia frente a reducciones de la irradiancia, aún sin disminuir la relación R/RL (Trupkin, S.A. *et al.* 2014). En respuesta al sombreado los PIF aumentan su actividad, promoviendo la transcripción de genes de síntesis y respuesta a auxinas (Hornitschek, P. *et al.* 2012; Li, L. *et al.* 2012; Sun, J. *et al.* 2012; Lucas, M. *et al.* 2014). Los niveles de expresión de estos genes target de PIFs en respuesta a la relación R/RL es prácticamente indistinguible de la respuesta a la irradiancia, mostrando una fuerte convergencia en la respuesta a ambas señales (Trupkin, S.A. *et al.* 2014).

La tasa de crecimiento del hipocotilo durante el día mostró un patrón rítmico, con mayor crecimiento durante el día que durante la noche (Fig. 3.3). Esto es consistente con lo observado anteriormente (Nozue, K. *et al.* 2007). En particular, el patrón de crecimiento fue muy similar al patrón de acumulación de COP1. Dado que la acumulación de COP1 no se relacionó con la actividad de phyB en estas condiciones, este resultado pone de manifiesto la existencia de otros mecanismos de integración de señales que también convergen en la regulación de esta E3 ligasa. Vale la pena mencionar que en el caso de COP1 la abundancia nuclear correlaciona con una menor abundancia total de la proteína observada en experimentos de western blot (Nieto *et al.*, sin publicar). Por otro lado, la expresión del gen aumentaría este efecto, ya que también tiene un máximo durante el día (Mockler, T. *et al.* 2007), por lo que en plantas salvajes el patrón de acumulación sería el mismo. En el caso de PIF4, su localización no correlacionó fuertemente con el crecimiento, ya que se observó mayor acumulación durante la noche, cuando el crecimiento es mínimo. Sin embargo sí se pueden encontrar algunos puntos en común. Durante el día a 28°C se observa una gradual acumulación de PIF4, lo que explicaría el aumento gradual en la tasa de crecimiento en los primeros puntos analizados. Por otro lado, el aumento en la tasa de crecimiento al principio de la noche también correlaciona con un aumento marcado en la abundancia nuclear de PIF4. Dado que la línea transgénica utilizada contiene el promotor de *PIF4*, los efectos podrían deberse a una combinación de regulaciones a nivel transcripcional y post-traducciona. En particular, la transcripción de PIF4 es controlada por el EVENING COMPLEX, cuya actividad a su vez es regulada por el reloj circadiano y por la temperatura. Debido a esto, al menos parte del patrón de acumulación observado podría deberse a cambios en su transcripción, mostrando que PIF4 también sería un factor integrador de señales parcialmente independiente de phyB.

Las respuestas morfogénicas en plantas dependen fuertemente de la integración de señales ambientales.

El desarrollo de las plantas depende fuertemente de las condiciones ambientales. Estudios clásicos remarcan la capacidad de adaptación de las plantas a su ambiente y la gran plasticidad observada en *Arabidopsis* en un amplio rango de temperaturas e iluminaciones. Típicamente se destacó la gran variedad de receptores y componentes de sus vías de señalización presentes en plantas. Por ejemplo, en el caso de la percepción de la luz podemos contar al menos cinco familias de receptores (phy, cry, phot, ztl y uvr8), las cuales perciben la luz roja y rojo lejano, azul, UV-A y UV-B respectivamente. Cada familia cuenta con varios miembros, entre los cuales se ha descrito cierta variabilidad funcional. La interpretación más difundida de este hecho era que la fuerte especialización de cada receptor era ventajosa para la precisa percepción de cada señal ambiental, y para desencadenar una respuesta ajustada a cada situación.

Los resultados descritos en esta tesis apuntan en el sentido contrario. Hemos identificado que un solo receptor, fitocromo B, integra tres señales ambientales: la relación R/RL, la irradiancia de luz roja y la temperatura ambiente.

Este no es un caso aislado. En los últimos años muchos trabajos han demostrado que existe una fuerte interacción entre las respuestas a las variables ambientales. Los receptores de luz azul criptocromos también podrían percibir y responder a cambios en la radiación verde (Sellaro, R. *et al.* 2010). Recientemente se ha propuesto que la actividad de UVR8 también podría depender de la temperatura (Hayes, S. *et al.* 2017). En otros organismos se han descrito receptores con varias funciones. Por ejemplo, los receptores de temperatura en humanos son también quimiorreceptores. En *Escherichia coli*, el receptor implicado en la quimiotaxis también funciona como receptor de temperatura. En la mosca *Drosophila melanogaster* se propuso que la rodopsina, implicada en la visión, también podría ser modulada por la temperatura (Sengupta, P. *et al.* 2013). En *Arabidopsis*, la interacción entre señales se da muy fuertemente río abajo de los receptores. En el caso de la respuesta a la luz, se ha demostrado que tanto COP1 como los PIFs son blancos compartidos entre los fitocromos y los criptocromos, resultando en una integración entre señales de luz roja, azul, y temperatura (de Wit, M. *et al.* 2016; Ma, D. *et al.* 2016; Pedmale, U.V. *et al.* 2016). Se han descrito también interacciones entre la temperatura y la luz en el control de la des-etiolación, en un proceso que depende del fitocromo B, los PIF, COP1 y el reloj circadiano (Karayekov, E. *et al.* 2013). Por otro lado, los resultados obtenidos indican que las respuestas moleculares y morfogénicas de las plantas no dependen solamente de las condiciones prevalentes, sino de la integración de señales a lo largo del tiempo y de su estado de desarrollo. La respuesta a la oscuridad de la noche no fue igual que la respuesta a la reducción de la irradiancia durante el día, o a la reducción de la relación R/RL. A su vez la respuesta a la luz durante el día en ciclos de luz-oscuridad fue muy diferente al efecto de la luz durante la des-etiolación. En vista de estos resultados, en el futuro será importante contemplar estas interacciones, dando más relevancia ya no a la especificidad de cada factor sino a la capacidad de la red de señalización de integrar información del ambiente, de modo de ajustar las respuestas morfogénicas a las condiciones prevalentes.

Conclusiones

Los resultados de esta tesis permitieron identificar nuevas funciones de phyB. Por un lado, frente al sombreado por plantas vecinas se mostró que phyB no sólo percibe los cambios en la relación R/RL de la luz sino también la irradiancia de luz roja. Por otro lado, se mostró que phyB no sólo percibe las señales de luz del ambiente, sino también la temperatura. La temperatura afecta a la actividad de phyB modulando velocidad de la reacción de reversión térmica, la cual hasta el momento había sido desestimada en plantas cultivadas en luz. Este efecto también explica la respuesta a los cambios en la irradiancia. En todos los casos estudiados, las condiciones ambientales afectaron a la localización de phyB, modificando la cantidad o el tamaño de los gránulos nucleares que contienen phyB, o la abundancia nuclear. En muchos casos la localización de phyB reflejó los niveles de phyB activo, y explicó la abundancia de sus blancos de acción COP1 y PIF4. Sin embargo, en respuesta a la temperatura y al fotoperíodo la localización de phyB estaría regulada por mecanismos específicos, independientemente de la cantidad de phyB activo, y a su vez la localización de phyB no condicionaría su actividad. En respuesta a cambios en la irradiancia y la temperatura durante el día phyB mostró un fuerte control del crecimiento del hipocotilo, mientras que en condiciones de fotoperíodo otros mecanismos tendrían mayor efecto. En conclusión, los resultados resaltan el rol de phyB como un receptor integrador de señales, cuya función más importante sería modular la morfogénesis frente a cambios repentinos en las condiciones de luz y temperatura ambiente permitiendo un ajuste preciso de la forma de la planta en ambientes altamente cambiantes.

Referencias

Referencias

- Ádám, É., Hussong, A., Bindics, J., Wüst, F., Viczián, A., Essing, M., Medzihradzky, M., Kircher, S., Schäfer, E., Nagy, F. 2011. Altered Dark- and Photoconversion of Phytochrome B Mediate Extreme Light Sensitivity and Loss of Photoreversibility of the phyB-401 Mutant. *PLOS ONE* 6(11): e27250.
- Al Sady, B., Ni, W., Kircher, S., Schäfer, E., Quail, P.H. 2006. Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Molecular cell* 23(3): 439-446.
- Arana, M.V., Sánchez Lamas, M., Strasser, B., Ibarra, S.E., Cerdán, P.D., Botto, J.F., Sánchez, R.A. 2014. Functional diversity of phytochrome family in the control of light and gibberellin-mediated germination in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* 37(9): 2014-2023.
- Bauer, D., Viczián, A., Kircher, S., Nobis, T., Nitschke, R., Kunkel, T., Panigrahi, K.C.S., Ádám, É., Fejes, E., Schäfer, E., Nagy, F. 2004. Constitutive Photomorphogenesis 1 and Multiple Photoreceptors Control Degradation of Phytochrome Interacting Factor 3, a Transcription Factor Required for Light Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16(6): 1433-1445.
- Blázquez, M.A., Ahn, J.H., Weigel, D. 2003. A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature genetics* 33(2): 168-171.
- Box, M.S., Huang, B.E., Domijan, M., Jaeger, K.E., Khattak, A.K., Yoo, S.J., Sedivy, E.L., Jones, D.M., Hearn, T.J., Webb, A.A. 2015. ELF3 controls thermoresponsive growth in *Arabidopsis*. *Current biology* 25(2): 194-199.
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R., Görlach, J. 2001. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis* a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell* 13(7): 1499-1510.
- Briggs, W.R., Christie, J.M. 2002. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in plant science* 7(5): 204-210.
- Burgie, E.S., Bussell, A.N., Walker, J.M., Dubiel, K., Vierstra, R.D. 2014. Crystal structure of the photosensing module from a red/far-red light-absorbing plant phytochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(28): 10179-10184.
- Burgie, E.S., Vierstra, R.D. 2014. Phytochromes: An Atomic Perspective on Photoactivation and Signaling. *The Plant Cell* 26(12): 4568-4583.
- Casal, J.J. 2000. Phytochromes, Cryptochromes, Phototropin: Photoreceptor Interactions in Plants. *Photochemistry and Photobiology* 71(1): 1-11.
- Casal, J.J. 2012. Shade avoidance. *Arabidopsis Book* 10: e0157.
- Casal, J.J. 2013. Photoreceptor Signaling Networks in Plant Responses to Shade. *Annual Review of Plant Biology* 64: 403-427.
- Casal, J.J., Sánchez, R.A., Botto, J.F. 1998. Modes of action of phytochromes. *Journal of Experimental Botany* 49(319): 127-138.
- Casal, J.J., Yanovsky, M.J. 2004. Regulation of gene expression by light. *International Journal of Developmental Biology* 49(5-6): 501-511.

- Catalá, R., Medina, J. , Salinas, J. 2011. Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(39): 16475-16480.
- Crawford, A.J., McLachlan, D.H., Hetherington, A.M. , Franklin, K.A. 2012. High temperature exposure increases plant cooling capacity. *Current Biology* 22(10): R396-R397.
- Chamovitz, D.A., Wei, N., Osterlund, M.T., von Arnim, A.G., Staub, J.M., Matsui, M. , Deng, X.-W. 1996. The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell* 86(1): 115-121.
- Chen, F., Li, B., Li, G., Charron, J.B., Dai, M., Shi, X. , Deng, X.W. 2014. Arabidopsis phytochrome A directly targets numerous promoters for individualized modulation of genes in a wide range of pathways. *The Plant Cell* 26(5): 1949-1966.
- Chen, M. 2008. Phytochrome nuclear body: an emerging model to study interphase nuclear dynamics and signaling. *Current opinion in plant biology* 11(5): 503-508.
- Chen, M., Schwab, R. , Chory, J. 2003. Characterization of the requirements for localization of phytochrome B to nuclear bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(24): 14493-14498.
- Cho, S.K., Chaabane, S.B., Shah, P., Poulsen, C.P. , Yang, S.W. 2014. COP1 E3 ligase protects HYL1 to retain microRNA biogenesis. *Nature communications* 5.
- De Lucas, M., Daviere, J.M., Rodriguez Falcon, M., Pontin, M., Iglesias Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M.A., Titarenko, E. , Prat, S. 2008. A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 451(7177): 480-484.
- de Wit, M., Keuskamp, D.H., Bongers, F.J., Hornitschek, P., Gommers, C.M.M., Reinen, E., Martínez Cerón, C., Fankhauser, C. , Pierik, R. 2016. Integration of Phytochrome and Cryptochrome Signals Determines Plant Growth during Competition for Light. *Current Biology* 26(24): 3320-3326.
- Delker, C., Sonntag, L., James, G.V., Janitza, P., Ibañez, C., Ziermann, H., Peterson, T., Denk, K., Mull, S. , Ziegler, J. 2014. The DET1-COP1-HY5 pathway constitutes a multipurpose signaling module regulating plant photomorphogenesis and thermomorphogenesis. *Cell reports* 9(6): 1983-1989.
- Deng, X.W., Matsui, M., Wei, N., Wagner, D., Chu, A.M., Feldmann, K.A. , Quail, P.H. 1992. COP1, an Arabidopsis regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G β homologous domain. *Cell* 71(5): 791-801.
- Eichenberg, K., Hennig, L., Martin, A. , Schäfer, E. 2000. Variation in dynamics of phytochrome A in Arabidopsis ecotypes and mutants. *Plant, Cell & Environment* 23(3): 311-319.
- Elich, T.D. , Chory, J. 1997. Biochemical characterization of Arabidopsis wild-type and mutant phytochrome B holoproteins. *The Plant Cell* 9(12): 2271-2280.
- Fankhauser, C. , Chory, J. 1999. Photomorphogenesis: Light receptor kinases in plants! *Current biology* 9(4): R123-R126.
- Fankhauser, C. , Christie, John M. 2015. Plant Phototropic Growth. *Current Biology* 25(9): R384-R389.

- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J.M., Kircher, S. 2008. Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 451(7177): 475-479.
- Findlay, K.M., Jenkins, G.I. 2016. Regulation of UVR8 photoreceptor dimer/monomer photo-equilibrium in *Arabidopsis* plants grown under photoperiodic conditions. *Plant, cell & environment*.
- Foreman, J., Johansson, H., Hornitschek, P., Josse, E.M., Fankhauser, C., Halliday, K.J. 2011. Light receptor action is critical for maintaining plant biomass at warm ambient temperatures. *The Plant Journal* 65(3): 441-452.
- Franklin, K.A., Lee, S.H., Patel, D., Kumar, S.V., Spartz, A.K., Gu, C., Ye, S., Yu, P., Breen, G., Cohen, J.D. 2011. Phytochrome-interacting factor 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(50): 20231-20235.
- 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(8): 1078-1086.
- Galvão, V.C., Fankhauser, C. 2015. Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps. *Current Opinion in Neurobiology* 34: 46-53.
- Gray, W.M., Östin, A., Sandberg, G., Romano, C.P., Estelle, M. 1998. High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(12): 7197-7202.
- Halliday, K.J., Salter, M.G., Thingnaes, E., Whitelam, G.C. 2003. Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT. *The Plant Journal* 33(5): 875-885.
- Halliday, K.J., Whitelam, G.C. 2003. Changes in photoperiod or temperature alter the functional relationships between phytochromes and reveal roles for phyD and phyE. *Plant Physiology* 131(4): 1913-1920.
- Hayes, S., Sharma, A., Fraser, D.P., Trevisan, M., Cragg Barber, C.K., Tavridou, E., Fankhauser, C., Jenkins, G.I., Franklin, K.A. 2017. UV-B perceived by the UVR8 photoreceptor inhibits plant thermomorphogenesis. *Current Biology* 27(1): 120-127.
- Heijde, M., Ulm, R. 2013. Reversion of the *Arabidopsis* UV-B photoreceptor UVR8 to the homodimeric ground state. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(3): 1113-1118.
- Hennig, L., Büche, C., Eichenberg, K., Schäfer, E. 1999. Dynamic properties of endogenous phytochrome A in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology* 121(2): 571-578.
- Hennig, L., Schäfer, E. 2001. Both subunits of the dimeric plant photoreceptor phytochrome require chromophore for stability of the far-red light-absorbing form. *Journal of Biological Chemistry* 276(11): 7913-7918.
- Heschel, M.S., Selby, J., Butler, C., Whitelam, G.C., Sharrock, R.A., Donohue, K. 2007. A new role for phytochromes in temperature-dependent germination. *New Phytologist* 174(4): 735-741.

- Hirschfeld, M., Tepperman, J.M., Clack, T., Quail, P.H. , Sharrock, R.A. 1998. Coordination of phytochrome levels in phyB mutants of *Arabidopsis* as revealed by apoprotein-specific monoclonal antibodies. *Genetics* 149(2): 523-535.
- Hisada, A., Hanzawa, H., Weller, J.L., Nagatani, A., Reid, J.B. , Furuya, M. 2000. Light-Induced Nuclear Translocation of Endogenous Pea Phytochrome A Visualized by Immunocytochemical Procedures. *The Plant Cell* 12(7): 1063-1078.
- Hornitschek, P., Kohnen, M.V., Lorrain, S., Rougemont, J., Ljung, K., López-Vidriero, I., Franco-Zorrilla, J.M., Solano, R., Trevisan, M. , Pradervand, S. 2012. Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. *The Plant Journal* 71(5): 699-711.
- Hu, W., Franklin, K.A., Sharrock, R.A., Jones, M.A., Harmer, S.L. , Lagarias, J.C. 2013. Unanticipated regulatory roles for *Arabidopsis* phytochromes revealed by null mutant analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(4): 1542-1547.
- Huang, H., Yoo, C.Y., Bindbeutel, R., Goldsworthy, J., Tielking, A., Alvarez, S., Naldrett, M.J., Evans, B.S., Chen, M. , Nusinow, D.A. 2016. PCH1 integrates circadian and light-signaling pathways to control photoperiod-responsive growth in *Arabidopsis*. *eLife* 5: e13292.
- Huq, E., Al-Sady, B., Hudson, M., Kim, C., Apel, K. , Quail, P.H. 2004. Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science* 305(5692): 1937-1941.
- Huq, E., Al Sady, B. , Quail, P.H. 2003. Nuclear translocation of the photoreceptor phytochrome B is necessary for its biological function in seedling photomorphogenesis. *The Plant Journal* 35(5): 660-664.
- Huq, E. , Quail, P.H. 2002. PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in *Arabidopsis*. *The EMBO journal* 21(10): 2441-2450.
- Jang, I.C., Henriques, R., Seo, H.S., Nagatani, A. , Chua, N.-H. 2010. *Arabidopsis* PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR proteins promote phytochrome B polyubiquitination by COP1 E3 ligase in the nucleus. *The Plant Cell* 22(7): 2370-2383.
- Jang, K., Lee, H.G., Jung, S.J., Paek, N.C. , Seo, P.J. 2015. The E3 ubiquitin ligase COP1 regulates thermosensory flowering by triggering GI degradation in *Arabidopsis*. *Scientific reports* 5: 12071.
- Jang, S., Marchal, V., Panigrahi, K.C.S., Wenkel, S., Soppe, W., Deng, X.W., Valverde, F. , Coupland, G. 2008. *Arabidopsis* COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *The EMBO Journal* 27(8): 1277-1288.
- Jung, J.H., Domijan, M., Klose, C., Biswas, S., Ezer, D., Gao, M., Khattak, A.K., Box, M.S., Charoensawan, V., Cortijo, S., Kumar, M., Grant, A., Locke, J.C.W., Schäfer, E., Jaeger, K.E. , Wigge, P.A. 2016. Phytochromes function as thermosensors in *Arabidopsis*. *Science* 354(6314): 886-889.
- Kaiserli, E. , Jenkins, G.I. 2007. UV-B promotes rapid nuclear translocation of the *Arabidopsis* UV-B-specific signaling component UVR8 and activates its function in the nucleus. *The Plant Cell* 19(8): 2662-2673.
- Kaiserli, E., Páldi, K., O'Donnell, L., Batalov, O., Pedmale, Ullas V., Nusinow, Dmitri A., Kay, Steve A. , Chory, J. 2015. Integration of Light and Photoperiodic Signaling in Transcriptional Nuclear Foci. *Developmental Cell* 35(3): 311-321.

- Karayekov, E., Sellaro, R., Legris, M., Yanovsky, M.J. , Casal, J.J. 2013. Heat Shock–Induced Fluctuations in Clock and Light Signaling Enhance Phytochrome B–Mediated Arabidopsis Deetiolation. *The Plant Cell* 25(8): 2892-2906.
- Keller, M.M., Jaillais, Y., Pedmale, U.V., Moreno, J.E., Chory, J. , Ballaré, C.L. 2011. Cryptochrome 1 and phytochrome B control shade-avoidance responses in Arabidopsis via partially independent hormonal cascades. *The Plant Journal* 67(2): 195-207.
- Kelly, J.M. , Lagarias, J.C. 1985. Photochemistry of 124-kilodalton Avena phytochrome under constant illumination in vitro. *Biochemistry* 24(21): 6003-6010.
- Kevei, E., Schafer, E. , Nagy, F. 2007. Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes. *Journal of Experimental Botany* 58(12): 3113-3124.
- Kim, J., Yi, H., Choi, G., Shin, B., Song, P.-S. , Choi, G. 2003. Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction. *The Plant Cell* 15(10): 2399-2407.
- Kinnersley, A.M. , Davies, P.J. 1977. Effect of temperature on phytochrome-mediated responses in seedlings of mustard. *Plant physiology* 60(1): 175-177.
- Kircher, S., Gil, P., Kozma Bognár, L., Fejes, E., Speth, V., Husselstein Muller, T., Bauer, D., Ádám, É., Schäfer, E. , Nagy, F. 2002. Nucleocytoplasmic Partitioning of the Plant Photoreceptors Phytochrome A, B, C, D, and E Is Regulated Differentially by Light and Exhibits a Diurnal Rhythm. *The Plant Cell* 14(7): 1541-1555.
- Klose, C., Venezia, F., Hussong, A., Kircher, S., Schäfer, E. , Fleck, C. 2015. Systematic analysis of how phytochrome B dimerization determines its specificity. *Nature plants* 1: 15090.
- Koini, M.A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C.A., Harberd, N.P., Whitelam, G.C. , Franklin, K.A. 2009. High Temperature-Mediated Adaptations in Plant Architecture Require the bHLH Transcription Factor PIF4. *Current Biology* 19(5): 408-413.
- Krall, L. , Reed, J.W. 2000. The histidine kinase-related domain participates in phytochrome B function but is dispensable. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(14): 8169-8174.
- Kumar, S.V., Lucyshyn, D., Jaeger, K.E., Alós, E., Alvey, E., Harberd, N.P. , Wigge, P.A. 2012. Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature* 484(7393): 242-245.
- Kumar, S.V. , Wigge, P.A. 2010. H2A.Z-Containing Nucleosomes Mediate the Thermosensory Response in *Arabidopsis*. *Cell* 140(1): 136-147.
- Kwok, S.F., Staub, J.M. , Deng, X.-W. 1999. Characterization of two subunits of Arabidopsis 19S proteasome regulatory complex and its possible interaction with the COP9 complex. *Journal of molecular biology* 285(1): 85-95.
- Lau, O.S. , Deng, X.W. 2012. The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends in Plant Science* 17(10): 584-593.
- Laubinger, S., Fittinghoff, K. , Hoecker, 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(9): 2293-2306.

- Lee, J.H., Yoo, S.J., Park, S.H., Hwang, I., Lee, J.S., Ahn, J.H. 2007. Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in Arabidopsis. *Genes & development* 21(4): 397-402.
- Leivar, P., Monte, E., Al-Sady, B., Carle, C., Storer, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Quail, P.H. 2008. The Arabidopsis phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *The Plant Cell* 20(2): 337-352.
- Leivar, P., Monte, E., Cohn, M.M., Quail, P.H. 2012. Phytochrome signaling in green Arabidopsis seedlings: impact assessment of a mutually negative phyB–PIF feedback loop. *Molecular plant* 5(3): 734-749.
- Leivar, P., Monte, E., Oka, Y., Liu, T., Carle, C., Castillon, A., Huq, E., Quail, P.H. 2008. Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Current Biology* 18(23): 1815-1823.
- Leivar, P., Quail, P.H. 2011. PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends in Plant Science* 16(1): 19-28.
- Li, J., Li, G., Wang, H., Wang Deng, X. 2011. Phytochrome signaling mechanisms. *The Arabidopsis Book*: e0148.
- Li, L., Ljung, K., Breton, G., Schmitz, R.J., Pruneda-Paz, J., Cowing-Zitron, C., Cole, B.J., Ivans, L.J., Pedmale, U.V., Jung, H.-S. 2012. Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture. *Genes & development* 26(8): 785-790.
- Lian, H.L., He, S.B., Zhang, Y.C., Zhu, D.M., Zhang, J.Y., Jia, K.P., Sun, S.-X., Li, L., Yang, H.Q. 2011. Blue-light-dependent interaction of cryptochrome 1 with SPA1 defines a dynamic signaling mechanism. *Genes & development* 25(10): 1023-1028.
- Lin, C., Robertson, D.E., Ahmad, M., Raibekas, A.A. 1995. Association of flavin adenine dinucleotide with the Arabidopsis blue light receptor CRY1. *Science* 269(5226): 968.
- Lin, C., Yang, H., Guo, H., Mockler, T., Chen, J., Cashmore, A.R. 1998. Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(5): 2686-2690.
- Lorrain, S., Allen, T., Duek, P.D., Whitelam, G.C., Fankhauser, C. 2008. Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *The Plant Journal* 53(2): 312-323.
- Lucas, M., Prat, S. 2014. PIFs get BRright: PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS as integrators of light and hormonal signals. *New Phytologist* 202(4): 1126-1141.
- Ma, D., Li, X., Guo, Y., Chu, J., Fang, S., Yan, C., Noel, J.P., Liu, H. 2016. Cryptochrome 1 interacts with PIF4 to regulate high temperature-mediated hypocotyl elongation in response to blue light. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(1): 224-229.
- Martínez-García, J.F., Huq, E., Quail, P.H. 2000. Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288(5467): 859-863.
- Mas, P., Devlin, P.F., Panda, S., Kay, S.A. 2000. Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* 408(6809): 207-211.
- Matsushita, T., Mochizuki, N., Nagatani, A. 2003. Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature* 424(6948): 571-574.

- Mazzella, M.A., Bertero, D. , Casal, J.J. 2000. Temperature-dependent internode elongation in vegetative plants of *Arabidopsis thaliana* lacking phytochrome B and cryptochrome 1. *Planta* 210(3): 497-501.
- McClung, C.R. 2006. Plant Circadian Rhythms. *The Plant Cell* 18(4): 792-803.
- Medzihradzsky, M., Bindics, J., Ádám, É., Viczián, A., Klement, É., Lorrain, S., Gyula, P., Mérai, Z., Fankhauser, C. , Medzihradzsky, K.F. 2013. Phosphorylation of phytochrome B inhibits light-induced signaling via accelerated dark reversion in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 25(2): 535-544.
- Millar, A.J. 2004. Input signals to the plant circadian clock. *Journal of Experimental Botany* 55(395): 277-283.
- Millenaar, F.F., Van Zanten, M., Cox, M.C.H., Pierik, R., Voesenek, L.A.C.J. , Peeters, A.J.M. 2009. Differential petiole growth in *Arabidopsis thaliana*: photocontrol and hormonal regulation. *New Phytologist* 184(1): 141-152.
- Miyazaki, Y., Takase, T. , Kiyosue, T. 2015. ZEITLUPE positively regulates hypocotyl elongation at warm temperature under light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant signaling & behavior* 10(5): e998540.
- Mockler, T., Michael, T., Priest, H., Shen, R., Sullivan, C., Givan, S., McEntee, C., Kay, S. , Chory, J. 2007. The DIURNAL project: DIURNAL and circadian expression profiling, model-based pattern matching, and promoter analysis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Monte, E., Tepperman, J.M., Al-Sady, B., Kaczorowski, K.A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Li, X., Zhang, Y. , Quail, P.H. 2004. The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(46): 16091-16098.
- Nagatani, A., Reed, J.W. , Chory, J. 1993. Isolation and initial characterization of *Arabidopsis* mutants that are deficient in phytochrome A. *Plant Physiology* 102(1): 269-277.
- Nelson, D.C., Lasswell, J., Rogg, L.E., Cohen, M.A. , Bartel, B. 2000. FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell* 101(3): 331-340.
- Ni, W., Xu, S.L., Tepperman, J.M., Stanley, D.J., Maltby, D.A., Gross, J.D., Burlingame, A.L., Wang, Z.Y. , Quail, P.H. 2014. A mutually assured destruction mechanism attenuates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* 344(6188): 1160-1164.
- Nieto, C., López-Salmerón, V., Davière, J.-M. , Prat, S. 2015. ELF3-PIF4 interaction regulates plant growth independently of the evening complex. *Current Biology* 25(2): 187-193.
- Njimoná, I. , Lamparter, T. 2011. Temperature effects on *Agrobacterium* phytochrome Agp1. *PLoS one* 6(10): e25977.
- Nozue, K., Covington, M.F., Duek, P.D., Lorrain, S., Fankhauser, C., Harmer, S.L. , Maloof, J.N. 2007. Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* 448(7151): 358-361.
- Nozue, K., Harmer, S.L. , Maloof, J.N. 2011. Genomic Analysis of Circadian Clock-, Light-, and Growth-Correlated Genes Reveals PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR5 as a Modulator of Auxin Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 156(1): 357-372.

- Nusinow, D.A., Helfer, A., Hamilton, E.E., King, J.J., Imaizumi, T., Schultz, T.F., Farré, E.M., Kay, S.A. 2011. The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* 475(7356): 398-402.
- Oravecz, A., Baumann, A., Máté, Z., Brzezinska, A., Molinier, J., Oakeley, E.J., Ádám, É., Schäfer, E., Nagy, F., Ulm, R. 2006. CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 is required for the UV-B response in Arabidopsis. *The Plant Cell* 18(8): 1975-1990.
- Osterlund, M.T., Hardtke, C.S., Wei, N., Deng, X.W. 2000. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature* 405(6785): 462-466.
- Osterlund, M.T., Wei, N., Deng, X.W. 2000. The roles of photoreceptor systems and the COP1-targeted destabilization of HY5 in light control of Arabidopsis seedling development. *Plant Physiology* 124(4): 1520-1524.
- Pacín, M., Legris, M., Casal, J.J. 2013. COP1 re-accumulates in the nucleus under shade. *The Plant Journal* 75(4): 631-641.
- Pacín, M., Legris, M., Casal, J.J. 2014. Rapid Decline in Nuclear CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS1 Abundance Anticipates the Stabilization of Its Target ELONGATED HYPOCOTYL5 in the Light. *Plant Physiology* 164(3): 1134-1138.
- Pacín, M., Semmoloni, M., Legris, M., Finlayson, S.A., Casal, J.J. 2016. Convergence of CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 and PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR signalling during shade avoidance. *New Phytologist* 211(3): 967-979.
- Park, E., Park, J., Kim, J., Nagatani, A., Lagarias, J.C., Choi, G. 2012. Phytochrome B inhibits binding of phytochrome-interacting factors to their target promoters. *The Plant Journal* 72(4): 537-546.
- Pedmale, U.V., Huang, S.S.C., Zander, M., Cole, B.J., Hetzel, J., Ljung, K., Reis, P.A., Sridevi, P., Nito, K., Nery, J.R. 2016. Cryptochromes interact directly with PIFs to control plant growth in limiting blue light. *Cell* 164(1): 233-245.
- Penfield, S. 2008. Temperature perception and signal transduction in plants. *New Phytologist* 179(3): 615-628.
- Penfield, S., Hall, A. 2009. A Role for Multiple Circadian Clock Genes in the Response to Signals That Break Seed Dormancy in Arabidopsis. *The Plant Cell* 21(6): 1722-1732.
- Perez Pepe, M., Slomiansky, V., Loschi, M., Luchelli, L., Neme, M., Thomas, M.G., Boccaccio, G.L. 2012. BUHO: A MATLAB Script for the Study of Stress Granules and Processing Bodies by High-Throughput Image Analysis. *PLoS one* 7(12): e51495.
- Pierik, R., Whitelam, G.C., Voesenek, L.A., De Kroon, H., Visser, E.J. 2004. Canopy studies on ethylene-insensitive tobacco identify ethylene as a novel element in blue light and plant-plant signalling. *The Plant Journal* 38(2): 310-319.
- Polko, J.K., Pierik, R., van Zanten, M., Tarkowská, D., Strnad, M., Voesenek, L.A.C.J., Peeters, A.J.M. 2013. Ethylene promotes hyponastic growth through interaction with ROTUNDIFOLIA3/CYP90C1 in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 64(2): 613-624.
- Price, H., Sparrow, A., Nauman, A.F. 1973. Correlations between nuclear volume, cell volume and DNA content in meristematic cells of herbaceous angiosperms. *Cellular and Molecular Life Sciences* 29(8): 1028-1029.

- Quint, M., Delker, C., Franklin, K.A., Wigge, P.A., Halliday, K.J. , van Zanten, M. 2016. Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. *Nature Plants* 2: 15190.
- Rausenberger, J., Hussong, A., Kircher, S., Kirchenbauer, D., Timmer, J., Nagy, F., Schäfer, E. , Fleck, C. 2010. An Integrative Model for Phytochrome B Mediated Photomorphogenesis: From Protein Dynamics to Physiology. *PLOS ONE* 5(5): e10721.
- 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 Physiology* 104(4): 1139-1149.
- Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., Furuya, M. , Chory, J. 1993. Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development. *The Plant Cell* 5(2): 147-157.
- Rizzini, L., Favory, J.J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schäfer, E., Nagy, F. , Jenkins, G.I. 2011. Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science* 332(6025): 103-106.
- Rolauffs, S., Fackendahl, P., Sahm, J., Fiene, G. , Hoecker, U. 2012. Arabidopsis COP1 and SPA genes are essential for plant elongation but not for acceleration of flowering time in response to a low red light to far-red light ratio. *Plant physiology* 160(4): 2015-2027.
- Roth-Bejerano, N., Koller, D. , Negbi, M. 1966. Mediation of phytochrome in the inductive action of low temperature on dark germination of lettuce seed at supra-optimal temperature. *Plant physiology* 41(6): 962-964.
- Salomé, P.A., Weigel, D. , McClung, C.R. 2010. The Role of the Arabidopsis Morning Loop Components CCA1, LHY, PRR7, and PRR9 in Temperature Compensation. *The Plant Cell* 22(11): 3650-3661.
- Sánchez Lamas, M., Lorenzo, C.D. , Cerdán, P.D. 2016. Bottom-up Assembly of the Phytochrome Network. *PLOS Genetics* 12(11): e1006413.
- Schäfer, E., Schmidt W. 1974. Temperature dependence of phytochrome dark reactions. *Planta*. 116(3): 257-266.
- Schultz, T.F., Kiyosue, T., Yanovsky, M., Wada, M. , Kay, S.A. 2001. A role for LKP2 in the circadian clock of Arabidopsis. *The Plant Cell* 13(12): 2659-2670.
- Seaton, D.D., Smith, R.W., Song, Y.H., MacGregor, D.R., Stewart, K., Steel, G., Foreman, J., Penfield, S., Imaizumi, T., Millar, A.J. , Halliday, K.J. 2015. Linked circadian outputs control elongation growth and flowering in response to photoperiod and temperature. *Molecular Systems Biology* 11(1).
- Sellaro, R., Crepy, M., Trupkin, S.A., Karayekov, E., Buchovsky, A.S., Rossi, C. , Casal, J.J. 2010. Cryptochrome as a sensor of the blue/green ratio of natural radiation in Arabidopsis. *Plant physiology* 154(1): 401-409.
- Sengupta, P. , Garrity, P. 2013. Sensing temperature. *Current Biology* 23(8): R304-R307.
- Sharrock, R.A. , Clack, T. 2002. Patterns of expression and normalized levels of the five Arabidopsis phytochromes. *Plant physiology* 130(1): 442-456.

- Sheerin, D.J., Menon, C., zur Oven Krockhaus, S., Enderle, B., Zhu, L., Johnen, P., Schleifenbaum, F., Stierhof, Y.D., Huq, E., Hiltbrunner, A. 2015. Light-Activated Phytochrome A and B Interact with Members of the SPA Family to Promote Photomorphogenesis in Arabidopsis by Reorganizing the COP1/SPA Complex. *The Plant Cell* 27(1): 189-201.
- Somers, D.E., Schultz, T.F., Milnamow, M., Kay, S.A. 2000. ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from Arabidopsis. *Cell* 101(3): 319-329.
- Stavang, J.A., Gallego-Bartolomé, J., Gómez, M.D., Yoshida, S., Asami, T., Olsen, J.E., García-Martínez, J.L., Alabadí, D., Blázquez, M.A. 2009. Hormonal regulation of temperature-induced growth in Arabidopsis. *The Plant Journal* 60(4): 589-601.
- Strasser, B., Sánchez Lamas, M., Yanovsky, M.J., Casal, J.J., Cerdán, P.D. 2010. Arabidopsis thaliana life without phytochromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(10): 4776-4781.
- Su, Y.S., Lagarias, J.C. 2007. Light-independent phytochrome signaling mediated by dominant GAF domain tyrosine mutants of Arabidopsis phytochromes in transgenic plants. *The Plant Cell* 19(7): 2124-2139.
- Sugimoto-Shirasu, K., Roberts, K. 2003. "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Current opinion in plant biology* 6(6): 544-553.
- Sun, J., Qi, L., Li, Y., Chu, J., Li, C. 2012. PIF4-mediated activation of YUCCA8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating Arabidopsis hypocotyl growth. *PLoS Genet* 8(3): e1002594.
- Sweere, U., Eichenberg, K., Lohrmann, J., Mira Rodado, V., Bäurle, I., Kudla, J., Nagy, F., Schäfer, E., Harter, K. 2001. Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science* 294(5544): 1108-1111.
- Talbert, P.B., Henikoff, S. 2014. Environmental responses mediated by histone variants. *Trends in cell biology* 24(11): 642-650.
- Toledo-Ortiz, G., Johansson, H., Lee, K.P., Bou-Torrent, J., Stewart, K., Steel, G., Rodríguez-Concepción, M., Halliday, K.J. 2014. The HY5-PIF regulatory module coordinates light and temperature control of photosynthetic gene transcription. *PLoS Genet* 10(6): e1004416.
- Trupkin, S.A., Legris, M., Buchovsky, A.S., Tolava Rivero, M.B., Casal, J.J. 2014. Phytochrome B Nuclear Bodies Respond to the Low Red to Far-Red Ratio and to the Reduced Irradiance of Canopy Shade in Arabidopsis. *Plant Physiology* 165(4): 1698-1708.
- Tsien, R.Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry* 67(1): 509-544.
- Van Buskirk, E.K., Decker, P.V., Chen, M. 2012. Photobodies in Light Signaling. *Plant Physiology* 158(1): 52-60.
- Van Buskirk, E.K., Reddy, A.K., Nagatani, A., Chen, M. 2014. Photobody localization of phytochrome B is tightly correlated with prolonged and light-dependent inhibition of hypocotyl elongation in the dark. *Plant physiology* 165(2): 595-607.
- Vandenbussche, F., Vriezen, W.H., Smalle, J., Laarhoven, L.J.J., Harren, F.J.M., Van Der Straeten, D. 2003. Ethylene and Auxin Control the Arabidopsis Response to Decreased Light Intensity. *Plant Physiology* 133(2): 517-527.

- von Arnim, A.G. , Deng, X.W. 1994. Light inactivation of Arabidopsis photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. *Cell* 79(6): 1035-1045.
- von Arnim, A.G., Osterlund, M.T., Kwok, S.F. , Deng, X.W. 1997. Genetic and Developmental Control of Nuclear Accumulation of COP1, a Repressor of Photomorphogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* 114(3): 779-788.
- Wigge, P.A. 2013. Ambient temperature signalling in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 16(5): 661-666.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V. , Provart, N.J. 2007. An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS one* 2(8): e718.
- Yamaguchi, R., Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay, S.A. , Nagatani, A. 1999. Light-dependent Translocation of a Phytochrome B-GFP Fusion Protein to the Nucleus in Transgenic *Arabidopsis*. *The Journal of Cell Biology* 145(3): 437-445.
- Yeh, C.H., Kaplinsky, N.J., Hu, C. , Charng, Y.Y. 2012. Some like it hot, some like it warm: phenotyping to explore thermotolerance diversity. *Plant Science* 195: 10-23.
- Yu, J.W., Rubio, V., Lee, N.Y., Bai, S., Lee, S.Y., Kim, S.S., Liu, L., Zhang, Y., Irigoyen, M.L., Sullivan, J.A., Zhang, Y., Lee, I., Xie, Q., Paek, N.C. , Deng, X.W. 2008. COP1 and ELF3 Control Circadian Function and Photoperiodic Flowering by Regulating GI Stability. *Molecular Cell* 32(5): 617-630.
- Zhang, J., Stankey, R.J. , Vierstra, R.D. 2013. Structure-Guided Engineering of Plant Phytochrome B with Altered Photochemistry and Light Signaling. *Plant Physiology* 161(3): 1445-1457.
- Zhang, Y., Feng, S., Chen, F., Chen, H., Wang, J., McCall, C., Xiong, Y. , Deng, X.W. 2008. Arabidopsis DDB1-CUL4 ASSOCIATED FACTOR1 forms a nuclear E3 ubiquitin ligase with DDB1 and CUL4 that is involved in multiple plant developmental processes. *The Plant Cell* 20(6): 1437-1455.
- Zhu, D., Maier, A., Lee, J.H., Laubinger, S., Saijo, Y., Wang, H., Qu, L.J., Hoecker, U. , Deng, X.W. 2008. Biochemical Characterization of Arabidopsis Complexes Containing CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 and SUPPRESSOR OF PHYA Proteins in Light Control of Plant Development. *The Plant Cell* 20(9): 2307-2323.

Anexo

Anexo - Figuras suplementarias

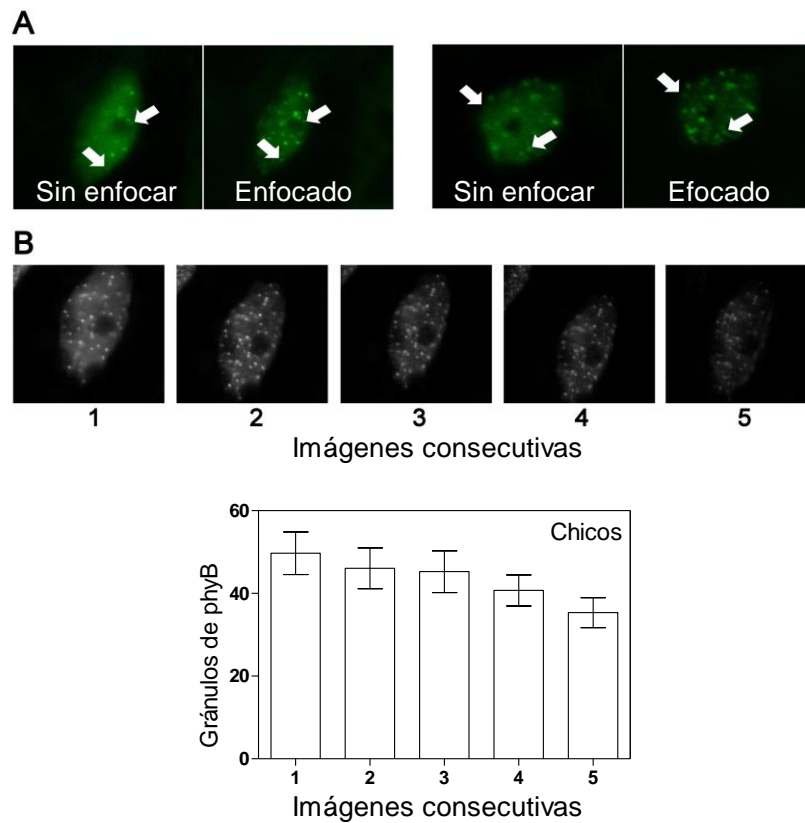


Figura S.1 - La luz de excitación del microscopio no induce la formación de gránulos de phyB.

A - Se sometieron las plantas a 2h de luz de baja irradiancia. Para tomar las imágenes de microscopía el plano focal se eligió observando solo una zona de la hoja, sin irradiar el resto de la muestra, y posteriormente se sacó la imagen en otro lado. En estos núcleos que nunca habían sido irradiados también se observaron los gránulos pequeños. Posteriormente se sacó una foto con el núcleo bien enfocado y se constató que los gránulos presentes en las fotos anteriores eran pequeños.

B - Se tomaron imágenes repetidas sobre el mismo núcleo. Si el láser indujera la formación de gránulos en fotos sucesivas deberían aparecer nuevos gránulos. Tanto en las imágenes representativas como en la cuantificación se observa que la cantidad de gránulos y el brillo total disminuyen, debido al efecto de fotoblanqueo que sufren las proteínas fluorescentes.

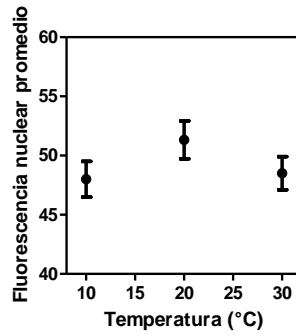


Figura S.2 - El efecto de la temperatura sobre la abundancia nuclear de *phyB* a 20°C no se debe a un aumento en la actividad del promotor *UBQ10*.

Plantas del genotipo *PGB (35S::PHYB::GFP)* fueron cultivadas durante 3 días a 22°C y 80 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ con luz blanca provista por tubos fluorescentes en condiciones de día largo. 2h después del comienzo del día fueron transferidas a 10, 20 o 30°C y 80 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ con luz provista por tubos fluorescentes. Al cabo de 4h de tratamiento se tomaron las imágenes de microscopía confocal.

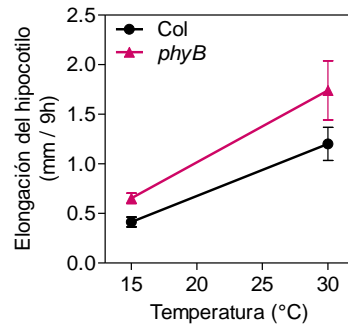


Figura S.3 - La respuesta a la temperatura se mantiene aun cuando todos los fotorreceptores se encuentran inactivos.

Se cultivaron plantas salvajes y mutantes de *phyB* en condiciones de luz blanca, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ provista por tubos fluorescentes a 20°C , fotoperiodo de 10 h, por 3 días. El cuarto día, una hora después de comenzado el día fueron tratadas con un pulso saturante de luz rojo lejano de 15 min, con el fin de inactivar a los fitocromos, y luego cultivadas en oscuridad durante 9 h a 15°C o 30°C . Se midió la elongación del hipocotilo durante las 9 h en oscuridad, cuando todos los fotorreceptores se encontraban inactivos.