

Tesis Doctoral:

**Participación hormonal en el control
del alargamiento de hipocótilos de
Arabidopsis thaliana bajo luz azul**

Lic. Mariela A. Pontin



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
Fac de Ciencias Exactas,
Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Ciencias Naturales

2005



PONTIN, M.A.
Participación Hormon



2005

61158

Tesis Doctoral:

**Participación hormonal en el control
del alargamiento de hipocótilos de
Arabidopsis thaliana bajo luz azul**

Tesista: Lic. Mariela A. Pontin

Director: Dr. Rubén Bottini

86116



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
Fac de Ciencias Exactas,
Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Ciencias Naturales

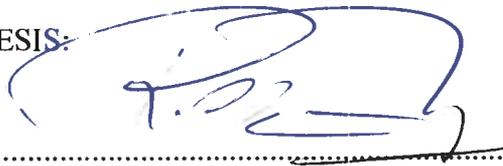
2005

61158

MFN:
Clasif: T.395

Los ensayos experimentales aquí descritos fueron realizados en el Departamento de Ciencias Naturales, Orientación Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. Los estudios de cinética de crecimiento del hipocótilo se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Edgar Spalding, Department of Botany, University of Wisconsin, Madison, USA. El análisis transcriptómico usando microarreglos de ADN forma parte de un trabajo en colaboración con el laboraotio del Dr. Edgar Spalding, University of Wisconsin, USA.

DIRECTOR DE TESIS:



Dr. Rubén Bottini.....

TRIBUNAL EVALUADOR

MSc. Juan Bruno Cavagnaro.....



Dr. Norman García.....



Dr. Roberto Staneloni.....

COMISIÓN ESPECIAL DE TESIS:

Dres. Jorge Casal, Norman García y Roberto Staneloni.

Dedicado a:

Mi madre y hermanas con todo el cariño

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Rubén Bottini, mi director de tesis, por brindarme su incondicional apoyo científico y personal, por su constante estímulo, por su flexibilidad y confianza en mí, por sus consejos y críticas que han hecho que siga evolucionando y creciendo. Por todo ello mis más sinceros agradecimientos.
- Al Dr. Edgar Spalding quien incondicionalmente me brindó la posibilidad de realizar parte de este trabajo en su laboratorio, por su valioso aporte científico, su constante interés, disposición y por su calidez humana.
- A los Dres. Jorge Casal, Norman García y Roberto Staneloni, miembros de la Comisión Especial de Tesis, por el valioso aporte intelectual, tiempo brindado durante el desarrollo de este trabajo de tesis y constante apoyo.
- Al MSc Bruno Cavagnaro, miembro del Tribunal Evaluador, por su valioso aporte científico y disposición.
- Al Dr. Kevin Folta por su aporte científico, por el estímulo brindado, por su infinita paciencia, por los momentos compartidos, y por mostrarme que tanto en ciencia como en la vida son tan valiosos los aciertos como los errores. A él muchas gracias.
- A ti, mi ángel y amigo
- A mis amigas Inés, Ana, Claudia, Gabriela, Fabiola y Laura por su incondicional apoyo y estímulo constante, por la ayuda ofrecida en todo momento, por los almuerzos y cenas compartidas entre charlas y risas, y por brindarme su amistad. Gracias “Chichis”.
- A Vanina, por su sinceridad, honestidad, dulzura, calidez humana, porque junto a Roberto me dieron la maravillosa alegría de conocer a Santiago, y por su eterna amistad.
- A Rafael....gringo que puedo decirte más que....gracias por tu desbordante alegría y por dar siempre la sonrisa más honesta.

- A esos "seres especiales" a los cuales recordaré siempre y que son un ejemplo de incondicionalidad, fidelidad, y amistad.
- Al Departamento de Ciencias Naturales que hizo posible de una forma u otra la realización de este trabajo de tesis.
- A la Universidad Nacional de Río Cuarto por su formación académico y apoyo institucional.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme las becas que hicieron posible la realización de este trabajo.
- A Dios por estar siempre conmigo.
- Gracias, gracias....a todos los que mi mente olvida en este preciso instante pero mi corazón recordará siempre.

RESUMEN

La luz azul (LA) de alta intensidad inhibe marcadamente la rápida elongación de hipocótilos de plántulas etioladas de *Arabidopsis thaliana*. Esta respuesta del crecimiento presenta dos fases, una primera de rápida inhibición mediada por el receptor del fototropismo, phot1, y una segunda fase dependiente del receptor cry1 o "fase criptocromo" que controla el crecimiento luego de aproximadamente 30 min de irradiación continua con LA de alta intensidad. En la literatura se cuenta con numerosos estudios sobre la respuesta de inhibición del crecimiento inducida por LA. Sin embargo, se conoce poco sobre los mecanismos por los cuales los receptores criptocromo regulan los cambios en el crecimiento del tallo. Existen evidencias de que cambios en la expresión de genes involucrados en el control de la extensibilidad y relajación de la pared, variación de los niveles hormonales y sensibilidad de los tejidos a estos reguladores, así como también una regulación del transporte de auxinas, participarían en el control del crecimiento del tallo por luz. El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de las giberelinas (GAs), ácido indol-3-acético (IAA) y ácido abscísico (ABA) como intermediarios en la cascada de trasducción de señales que media entre la información lumínica percibida por el receptor de LA cry1 y la inhibición del crecimiento del hipocótilo en plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

Por un lado, se desarrolló un sistema experimental que combinó estudios fisiológicos que consistieron en la medición del crecimiento del hipocótilo (a corto y largo plazo) en respuesta a la aplicación de GAs, IAA, sustancias inhibidoras de la síntesis de GAs y ABA (Prohexadiona-Ca, Fluridona), e inhibidores del transporte de auxinas (TIBA); así como también mediciones del contenido de GAs, IAA y ABA en plántulas silvestres y mutantes *cry1* de *A. thaliana* crecidas en LA y oscuridad, mediante cromatografía de gases capilar-espectrometría de masas-monitoreo selectivo de iones (GC-MS-SIM). Por el otro lado, se realizaron estudios moleculares de la expresión diferencial de genes regulados por *cry1* mediante el uso de microarreglos de ADN.

El receptor *cry1* media la respuesta de inhibición del crecimiento del hipocótilo inducida por LA sin afectar los niveles endógenos de ABA o la expresión regulada por *cry1* de genes involucrados en el metabolismo del ABA.

La respuesta inhibitoria del crecimiento del hipocótilo mediada por el receptor cry1, sería independiente del nivel de IAA de los tejidos y del transporte de auxinas.

Las plántulas de *Arabidopsis* crecidas en oscuridad presentan niveles suficientes u "homeostáticos" de GAs que serían los responsables, en parte, del crecimiento "elongado" del hipocótilo bajo esta condición lumínica. La reducción en la tasa de crecimiento del hipocótilo inducida por LA, sería el resultado al menos en parte, de una disminución mediada por cry1 de la sensibilidad de los tejidos a las GAs activas. El receptor cry1 regularía los niveles de GAs activas, no sólo activando el paso de 3 β -hidroxilación que convierte a formas inactivas en formas biológicamente activas, si no también, tendría un efecto inhibitorio sobre la actividad de inactivación de GAs por 2 β -hidroxilación.

De los 8297 transcritos y controles representados en el microarreglo, aproximadamente 400 genes que codifican quinasas, factores de transcripción, reguladores del ciclo celular, enzimas del metabolismo de la pared celular y del metabolismo hormonal, y factores de respuesta a hormonas, participarían en la respuesta de inhibición del crecimiento mediada por cry1. Los resultados obtenidos a partir de los experimentos de microarreglos sugieren que cry1 inhibe el crecimiento del hipocótilo regulando la expresión de genes relacionados al metabolismo de las GAs, respuesta a las auxinas y conjugación de estas hormonas.

ABSTRACT

Blue light (BL) of high fluence-rate strongly inhibits the rapid hypocotyl elongation of etiolated seedlings of *Arabidopsis thaliana*. BL-induced growth inhibition occurs in two genetically independent phases. The first phase begins within 30 s of illumination. Phototropin 1 (phot1), the photoreceptor responsible for phototropism, mediates this fast, initial phase of growth inhibition by BL. After approximately 30 min of high-irradiance BL, the influence of phot1 on hypocotyl elongation dissipates and a cry1-dependent mechanism assumes the control of growth. The inhibition of stem growth by BL has been intensively studied in the last few years. However, little is known regarding the mechanism used by cryptochrome receptors to modulate shoot growth. There are several pieces of evidence that indicate a role for hormonal levels, and hormonal responsiveness, cell wall enzymes, cell wall properties, auxin transport, and general changes in gene expression, in the control of stem elongation by light. The objective of this study was to evaluate the participation of gibberellins (GAs), indole-3-acetic acid (IAA) and abscisic acid (ABA) as intermediaries in the signal transduction cascade that mediates between the BL signal captured by cry1 and the inhibition of hypocotyl elongation in *Arabidopsis* seedlings.

Physiological studies consisting in short- and long-term measurements of hypocotyl length in response to the application of GAs, IAA, ABA, inhibitors of GA and ABA synthesis (Ca-Prohexadione and Fluridone, respectively), and inhibitors of auxin transport (TIBA) were performed. Measurements of GAs, IAA and ABA levels in dark- (D) and BL-grown seedlings were carried out by capillary gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring (GC-MS-SIM). Genomic studies using DNA microarray were done to identify genes responsible for the cry1 phase of hypocotyl growth inhibition.

The results show that BL acting throughout cry1 inhibits hypocotyl elongation of *Arabidopsis* seedlings without affecting ABA levels or the expression of genes associated with ABA metabolism.

The cry1-mediated inhibition of hypocotyl elongation in de-etiolated *Arabidopsis* seedlings would be independent from both, the tissue's IAA levels and the auxin transport.

Dark-grown *Arabidopsis* seedlings contain homeostatic levels of GAs that would be responsible, at least in part, for the long hypocotyl phenotype in D. BL acting throughout cry1

inhibits hypocotyl growth, at least in part, by diminishing the responsiveness to endogenous levels of active GAs. cry1 appears to regulate bioactive GA levels, either by activating the step of 3 β -hydroxylation that converts inactive GAs to bioactive forms in shoot growth, or by reducing the de-activation of GAs by 2 β -hydroxylation.

Of the 8297 transcripts and controls represented on the microarray, approximately 400 genes encoding kinases, transcription factors, regulators of the cell cycle, enzymes of the cell wall metabolism, enzymes of the hormonal metabolism and factors of response to hormones, would participate in the early response of the cry1-mediated growth inhibition. The results obtained from DNA microarray experiments suggest that cry1 inhibits hypocotyl growth by regulating expression of genes associated with GA metabolism and auxin response or conjugation.

ABREVIATURAS EMPLEADAS

ABA:	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
BL:	Brasinólido
BR:	Brasinoesteroides
BX-112	Prohexadiona-Ca
C19:	Esqueleto de 19 átomos de carbono
cADN:	ADN copia
cARN:	ARN copia
cry1:	Criptocromo 1
cry2:	Criptocromo 2
D:	Oscuridad
DC:	Día corto
DL:	Día largo
GA/s:	Giberelina/s
GA13ox:	GA 13-hidroxilasa
GA20ox:	GA 20-oxidasa
GA2ox:	GA 2-oxidasa
GA3ox:	GA 3 β -hidroxilasa
GAs-C19:	Giberelinas de 19 átomos de carbono
GAs-C20:	Giberelinas de 20 átomos de carbono
GC:	Cromatografía gaseosa
GC-MS:	Cromatografía gaseosa-espectrometría de masas
GC-MS-SIM:	Cromatografía gaseosa-espectrometría de masas-monitoreo selectivo de iones
HPLC:	Cromatografía líquida de alta presión
IAA:	Ácido indol-3-acético
LA:	Luz azul

LR:	Luz roja
LRL:	Luz rojo lejana
NPA:	Ácido naftiltalamico
npq1:	Receptor de luz azul
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
Pf:	Forma inactiva del fitocromo
PF:	Peso fresco
Pfr:	Forma activa del fitocromo
phot1 (nph1):	Receptor Fototropina 1
phot2 (npl1):	Receptor Fototropina 2
Phy:	Fitocromo
PhyA:	Fitocromo A
PhyB:	Fitocromo B
TIBA:	Ácido tri-iodo benzoico
UV:	Luz ultravioleta
UV-A:	Luz ultravioleta de onda corta
UV-B:	Luz ultravioleta de onda larga
WT:	Tipo silvestre

ÍNDICE

CAPÍTULO I: FOTOCONTROL DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO

I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
I.1. Proceso de de-etiolación.....	1
I.2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	7
I.3. Fotorreceptores de luz azul.....	8
I.3.a. Criptocromos.....	9
I.3.b. Fototropinas.....	13
I.3.c. Receptor npq1.....	15
I.4. Receptores de luz azul y elongación del hipocótilo.....	16
I.5. Fitohormonas.....	19
I.6. Giberelinas.....	19
I.6.a. Biosíntesis.....	21
I.6.a.i. Formación de <i>ent</i> -kaureno.....	21
I.6.a.ii. Formación de GA ₁₂ -aldehído.....	23
I.6.a.iii. Formación de GAs activas.....	25
I.6.b. Regulación de los niveles de GAs activas.....	29
I.6.c. Control del alargamiento caulinar.....	33
I.6.d. Inhibidores de la biosíntesis de GAs.....	35
I.7. Acido Abscísico.....	39
I.7.a. Biosíntesis.....	39
I.7.a.i. Formación de carotenoides.....	41
I.7.a.ii. Formación de ABA.....	42
I.7.b. Catabolismo del ABA.....	45
I.7.c. Inhibidores de la biosíntesis de ABA.....	45
I.7.d. Efectos fisiológicas.....	47
I.8. Auxinas.....	49
I.8.a. Biosíntesis.....	50
I.8.b. Metabolismo del IAA.....	54
I.8.c. Transporte de IAA e inhibidores del transporte de auxinas.....	55

I.8.d. Efectos fisiológicos.....	57
I.9. Brasinoesteroides y etileno en el proceso de de-etiolación.....	58
I.10. PLANTEO DE HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	62
<u>OBJETIVOS</u>	64
Objetivo general.....	64
Objetivos específicos.....	64
<u>CAPÍTULO II: ACCIÓN DEL RECEPTOR CRY1 SOBRE EL NIVEL HORMONAL</u>	
II.1. INTRODUCCIÓN.....	65
II.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
II.2.a. Material vegetal y condiciones experimentales de crecimiento.....	73
II.2.b. Experimentos de cinética de crecimiento del hipocótilo.....	73
II.2.c. Experimentos de crecimiento a largo plazo del hipocótilo.....	75
II.2.d. Preparación del material vegetal para la determinación de hormonas.....	76
II.2.e. Determinación y cuantificación de GAs por GC-MS-SIM.....	77
II.2.e.i. Extracción, purificación y separación de GAs.....	77
II.2.e.ii. Identificación y cuantificación de GAs por GC-MS-SIM.....	78
II.2.f. Determinación y cuantificación de ABA por GC-MS-SIM.....	79
II.2.g. Análisis de IAA.....	81
II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	81
<u>CAPITULO III: ACCIÓN TEMPRANA DEL RECEPTOR CRY1 SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA</u>	
III.1. INTRODUCCIÓN.....	98
III.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	100
III.2.a. Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	100
III.2.b. Preparación de la sonda e hibridación.....	101
III.2.c. Análisis estadístico.....	102
III.2.d. Análisis de RNA por Northern blot.....	103

III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	103
III.3.a. Perfil de transcritos de plántulas silvestres y mutantes <i>cry1</i>	103
III.3.b. Cielo celular.....	106
III.3.c. Pared celular.....	107
III.3.d. Hormonas.....	108
III.3.e. Quinasas.....	112
III.3.f. Factores de transcripción.....	116

CAPITULO IV: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

IV.1. CONCLUSIONES.....	121
IV.2. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	122
 BIBLIOGRAFÍA.....	 124

CAPÍTULO I

FOTOCONTROL DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO



CAPITULO I

FOTOCONTROL DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. Proceso de de-etiolación

Luego de la germinación las plantas (dicotiledóneas), al crecer bajo la superficie del suelo, presentan un patrón de crecimiento etiolado. A nivel fenotípico este patrón consiste en una rápida elongación del hipocótilo, gancho apical cerrado, escaso desarrollo de cotiledones y primordios foliares, y color amarillento pálido (**Figura 1**). De este modo, la etiolación puede ser considerada como una adaptación para vivir en ausencia de energía radiante, en la cual la extensión del tallo es favorecida en detrimento del crecimiento foliar, aumentando así la probabilidad que las hojas puedan elevarse por sobre la superficie y convertirse en fotosintéticas antes que se agoten las reservas de la semilla. La de-etiolación post-emergencia (**Figura 1**), requiere de las plantas la capacidad de percibir las señales provenientes del ambiente lumínico, las cuales se traducen en una inhibición del alargamiento del hipocótilo, apertura del gancho apical, separación y expansión rápida de los cotiledones y hojas con la subsecuente puesta en marcha de la maquinaria fotosintética. De este modo, la luz es un importante factor ambiental que controla el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Una de las razones de esto es la necesidad de luz para la fotosíntesis, indispensable para proveer el material estructural y la energía que mantiene el crecimiento constante del individuo. Asimismo, ocurren muchos otros efectos producto de la luz que controlan la apariencia de la planta, esto es, su desarrollo estructural o morfogénesis (origen de la forma). Al control de la morfogénesis por medio de la luz se le conoce como fotomorfogénesis.

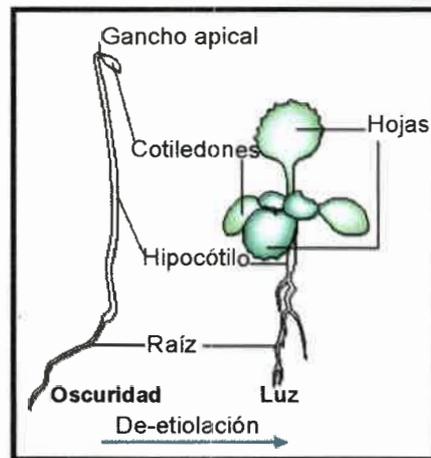


Figura 1. Esquema del proceso de de-etiolación en *Arabidopsis*. La luz absorbida por distintos fotorreceptores induce la inhibición del alargamiento del hipocótilo, apertura del gancho apical, separación y expansión rápida de los cotiledones y hojas. Tomado de Quail 2002.

A nivel celular el proceso de de-etiolación se manifiesta como la inhibición de la elongación de las células del hipocótilo, estimulación de la expansión celular en los cotiledones e inducción del desarrollo de cloroplastos. A nivel metabólico este proceso involucra el cambio de una existencia heterotrófica, la cual es dependiente de las reservas de la semilla, a una autotrófica, dependiente de la fotosíntesis. A nivel molecular, la de-etiolación conlleva profundos cambios en la expresión de numerosos genes involucrados en el control del crecimiento y desarrollo (Ma *et al.* 2001, Tepperman *et al.* 2001 y 2004, Wang *et al.* 2001).

La capacidad de las plantas de monitorear su ambiente lumínico y percibir pequeñas fluctuaciones en múltiples parámetros de éste es posible gracias a la presencia de un sistema sensorial, los fotorreceptores. Varios fotorreceptores capaces de captar tanto intensidad como calidad, dirección y duración diurna de la luz incidente, están involucrados en el proceso de de-etiolación (**Figura 2**). Por un lado están los criptocromos y fototropinas (Briggs *et al.* 2001, Cashmore *et al.* 1999), familias de receptores que sensan las regiones del espectro correspondiente al azul y ultravioleta de onda corta (UV-A). Por el otro los fitocromos, que perciben principalmente la radiación roja y rojo lejano (Mancinelli 1994, Quail 1991).

Recientemente se han identificado tres componentes de la familia multigénica *ZTL* (Somers *et al.* 2000, Somers *et al.* 2004), cuyos miembros codifican proteínas que combinan elementos de un fotorreceptor con dominios involucrados en el sistema de degradación

proteico dependiente del proteosoma. El componente mejor caracterizado de esta familia es ZEILUPE (ZTL, Somers *et al.* 2000), una proteína de 609 aminoácidos involucrada en el control del período circadiano y fotomorfogénesis (Somers *et al.* 2004); que contiene en su extremo N-terminal una región con alto grado de similitud a los dominios del tipo LOV (debido a que este dominio se presenta en proteínas que regulan respuestas a la luz, oxígeno y voltaje, Taylor y Zhulin 1999) presentes en las fototropinas de *Arabidopsis* (Briggs y Christie 2002) y la proteína fotosensible a luz azul (LA) WHITE COLLAR-1 (WC-1) de *Neurospora crassa* (Ballario *et al.* 1998). El resto del polipéptido consiste de un motivo F-box y seis motivos kelch repetidos en su extremo C-terminal (Somers *et al.* 2000), los cuales participarían en el "reclutamiento" de proteínas blanco para su ubiquitinación a través del complejo SCF (Skp1-Cullin-F-box) y subsecuente degradación dependiente del proteosoma (Deshaies 1999, Vierstra 2003). Los marcados efectos, dependientes de la tasa de fluencia, sobre el período circadiano en mutantes *ztl* (deficientes y que sobreexpresan la proteína ZTL; Somers *et al.* 2000, Somers *et al.* 2004), la interacción positiva entre ZTL, phyB y cry1 observada en ensayos doble-híbrido en levaduras (Jarillo *et al.* 2001) y el dominio LOV presente en su secuencia, sugieren que ZTL no sólo actuaría como un típico fotorreceptor, sino que podría interactuar con uno o más fotorreceptores conocidos bajo determinadas condiciones lumínicas (luz roja [LR], LA o luz blanca) y facilitar la degradación de componentes del reloj circadiano (Somers *et al.* 2004).

Los fitocromos son cromoproteínas que existen como dímeros de polipéptidos de aproximadamente 125 KDa, cada uno unido covalentemente a un cromóforo. Éste es un tetrapirrol de cadena abierta, denominado fitocromobilina (Quail 1991). Los fitocromos pueden encontrarse en dos formas fotointerconvertibles, el Pr que absorbe principalmente LR y el Pfr, considerada la forma activa del fitocromo, que absorbe principalmente luz rojo lejana (LRL, Quail 1991). Debido a que los espectros de absorción de las dos formas están parcialmente solapadas, la fotoconversión se produce en ambas direcciones simultáneamente, resultando en un fotoequilibrio dinámico que finalmente depende de la longitud de onda de la luz incidente (Mancinelli 1994).

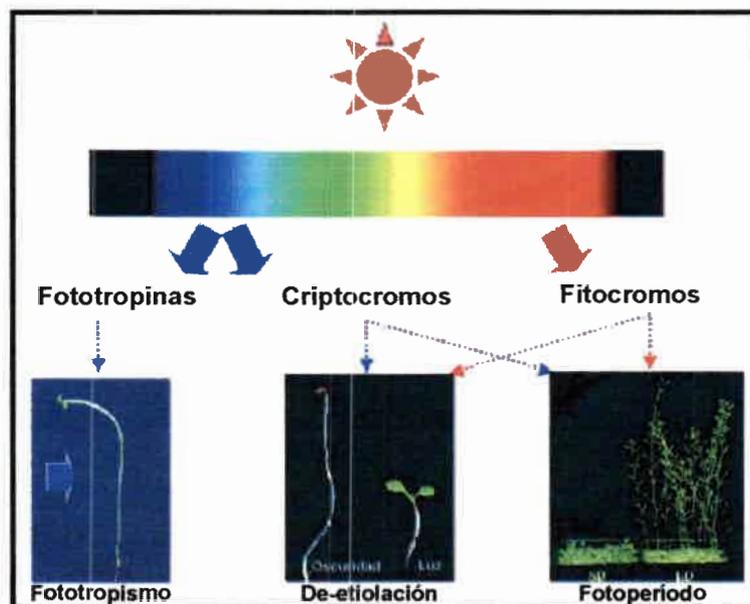


Figura 2. Funciones de los receptores de luz azul (fototropinas y criptocromos) y fitocromos en el fototropismo, fotomorfogénesis y control fotoperiódico de la floración. Las flechas llenas describen las distintas calidades de luz incidentes y las punteadas indican algunas de las respuestas mediadas por los fotorreceptores. Tomado de Lin 2002a.

En todas las plantas estudiadas, los fitocromos son codificados por pequeñas familias multigénicas. En *Arabidopsis thaliana* por ejemplo, existen y se expresan 5 genes de fitocromo distintos (PHYA/B/C/D/E, Mathews y Sharrock 1997), los cuales tienen funciones fotosensoriales y/o fisiológicas parcialmente diferenciadas. En algunos casos, diferentes miembros de la familia sensan distintos parámetros del ambiente lumínico (calidad de luz), pero controlan esencialmente las mismas respuestas fisiológicas. Por ejemplo, mientras el phyB está involucrado en la inhibición del alargamiento del hipocótilo en respuesta a luz roja (Reed *et al.* 1993), el fitocromo A (phyA) es el responsable de la inhibición bajo luz roja lejana continua (Nagatani *et al.* 1993).

Hasta el presente se han realizado muchos esfuerzos para definir la compleja red de señales intracelulares que median entre la información lumínica percibida por los fotorreceptores y una determinada respuesta fotomorfogénica, lo que permite a la planta ajustarse a las condiciones ambientales reinantes. Los avances más importantes provienen, fundamentalmente, de estudios genético-moleculares en *Arabidopsis*, los que han permitido hasta el momento la identificación de numerosos componentes que participarían en la transducción de las señales lumínicas (Figura 3). La mayor parte de estos componentes que han sido clonados tienen localización nuclear, sugiriendo su participación como reguladores de la expresión génica (principalmente a nivel transcripcional, Gyula *et al.* 2003, Quail 2002).

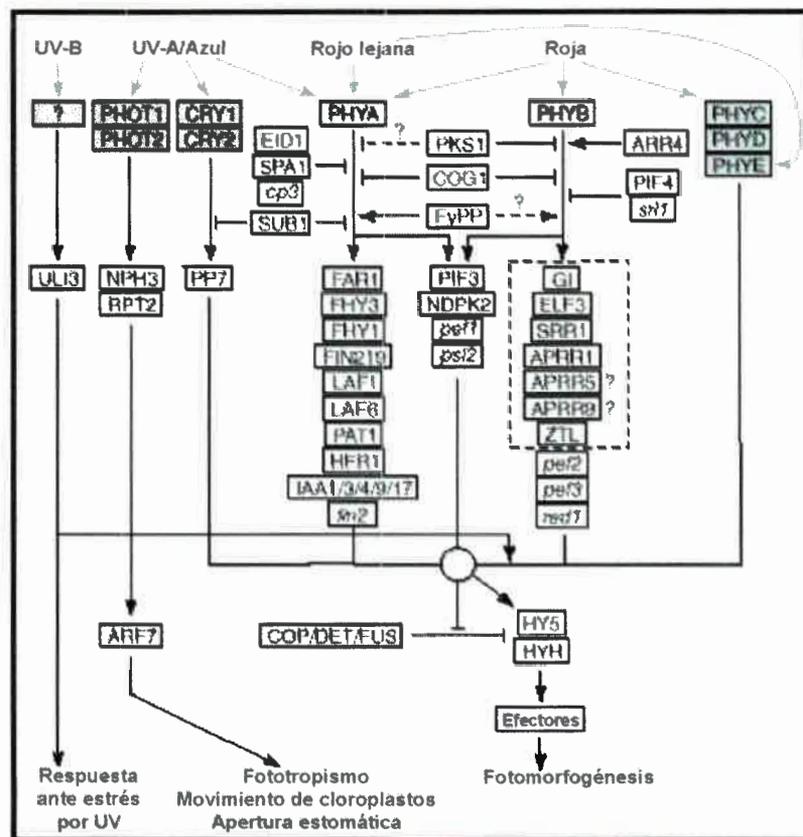


Figura 3. Esquema de la vías de transducción de señales de los fotorreceptores criptocromos, fototropinas, fitocromos y el/los receptor/es de luz UV-B no identificado/s. Las señales lumínicas percibidas por estos receptores se integran en una compleja red regulatoria, formada tanto por vías comunes de señalización, como ramas propias a cada fotorreceptor. Las proteínas (letras mayúsculas) y los genes identificados (letras minúsculas y en cursiva) por estudios genético-moleculares se presentan separados como componentes activadores o inhibidores de la señal. Se postula que la información convergiría en un proceso de integración en, o justo por encima del complejo COP/DET/FUS cuyas proteínas son reguladores negativos de la fotomorfogénesis. Tomado de Gyula *et al.* 2003.

Los mecanismos moleculares de la vía de transducción de la señal de los fitocromos no han sido determinados. En un primer momento se pensó que la transmisión de la señal lumínica desde el citoplasma al núcleo era realizada a través de mensajeros secundarios, que participan en mucha otras vías de transducción, como el cGMP, el Ca^{2+} y/o una cascada de fosforilación dependiente del fitocromo de proteínas regulatorias (Bowler *et al.* 1994). Actualmente se sabe que los fitocromos son transportados desde el citoplasma al núcleo luego de la fotoactivación (Kircher *et al.* 2002), lo que permite suponer que estos fotorreceptores no sólo inducirían en el citoplasma una cascada de señales mediada por mensajeros secundarios, sino que una vez ubicado en el núcleo la forma Pfr (forma activa del fitocromo) interactuaría con factores de transcripción que regulan la expresión de genes inducidos por luz (**Figura 4**, Nagy y Schäfer 2002). Se han identificado algunas proteínas que interactúan directamente con los fitocromos A y B (Gyula *et al.* 2003), entre ellas, PIF3 (phytochrome interacting factor) que es un factor de transcripción del tipo bHLH (basic helix loop helix) que se une a regiones promotoras de varios genes activados por luz. Ello sólo ocurre cuando va unido a la forma Pfr del fitocromo actuando como un regulador positivo de la señal fitocromica (**Figura 4**, Martínez-García *et al.* 2000). Asimismo, el estudio con mutantes de *Arabidopsis* que exhiben respuesta reducida a phyA ha permitido identificar tres genes alelos, *HFR1/REP1/RSF1*, que codifican para un factor del tipo bHLH que puede formar heterodímeros con PIF3. Este heterodímero se une a elementos promotores de varios genes regulados por luz y es probable que interactúe con phyA para inducir la expresión génica (Fairchild *et al.* 2000). Teniendo presente este tipo de regulación, Quail (2002) propuso un modelo de cascada de transducción de las señales lumínicas percibidas por los fitocromos, en el cual estos fotorreceptores estimulan directamente la transcripción de un grupo de proteínas reguladoras de “orden superior”, las cuales serían las responsables del control de otros reguladores; y así esta cascada culmina en *Arabidopsis* en la transcripción de alrededor de 2500 genes regulados por luz.

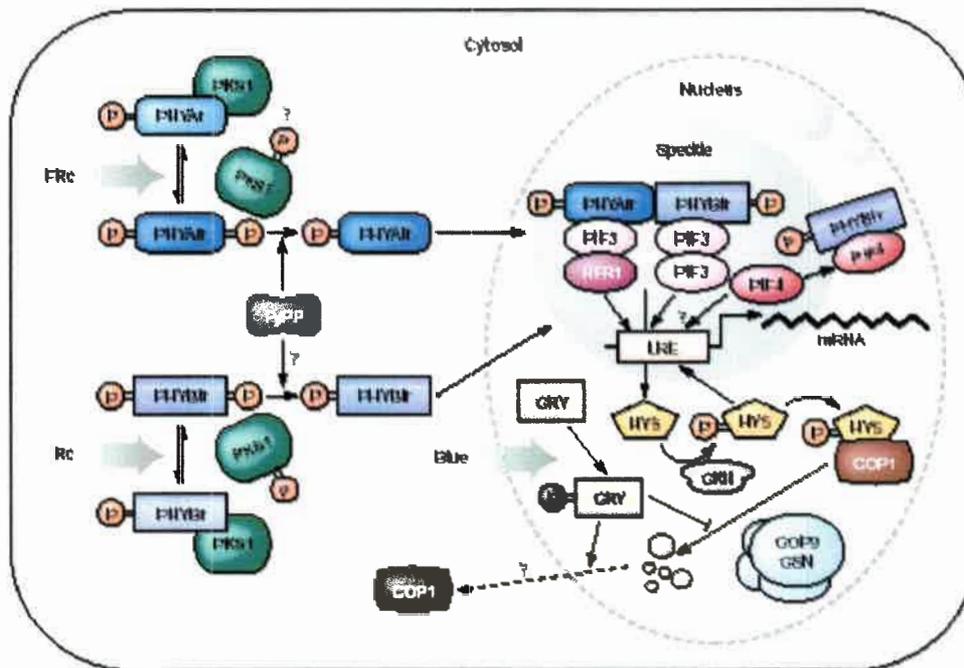


Figura 4. Modelo propuesto para el control de la expresión génica dependiente de los fitocromos (PHYs). Los PHYs tienen localización citoplásmica en oscuridad. Bajo condiciones lumínicas adecuadas, los PHYs son convertidos a su forma activa Pfr y autofosforilados. Los PHYs fosforilan diferentes proteínas en el citosol, tal como PKS1, que podría actuar como un factor de retención citoplásmica y cuya actividad es regulada por fosforilación reversible. La forma activa y fosforilada del PHY podría tener funciones citoplásmicas. La defosforilación de Pfr mediada por una fosfatasa (FyPP) gatillaría el transporte del PHY al núcleo, donde interactuaría directa e indirectamente con factores de transcripción (ej. PIF3, HFR1) que se unen a regiones promotoras (LRE, light-responsive element) de varios genes regulados por luz. Los PHYs estimulan la expresión de varios factores de transcripción, incluyendo HY5, que actúa como un regulador positivo de la fotomorfogénesis. A su vez, la concentración de HY5 depende de la estabilidad proteica. COP1 induce la degradación de HY5 en oscuridad, mientras que en condiciones lumínicas este proceso degradativo es inhibido, en parte, por la acción de los CRYs que posiblemente participan en la exportación de COP1 del núcleo. Blue, luz azul; Frc, luz roja lejana continua; Rc, luz roja. Tomado de Gyula *et al.* 2003.

1.2. *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis es una pequeña hierba anual perteneciente a la familia Brassicaceae. Si bien se conocen varias especies pertenecientes al género *Arabidopsis*, la más conocida y estudiada es *A. thaliana* (L.) Heyhn.

Arabidopsis crece naturalmente en las regiones templadas de todo el mundo, incluyendo Europa, Asia y este de África. También puede encontrarse, como género introducido, en Norte América y Australia. Su hábitat natural incluye preferencialmente suelos

bien drenados, aunque sus escasos requerimientos para crecer la convierten en una planta muy ubicua.

Si bien *Arabidopsis* carece de valor económico (a diferencia de otras especies pertenecientes a la familia Brassicaceae como la mostaza y muchas crucíferas), presenta características especiales que la han convertido en el modelo experimental por excelencia en las investigaciones en biología vegetal, y por ende en una de las especies de plantas más estudiadas. Se caracteriza por tener un crecimiento simple y rápido, un ciclo de vida de alrededor de 5-6 semanas, tamaño pequeño (y por ende es de fácil manipulación) y copiosa producción de semillas. Pero la característica fundamental que hacen a esta planta una herramienta esencial para análisis genético-moleculares es su pequeño genoma, que comparado al de otras especies vegetales, carece de las secuencias altamente repetidas que a menudo complican dichos análisis genómicos. No obstante, estas “cualidades” de *Arabidopsis* no serían suficientes si no se contara además con el rápido desarrollo de nuevas herramientas de biología molecular, que permiten un conocimiento detallado del genoma de la planta. En los últimos años los investigadores han generado una gran variedad de tales herramientas, como son entre otras, los marcadores de ADN para el mapeo genómico, una vasta colección de mutantes y técnicas especializadas de transformación que han permitido concluir el Proyecto Genómico de *A. thaliana*, es decir el conocimiento sistemático del genoma completo de esta especie (secuenciamiento del genoma de *Arabidopsis thaliana*, cromosomas 1-5, Nature 402, Diciembre de 1999; Nature 408, Diciembre de 2000).

I.3. Fotorreceptores de luz azul

El término criptocromo fue inicialmente acuñado por Gressel (1977) para hacer referencia al/los fotorreceptor/es de LA en plantas cuyo espectro de acción, diferente al de los fitocromos, se corresponde con dos picos, uno en la región del UV-A (~320-400 nm), y el otro en la región del azul (~400-500 nm). La elección del término criptocromo provino fundamentalmente del hecho de que las respuestas a LA caracterizadas hasta ese momento en plantas ocurrían principalmente en criptógamas, término de clasificación utilizado anteriormente para separar aquellas plantas sin flores ni semillas verdaderas, que incluían helechos, musgos, algas y hongos. También, por la naturaleza molecular desconocida o

“críptica” (hasta ese momento) de estos receptores de LA. Gressel (1977) asumió la existencia de una familia de fotorreceptores criptocromo que, al igual que fitocromo, serían cromoproteínas relacionadas que compartirían un cromóforo común. Más tarde Ahmad y Cashmore (1993) aislaron el gen *HY4* de *Arabidopsis*, que codifica la proteína del receptor de LA, denominado dos años después por Lin *et al* (1995a) como criptocromo 1 o *cry1*. El descubrimiento de un gen codificante para una proteína estrechamente relacionada a *cry1*, criptocromo 2 o *cry2*, y la caracterización preliminar de su producto proteico (Hoffman *et al.* 1996, Lin *et al.* 1996b), consolidó el uso de la nomenclatura criptocromo en la literatura para referirse a los receptores de luz azul tipo fotoliasas. Asimismo se siguió el estilo de anotación recomendado para los fitocromos (Quail *et al.* 1994); las siglas *cry1* y *cry2* para hacer referencia a la holoproteína, *CRY1* y *CRY2* para la apoproteína, *CRY1* y *CRY2* para el gen silvestre y, finalmente, *cry1* y *cry2* para el gen mutante.

Actualmente, se han identificado en plantas al menos tres tipos de fotorreceptores de luz azul (**Figura 2**). En primer lugar los criptocromos, que actúan muchas veces en asociación con los fitocromos para mediar respuestas fotomorfogénicas tales como inhibición de la elongación del tallo, estimulación de la expansión foliar, control fotoperiódico de la floración, sincronización del reloj circadiano y regulación de la expresión génica en general (Cashmore *et al.* 1999, Lin 2002a). En segundo lugar las fototropinas que median respuestas de movimiento inducidas por luz, las cuales incluyen el fototropismo, el movimiento inducido por luz de los cloroplastos, y la apertura estomática (Briggs y Christie 2002, Lin 2002a). Finalmente, un fotorreceptor de luz azul, *npq1*, el cual media la apertura estomática activada por luz (Frechilla *et al.* 1999, Niyogi *et al.* 1998).

I.3.a. Criptocromos

Los criptocromos están presentes en todo el reino vegetal, incluyendo angiospermas, helechos, musgos y algas (Ahmad y Cashmore 1993, Imaizumi *et al.* 2002, Kanegae y Wada 1998, Perrotta *et al.* 2000, Small *et al.* 1995). En plantas vasculares, la mayor parte de los criptocromos son flavoproteínas de 70-80 KDa con dos dominios reconocibles; un dominio PHR (photolyase-related) N-terminal de unión al cromóforo que comparte homología de secuencia con las fotoliasas (flavoenzimas que catalizan la reparación dependiente de la luz

azul/UV-A del ADN dañado por irradiación UV), y una extensión C-terminal con baja similitud de secuencia al dominio de cualquier otra proteína conocida y que es importante para el tráfico núcleo/citosol del criptocromo e interacciones proteína-proteína (Figura 5, Lin y Shalitin 2003).

Al igual que todas las fotoliasas estudiadas, los criptocromos contienen dos cromóforos. De este modo la holoproteína se une de forma no-covalente a FAD⁻, y posiblemente podría unirse a una pterina (meteniltetrahidrofolato, MTHF) como el segundo cromóforo, al menos para la proteína producida por la expresión de *HY4* (Figura 5, Malhotra et al. 1995, Lin et al. 1995b).

Hasta el momento se han identificado dos genes criptocromo en *Arabidopsis*, *CRY1* y *CRY2* (Ahmad y Cashmore 1993, Lin et al. 1996a y b), cuyos productos presentan un 59% de identidad de secuencia en el dominio PHR, y tan sólo un 13% de identidad en la extensión C-terminal, siendo ésta más corta en *CRY2* (181 aminoácidos en relación al extremo de 123 aminoácidos de *CRY1*, Lin y Shalitin 2003). Aún cuando existen estas diferencias en cuanto a longitud y secuencia aminoacídica en los diferentes criptocromos estudiados, la extensión C-terminal presenta tres motivos conservados: el motivo DQXVP, un corto motivo ácido de 3 a 5 residuos (E o D) y el motivo STATES, por lo cual el segmento fue denominado como dominio DAS (Figura 5). El cual sería importante para la localización celular, interacción intermolecular y funciones fisiológicas diferenciales de estos criptocromos (Lin y Shalitin 2003).

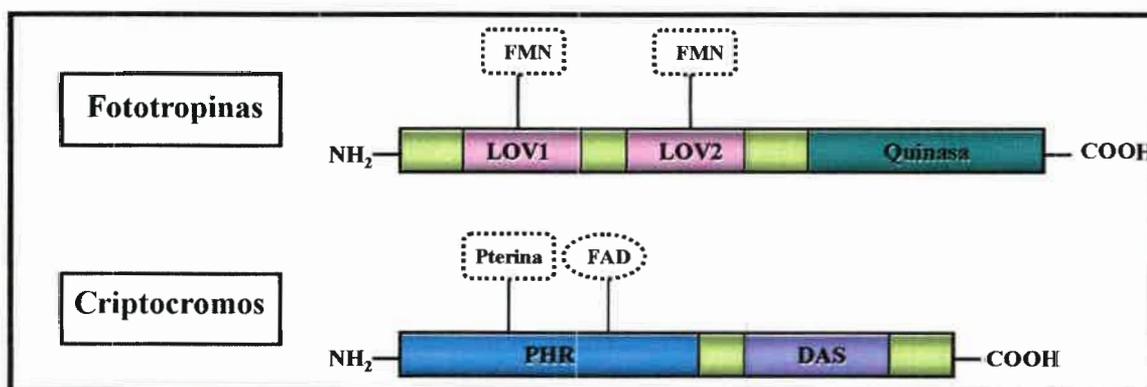


Figura 5. Estructura primaria de los fotorreceptores de luz azul/UV-A. Los receptores Fototropina (luz azul) y Criptocromo (luz azul/UV-A) con sus respectivos dominios y cromóforos. LOV, dominio similar al de proteínas que regulan respuestas a la luz, oxígeno y voltaje; PHR, dominio similar a fotoliasas; DAS, dominio C-terminal involucrado en la localización celular del criptocromo e interacciones proteína-proteína; FMN, mononucleótido flavina; FAD, nucleótido flavin-adenina.

A pesar de la similitud entre los criptocromos y las ADN-fotoliasas en cuanto a secuencia aminoacídica, presencia de cromóforos del mismo tipo y capacidad de absorción de LA, se ha visto que los criptocromos no presentan actividad fotoliasa debido a que la proteína carece de un triptofano específico, conservado en todas las fotoliasas procariotas y que es necesario para la unión de la enzima al ADN dañado (Sancar 2003).

Recientemente se identificó un nuevo miembro de la familia criptocromo denominado cry DASH, por la presencia de ortólogos de éste en *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), *Arabidopsis*, *Synechocystis* sp. y en humanos (*Homo sapiens*, Brudler *et al.* 2003), del cual aún no se conoce la función fisiológica en *Arabidopsis*.

Los receptores cry1 y cry2 de *Arabidopsis* son proteínas solubles de localización nuclear pero, mientras que cry2 es constitutiva de núcleo (Cashmore *et al.* 1999, Guo *et al.* 1999), cry1 se acumula en el núcleo en períodos de oscuridad, y cambia su ubicación al citoplasma en respuesta a la luz (Cashmore *et al.* 1999, Yang *et al.* 2000). Dadas las similitudes entre los criptocromos y las fotoliasas bacterianas, podría esperarse que el dominio PHR de un criptocromo contenga la señal de localización nuclear necesaria para el transporte del receptor al núcleo. Sin embargo, se observó que la extensión C-terminal es suficiente para dirigir el transporte nuclear de ambos criptocromos en *Arabidopsis* (Cutler *et al.* 2000, Guo *et al.* 1999, Wang *et al.* 2001, Yang *et al.* 2000). En este sentido se ha sugerido que el dominio DAS de cry2 contendría una señal de localización nuclear bipartita (Cutler *et al.* 2000, Guo *et al.* 1999). Si bien no se ha encontrado una señal similar en CRY1, su extensión C-terminal sería suficiente para controlar el tráfico núcleo/citoplasma (Wang *et al.* 2001, Yang *et al.* 2000).

La proteína cry1 de *Arabidopsis* se expresa de forma constitutiva e independiente de la luz. Es decir, cry1 se expresa tanto en plántulas de *Arabidopsis* crecidas en oscuridad como en todos los órganos de plantas maduras crecidas en luz (Ahmad y Cashmore 1993), y los niveles proteicos de cry1 en *Arabidopsis* no son afectados por el tratamiento con luz blanca (Lin *et al.* 1996a). Contrariamente a esto, los niveles de cry2 son fuertemente regulados por LA (Ahmad *et al.* 1998a, Guo *et al.* 1999, Lin *et al.* 1998). Se ha visto que la concentración de esta proteína disminuye rápidamente (<1 h) cuando las plántulas etioladas son expuestas a LA, luz verde o UV de alta intensidad. Por otra parte, la tasa de reducción de los niveles proteicos es proporcional a la fluencia lumínica. Mientras que, en altas intensidades de luz se observa una

alta reducción en los niveles proteicos de cry2 luego de tan sólo 1 h de exposición, en bajas intensidades lumínicas los niveles decrecen más lentamente hasta no observarse diferencias en intensidades del orden de $0,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Ahmad *et al.* 1998a). Aparentemente esta degradación sería gatillada por un cambio conformacional dependiente de LA que sufriría el receptor, y en la cual tanto el dominio PHR como la extensión C-terminal parecen ser necesarios (Lin y Shalitin 2003). Si bien aún no se conoce el mecanismo exacto de regulación de los niveles de cry2, estudios recientes han sugerido la participación del aparato general de degradación proteico (ubiquitinación, Lin y Shalitin 2003). Se ha propuesto un modelo para explicar la acción y regulación de cry2 de *Arabidopsis* (Figura 6). De acuerdo a este modelo cry2 se encontraría en una forma inactiva no fosforilada y estable en condiciones de oscuridad. La incidencia de LA y la absorción de fotones por este receptor produciría un cambio conformacional de la molécula de cry2, permitiendo así su fosforilación por quinasas aún no identificadas. El cry2 fosforilado sería activo y gatillarían la transducción de señales que conducen a una determinada respuesta fotomorfogénica (Figura 3). Al mismo tiempo, la fosforilación haría al receptor susceptible de degradación (Lin y Shalitin 2003). Shalitin *et al.* (2003) demostraron que, al igual que cry2, el receptor cry1 de *Arabidopsis* es fosforilado en respuesta a LA y que dicha fosforilación estaría estrechamente relacionada con la función y regulación de este receptor.

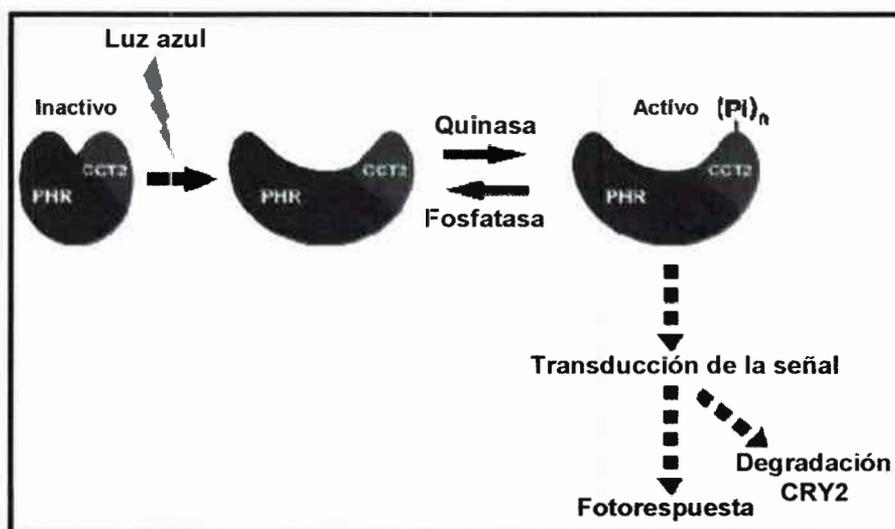


Figura 6. Modelo hipotético para la acción y regulación del receptor de luz azul cry2 de *Arabidopsis*. Tomado de Lin y Shalitin 2003.

Se han propuesto al menos dos formas por las cuales los criptocromos podrían desencadenar una determinada respuesta fotomorfogénica (Lin y Shalitin 2003). El fotorreceptor puede amplificar la señal lumínica por medio de la acción de mensajeros secundarios citosólicos (ej. Ca^{2+} , Guo *et al.* 2001, Long y Jenkins 1998) que alterarían la actividad celular, incluyendo la regulación de la expresión génica. Alternativamente, la presencia del receptor en el núcleo haría posible la interacción directa de éste con un aparato regulador de la transcripción, o aún postranscripcional, afectando así la expresión de genes involucrados en el desarrollo vegetal (Lin 2002a). De modo que se cuenta con evidencias que apoyan la existencia de ambos mecanismos para gatillar las respuestas de de-etiolación mediadas por los criptocromos. Sin embargo, algunos autores reclaman que la regulación de la expresión génica sería el principal mecanismo señal que gobierna la acción de los criptocromos. Experimentos con microarreglos han evidenciado que la LA induce cambios en la expresión de aproximadamente un tercio de los genes de *Arabidopsis*, y que los criptocromos son los principales receptores que median estas alteraciones en los patrones de expresión (Ma *et al.* 2001). Además, se ha visto tanto *in vitro* como *in vivo* que cry1 es fosforilado por phyA, y que, estos dos fotorreceptores interaccionan con la proteína ADO1/ZTL/LKP1, la cual tiene un importante rol en el mecanismo que ajusta el reloj circadiano. A su vez, cry2 interacciona con phyB. Además de interaccionar con los fitocromos, ambas proteínas cry lo hacen con COP1 (una subunidad del complejo de ubiquitinación E3), la cual tiene una función represora de la fotomorfogénesis en oscuridad y muestra un patrón de localización celular similar a cry1 (Lin 2002a, Gyula *et al.* 2003).

I.3.b. Fototropinas

En plantas vasculares, tanto la dirección de LA como su intensidad son captadas por distintos fotorreceptores responsables de mediar respuestas como el fototropismo del hipocótilo y el movimiento celular de los cloroplastos, procesos que optimizan la captura de luz para la fotosíntesis.

Gallagher *et al.* (1988) fueron los primeros en descubrir la capacidad de LA de activar la fosforilación de una proteína de membrana plasmática en plántulas etioladas de arveja. Esta proteína parece ser ubicua en plantas vasculares, con un tamaño que oscila entre los 114 a 130

KDa, dependiendo de la especie (Short y Briggs 1994). Estudios realizados con mutantes de *Arabidopsis* (Liscum y Briggs 1995), han aportado evidencia directa sobre la participación de esta fosfoproteína en el fototropismo. Mutantes nulos para una respuesta fototrópica no mostraron fosforilación inducida por LA, comprobándose además la pérdida total de dicha proteína de membrana. Al locus mutante se lo llamó *nph1* (non-phototropic hypocotyl), proponiéndose su participación como receptor del fototropismo.

Si bien hasta ese momento los estudios realizados mostraban a la proteína *nph1* como un receptor con actividad quinasa capaz de mediar su propia fosforilación (Short y Briggs 1994), existía la posibilidad de que estas funciones pudieran ser cumplidas por dos (o aún tres) diferentes polipéptidos. La clonación y secuenciación del gen *NPH1* de *Arabidopsis* (Huala *et al.* 1997) determinó finalmente que la naturaleza de este fotorreceptor es de tipo serina-treonina quinasa. Christie *et al.* (1998) reafirmaron la función de esta proteína como fotorreceptor al demostrar que *nph1* expresado en células de insectos incubadas en oscuridad exhibían fosforilación activada por LA con la misma dependencia de fluencia y cinética que la proteína nativa de *Arabidopsis*.

El receptor del fototropismo *nph1*, designado actualmente *phot1*, media tanto el fototropismo de la raíz como del hipocótilo en respuesta a LA unilateral de baja tasa de fluencia ($<1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). *Phot1* es una proteína asociada a membrana de 120 KDa que contiene un dominio serina-treonina quinasa en su extremo C-terminal y dos dominios repetidos del tipo LOV (debido a que este dominio se presenta en proteínas que regulan respuestas a la luz, oxígeno y voltaje, Taylor y Zhulin 1999) en su extremo N-terminal (**Figura 5**). Cada uno de estos dominios LOV se une no-covalentemente a mononucleótidos de flavina (FMN) como cromóforo (Christie *et al.* 1999), apoyando el modelo de 2-cromóforos propuesto por Liscum y Briggs (1995, **Figura 5**). La irradiación con LA induce la formación de una unión estable entre el cromóforo FMN y el residuo cisteína conservado en los dominios LOV (condición que se revierte con un tratamiento de oscuridad), dando lugar a un cambio conformacional de la apoproteína que conduce a la autofosforilación del dominio quinasa y así a la activación del receptor *phot1* que inicia la transducción de la señal (Sakai *et al.* 2001).

En la actualidad se sabe que la respuesta fototrópica en *Arabidopsis* involucra dos fotorreceptores (Sakai *et al.* 2001). Al parecer la proteína codificada por el gen *NPH1* mediaría el fototropismo en respuesta a pulsos de luz blanca o LA tanto de alta como baja

intensidad, mientras que la proteína codificada por el gen *NPL1* (designado *PHOT2*) sería activa sólo a altas tasas de fluencia de LA continua. Además de su participación en el fototropismo, los receptores *phot1* y *phot2* están involucrados en otras respuestas inducidas por LA, como son la apertura estomática (Kinoshita *et al.* 2001) y el movimiento de los cloroplastos dependiente de la tasa de fluencia de LA (Sakai *et al.* 2001).

En la actualidad se sabe que los posibles sustratos de las fototropinas activadas serían, la proteína NPH3 (NON PHOTOTROPIC HYPOCOTYL3, mostró interacción positiva con *phot1* en un ensayo de doble híbrido en levaduras; Motchoulski y Liscum 1999, Sakai *et al.* 2000), y la proteína RPT2 (ROOT PHOTOTROPISM2, Inada *et al.* 2004). El gen correspondiente a ésta última se aisló a partir de plantas mutantes *rpt2*, las cuales tienen alterado el fototropismo del hipocótilo (Sakai *et al.* 2000). Tanto NPH3 como RPT2 poseen un dominio BTB/POZ en el extremo N-terminal y uno coil-coil en el extremo C-terminal, los que estarían involucrados en interacciones proteína-proteína (Motchoulski y Liscum 1999, Sakai *et al.* 2000). Un componente final de la transducción de la señal de fototropinas parece ser el factor de transcripción NPH4/ARF7, involucrado en la respuesta a auxinas, cuya expresión es regulada por auxinas. El gen correspondiente a dicho factor fue aislado a partir de plantas mutantes *nph4*, las cuales son deficientes en la respuesta fototrópica inducida por luz, lo que muestra la relación entre la señal de estos fotorreceptores con la señal de las auxinas (**Figura 3**, Lin 2002b, Gyula *et al.* 2003).

1.3.c. Receptor *npq1*

Entre las respuestas inducidas por la LA, las que han sido más estudiadas son: el fototropismo, la inhibición de la elongación del hipocótilo y el movimiento estomático. Desde hace dos décadas se conoce que pulsos de LA inducen la apertura estomática a través de la excitación de un fotorreceptor independiente de la acción de fitocromos y pigmentos fotosintéticos (Iino *et al.* 1985, Zeiger y Zhu 1998). Mediante estudios realizados utilizando protoplastos de células guardianas se demostró que el aumento de turgencia en respuesta a LA estaría mediado por un receptor específico localizado únicamente en dichas células, aunque la naturaleza de dicho fotorreceptor era desconocida (Zeiger y Hepler 1977). Años después se encontró que el caroteno zeaxantina actúa como un fotorreceptor de LA en células guardianas

(Quiñónez *et al.* 1996, Srivastava y Zeiger 1995). El espectro de absorción de este caroteno es muy similar al espectro de acción encontrado para la apertura estomática inducida por LA, y el contenido de zeaxantina en las células guardianas está linealmente relacionado a su sensibilidad a LA.

Niyogi *et al.* (1998) aislaron y caracterizaron un mutante de *Arabidopsis*, *npq1* (non-photochemical quenching), incapaz de acumular zeaxantina debido a la pérdida de la enzima violaxantina de-epoxidasa que cataliza la conversión de violaxantina a zeaxantina. Frechilla *et al.* (1999) probaron la respuesta de apertura estomática inducida por LA en plántulas silvestres y mutantes *npq1*, analizando además, el contenido de zeaxantina de células guardianas en ambos genotipos. Los resultados mostraron que los estomas de *npq1* son incapaces de acumular zeaxantina y por ende carecen de una de las respuestas específicas inducidas por la LA, apertura estomática. Estos experimentos apoyan la hipótesis que la zeaxantina actuaría como el cromóforo de un fotorreceptor que media la respuesta rápida y reversible de apertura estomática inducida por LA (Frechilla *et al.* 1999, Frechilla *et al.* 2000).

1.4. Receptores de luz azul y elongación del hipocótilo

La LA actúa sobre el control de numerosos aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal, en la regulación de procesos como la elongación del hipocótilo, expansión de los cotiledones, curvatura fototrópica del tallo, apertura estomática, inducción de la floración, ritmo circadiano y regulación de la expresión génica (Lin 2002a y b). Una de las respuestas inducidas por LA ampliamente estudiada es la inhibición del crecimiento del tallo. Se sabe que ésta es mediada por fotorreceptores que absorben específicamente LA y son relativamente insensibles a otras longitudes de onda. En *A. thaliana*, dos familias distintas de receptores de LA integradas por criptocromos (*cry1* y *cry2*) y la fototropina (*phot1*), respectivamente, son quienes median principalmente la respuesta de inhibición del crecimiento inducida por la LA y UV-A (Ahmad *et al.* 2002, Briggs y Christie 2002). Si bien *cry1* y *cry2* median independientemente respuestas específicas en la planta, trabajos recientes demuestran la existencia de interacciones tanto físicas como bioquímicas entre estos receptores de LA y la familia de fotorreceptores fitocromo, en el control de la fotomorfogénesis y ritmo circadiano (Ahmad *et al.* 1998a, Devlin y Kay 2000, Casal 2000, Jarillo *et al.* 2001, Mas *et al.* 2000).

La LA inhibe rápida y marcadamente la elongación del hipocótilo de plántulas etioladas (Laskowski y Briggs 1989, Spalding y Cosgrove 1989). Mediante el uso de técnicas de alta resolución en la medición del crecimiento se reveló que la LA de alta intensidad inhibe el crecimiento del hipocótilo de *Arabidopsis* luego de tan sólo 30 s a partir del comienzo de la irradiación (Parks *et al.* 1998). Los valores de tasa de crecimiento del hipocótilo se aproximan a cero dentro de los primeros 30 min de LA, y esta inhibición persiste durante más de 40 h de exposición a LA continua. Mediante mediciones tempranas de cinética de crecimiento se demostró que mutantes *cry1* presentan una respuesta normal de inhibición del crecimiento del hipocótilo durante los primeros 30 min de LA. Sin embargo, estos mutantes tiene la capacidad de escapar de esta inhibición y luego de 60 min de exposición a LA, estas plántulas presentan la misma tasa de crecimiento que aquellas crecidas en oscuridad (Folta y Spalding 2001a, Parks *et al.* 1998). El receptor *phot1* que media la respuesta fototrópica de tallo y raíz en respuesta a LA unilateral de baja intensidad (Briggs y Christie 2002, Liscum y Briggs 1995), sería el receptor principalmente responsable en mediar la fase inicial rápida de inhibición del crecimiento durante los primeros 30 min de LA (Folta y Spalding 2001a). Mediciones de cinética de crecimiento del hipocótilo de los mutantes *cry1* y *cry2* demostraron que ambos presentan una disminución similar de la tasa de crecimiento entre los 30 y 60 min de LA, lo que sugiere que tanto *cry1* como *cry2* serían igualmente importantes en el inicio de la respuesta inhibitoria luego de 30 min de exposición a LA, es decir en el comienzo de la “fase criptocromo” (Folta y Spalding 2001a). Sin embargo, la participación del receptor *cry2* en esta fase criptocromo es transitoria, posiblemente debido a la inestabilidad de la proteína de este fotorreceptor bajo LA (Ahmad *et al.* 1998b, Lin *et al.* 1998). Finalmente, un mecanismo dependiente de *cry1* sería el responsable del control del crecimiento del hipocótilo en LA.

A pesar de los muchos estudios de la respuesta de inhibición del crecimiento inducida por LA, poco se conoce sobre los mecanismos por los cuales los receptores criptocromo regulan los cambios en el crecimiento del tallo. En estudios farmacológicos y electrofisiológicos realizados con plántulas de *Arabidopsis* se demostró que la activación de canales aniónicos (que depolariza transitoriamente la membrana plasmática) dentro de segundos de exposición a LA (Cho y Spalding 1996), tiene un papel importante en la transducción de señales tempranas desencadenadas por los criptocromos y la fototropina que median la fase inicial de inhibición del crecimiento controlada por *cry1/cry2/phot1* (Folta y

Spalding 2001a, Parks *et al.* 1998, Spalding 2000). Se ha visto que el fitocromo A (phyA) participa tempranamente (durante los primeros s de irradiación con LA) en la activación de canales aniónicos de la membrana; sin embargo, dicha contribución sería sólo transitoria y no persistiría más allá de las 2 h de LA (Folta y Spalding 2001b). Una interpretación de esto sería que los receptores cry1 y cry2 funcionan junto con phyA en la activación de canales aniónicos dependiente de LA, como parte de un mecanismo que controla la tasa de elongación del hipocótilo aproximadamente durante las primeras 2 h de exposición a LA. De este modo, la rápida activación de canales aniónicos es una respuesta necesaria para el comienzo pero no para el mantenimiento de la inhibición del crecimiento, al parecer un mecanismo independiente de cry2, phyA y canales aniónicos sería responsable de la fase del crecimiento dependiente de cry1 (Folta y Spalding 2001b). Cambios en la expresión de genes involucrados en el crecimiento y/o variación de los niveles hormonales endógenos y la sensibilidad de los tejidos a estos reguladores, podrían ser hipotetizados como responsables de mantener la respuesta de inhibición del crecimiento del hipocótilo.

Se ha encontrado que el factor de transcripción HY5 es un componente positivo de la respuesta fotomorfogénica de de-etiolación. Dicho factor se une a promotores de genes inducibles por luz y los niveles de proteína HY5 permanecen bajos en oscuridad y aumentan notoriamente con la luz (**Figura 4**). En oscuridad, dicho factor interactúa directamente con COP1 en el núcleo y esta interacción produciría la señal (mediante la conjugación de residuos de ubiquitina) para que el factor HY5 sea degradado, con la subsecuente inhibición de la expresión de los genes inducidos por luz y por ende el desarrollo etiolado de la planta. La exposición a la luz azul reduce la abundancia nuclear de COP1, y presumiblemente, es la causa de disminución de la tasa de degradación de HY5, que activa la transcripción de genes requeridos para la fotomorfogénesis. El mecanismo por el cual la luz modifica la concentración de COP1 en núcleo no se conoce pero, la interacción entre las proteínas CRY con COP1 da indicios que estos fotorreceptores pueden ejercer esta acción (**Figura 4**, Lin y Shalitin 2003, Quail 2002)

1.5. Fitohormonas

Los cinco grupos “clásicos” de fitohormonas comprenden auxinas, giberelinas, ácido abscísico, citocininas y etileno (Davies 1995, Kende y Zeevart 1997). Actualmente también se consideran como fitohormonas otros compuestos, tales como sistemina, brasinoesteroides, jasmonatos, ácido salicílico y poliaminas, cuyos cambios en la concentración y sensibilidad de los tejidos median un amplio rango de procesos del crecimiento y desarrollo vegetal, muchos de los cuales involucra una interacción con factores ambientales (Clouse y Sasse 1998, Creelmand y Mullet 1997a y b, Crozier *et al.* 2000, Smith 1990). Cabe destacarse que cada hormona no sólo influye en las respuestas de muchas partes de la planta, sino que dichas respuestas dependen de la especie, parte del vegetal, estado de desarrollo, concentración hormonal e interacciones con otras hormonas.

1.6. Giberelinas

Las giberelinas (GAs) constituyen una amplia familia de diterpenos tetracíclicos, que regulan numerosos procesos del crecimiento y desarrollo a lo largo de la ontogenia de la planta. Si bien la respuesta más estudiada en numerosas especies vegetales es la promoción de la elongación del tallo, la utilización de mutantes deficientes en GAs, así como el uso de inhibidores químicos de las enzimas de su ruta de síntesis, han permitido el estudio de la participación de estos reguladores en casi todos los estados de desarrollo de la planta desde la germinación, pasando por la expansión foliar, elongación de tallos y pecíolos, iniciación de la floración, y el desarrollo de flores y frutos (Davies 1995). Además, numerosos estudios indican que determinadas señales ambientales, tales como calidad de luz, intensidad lumínica, fotoperíodo y temperatura pueden afectar el crecimiento y desarrollo vegetal, regulando la concentración y/o afectando la sensibilidad de los tejidos de la planta a las GAs (Clúa *et al.* 1996, Davies 1995, Kamiya y García-Martínez 1999, Pharis y King 1985, Volmaro *et al.* 1998).

Hasta la fecha se han identificado 136 GAs, caracterizadas a partir de plantas superiores, hongos y bacterias (Bottini *et al.* 2004, Hedden y Phillips 2000, MacMillan 2002); de las cuales sólo tres, GA₁, GA₃ y GA₄ (**Figura 7**) tienen actividad biológica demostrada en

plantas superiores, mediante el uso de mutantes deficientes en la síntesis y respuesta a estas hormonas. El resto de los compuestos pueden ser tanto precursores como formas terminales (inactivas) de estas GAs (Hedden 1999, Hedden y Phillips 2000), aunque es presumible por sus características moleculares que otras C19 3 β hidroxigalinas como GA₇, GA₃₂, etc, puedan también tener actividad *per se* sobre alargamiento caulinar (Bottini *et al.* 2004).

Desde el punto de vista estructural las GAs se dividen en dos grandes grupos (**Figura 7**); aquellas con un esqueleto pentacíclico de 19 átomos de carbono (GAs-C19), las cuales incluyen en la mayoría de los casos un puente γ -lactona en el anillo A (C-19,10; ej. GA₉), y las GAs con un esqueleto de 20 átomos de carbono (GAs-C20). En el caso de las GAs-C20, el carbono de posición 20' puede estar presente como un metilo (ej. GA₁₂), como un grupo carboxilo (ej. GA₂₅, que es una GA "terminal" sin actividad biológica conocida), una función aldehído (ej. GA₂₄), o estar incluido en un puente lactona entre los C-19,20 (ej. GA₁₅).

Todas las GAs son ácidos carboxílicos caracterizados por la presencia de un grupo carboxilo en el carbono 7, una doble ligadura en el anillo D; pudiendo además estar carboxiladas en el C-18 o C-19 (**Figura 7**). La molécula puede presentar además modificaciones adicionales mediante la presencia de uno, dos, tres o cuatro grupos hidroxilos ubicados en diferentes átomos de carbono (C-1, -2, -3, -11, -12, -13, -15, -16, -17 o -18; Pearce *et al.* 1994).

Las características estructurales indispensables que determinan que una GA tenga actividad biológica *per se* son; un esqueleto de 19 átomos de carbono, la presencia de un grupo hidroxilo en posición 3 β y que no posea un grupo hidroxilo en posición 2 β (**Figura 7**). Más allá de estas características generales, los requerimientos estructurales de las moléculas de GAs difieren según la respuesta biológica que ellas regulan. Mientras que las GAs que promueven el crecimiento vegetativo se caracterizan por ser GAs-C19 con un puente γ -lactona entre los C-19,10; con un grupo carboxilo en posición C-6 β y un grupo hidroxilo en posición C-3 β (Serebryakov *et al.* 1984), las GAs que inducen floración presentan, además de las características descritas, una doble ligadura entre C-1,2 o C-2,3 y poseen múltiples grupos hidroxilos en los anillos C y D de la molécula (Evans *et al.* 1994).

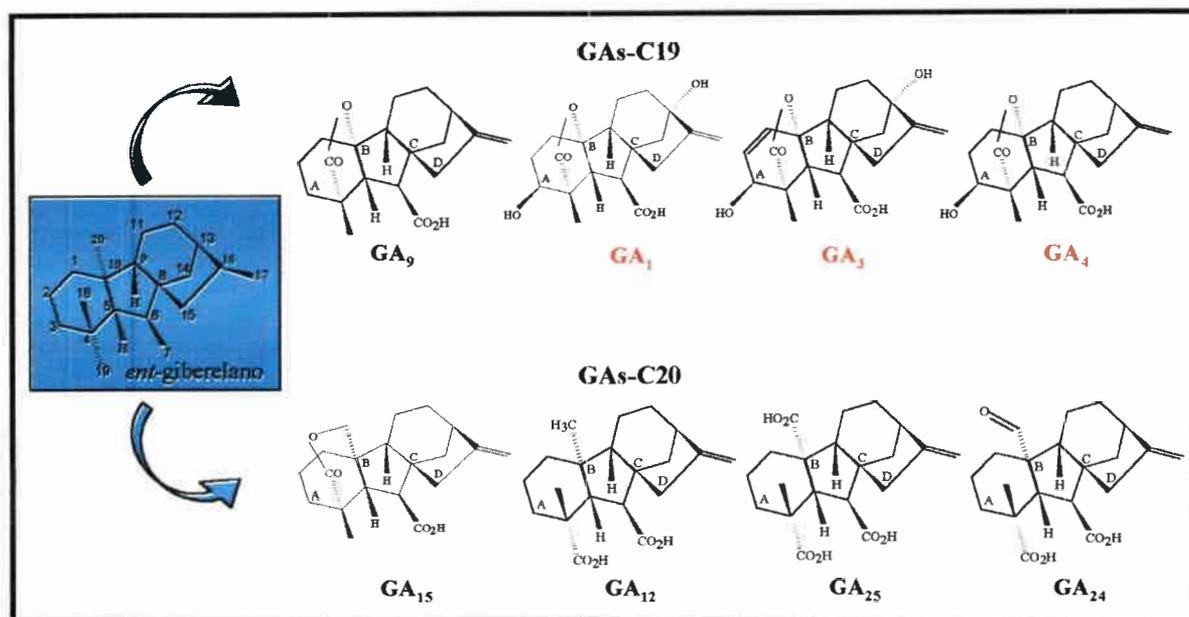


Figura 7. Estructura química de las GAs de 19 (GAs-C19) y 20 (GAs-C20) átomos de carbono. Comparación con la estructura química del esqueleto *ent*-gibberelano. En rojo se muestran aquellas GAs con actividad biológica.

I.6.a. Biosíntesis

I.6.a.i. Formación de *ent*-kaureno

La compleja ruta de síntesis de GAs se caracterizó primeramente en el hongo *Gibberella fujikuroi* y posteriormente en plantas superiores. Gran parte de los progresos alcanzados en la identificación y caracterización de enzimas y genes reguladores de los distintos pasos metabólicos que conducen a la formación de las GAs bioactivas en plantas, se han logrado gracias al uso de *Arabidopsis* como sistema vegetal modelo. En los últimos años, la disponibilidad de mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la biosíntesis o respuesta a las GAs, ha permitido la identificación de la mayor parte de los genes que codifican las enzimas involucradas tanto en la vía de síntesis de GAs (excepto la GA 13-hidroxilasa, GA13ox); así como también, de los pasos iniciales en el catabolismo de estas hormonas (Olszewski *et al.* 2002). Recientemente Tudzynski *et al.* (2003) completaron la identificación y caracterización en *G.fujikuroi* de los genes responsables de regular los dos últimos pasos metabólicos en la ruta de síntesis de GA₃: el gen *DES* que codifica una GA-desaturasa que convierte GA₄ en

GA₇, y el gen *P450-3* que codifica una GA 13-hidroxilasa que cataliza la conversión final de GA₇ en GA₃, definiendo así completamente la ruta de síntesis de GA₃ en el hongo.

Los principales pasos metabólicos que conducen a la síntesis de las GAs bioactivas para el crecimiento y desarrollo vegetativo en *Arabidopsis*, GA₁ y GA₄, se muestran en la **Figura 8**. Los primeros de estos pasos, desde *trans*-geranilgeranil difosfato (GGPP) a GA₁₂-aldehído, son comunes a todos los sistemas estudiados. El GGPP es convertido vía *ent*-copalil difosfato (CPP) al hidrocarbano tetracíclico *ent*-kaureno, el cual es luego modificado por oxidaciones sucesivas en los C-19, C-7 y C-6 para dar como resultado GA₁₂-aldehído. En plantas, la formación de *ent*-kaureno a partir de GGPP ocurre en plástidos y requiere la participación de dos diterpeno ciclasas; la *ent*-copalil difosfato sintasa (CPS), que cataliza la ciclización del GGPP mediante la protonación de la doble ligadura entre los C-14,15 y la *ent*-kaureno sintasa (KS), que mediante la ionización del grupo difosfato del CPP da como resultado *ent*-kaureno. En la mayoría de las especies vegetales examinadas, se ha observado que ambas ciclasas serían codificadas por genes únicos cuya expresión no sería regulada en respuesta a las GAs endógenas (Hedden y Phillips 2000).

La síntesis de isopentenil pirofosfato (IPP), a partir del cual se forma el geranilgeranil difosfato (GGPP) destinado a la biosíntesis de isoprenoides en plantas, ocurre por medio de dos rutas: la vía clásica del mevalonato que se lleva a cabo en el citosol y la ruta deoxyxylulosa fosfato (DOXP) en plástidos (**Figura 9**, Lichtenthaler 1999, Sponsel 2002). Estas vías no parecen ser totalmente autónomas ya que habría un cierto intercambio metabólico entre ambas. La vía DOXP, recientemente descrita, involucra la transferencia de una unidad C₂ proveniente del mevalonato a gliceraldehído-3-fosfato para dar 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfato, que es convertido en IPP por reacciones que incluyen rearrreglos intramoleculares (Lichtenthaler 1999). La ruta del mevalonato produce sesquiterpenos, triterpenos y esteroides en el citosol, mientras que la vía deoxyxylulosa fosfato da origen a carotenoides, al residuo fitol de la clorofila, plastoquinona-9, monoterpenos y diterpenos (**Figura 9**). No se cuenta aún con información concluyente sobre el origen bioquímico de las GAs, sin embargo hay fuertes evidencias que indicarían que estas hormonas son sintetizadas a partir del IPP derivado de la ruta DOXP. Si bien muchos de los pasos enzimáticos de la ruta DOXP han sido caracterizados tanto en plantas como bacterias y los genes correspondientes clonados, se desconoce aún las reacciones finales que conducen a la formación de IPP y

dimetilalil-pirofosfato (DMAPP), los cuales son sustrato para las enzimas de síntesis de isoprenoides (**Figura 9**).

I.6.a.ii. Formación de GA₁₂-aldehído

GA₁₂-aldehído se forma como resultado de tres reacciones sucesivas de oxidación del *ent*-kaureno, catalizadas por monooxigenasas dependientes del citocromo P450 y asociadas a membrana; la *ent*-kaureno oxidasa (KO), que cataliza la oxidación del C-19, dando como resultado el ácido *ent*-kaurenoico, la ácido *ent*-kaurenoico oxidasa (KAO), que conduce a la formación del ácido 7 α -hidroxi-*ent*-kaurenoico, mediante la hidroxilación en posición 7 β , y finalmente la GA₁₂-aldehído sintasa, que cataliza la oxidación del C-6 β dando como producto GA₁₂-aldehído (**Figura 8**). Estas reacciones de oxidación ocurren fuera del plástido y requieren del transporte de *ent*-kaureno desde la organela a través de un mecanismo aún desconocido (Yamaguchi *et al.* 2001). Finalmente, la oxidación del C-7 de GA₁₂-aldehído da como producto GA₁₂, el cual es convertido a GA₅₃ por 13-hidroxilación (Hedden 1999, Hedden y Phillips 2000, Olszewski *et al.* 2002, Phillips 1998). Si bien este último paso es catalizado por una monooxigenasa, aún no se ha identificado el gen que codifica esta GA 13-oxidasa.

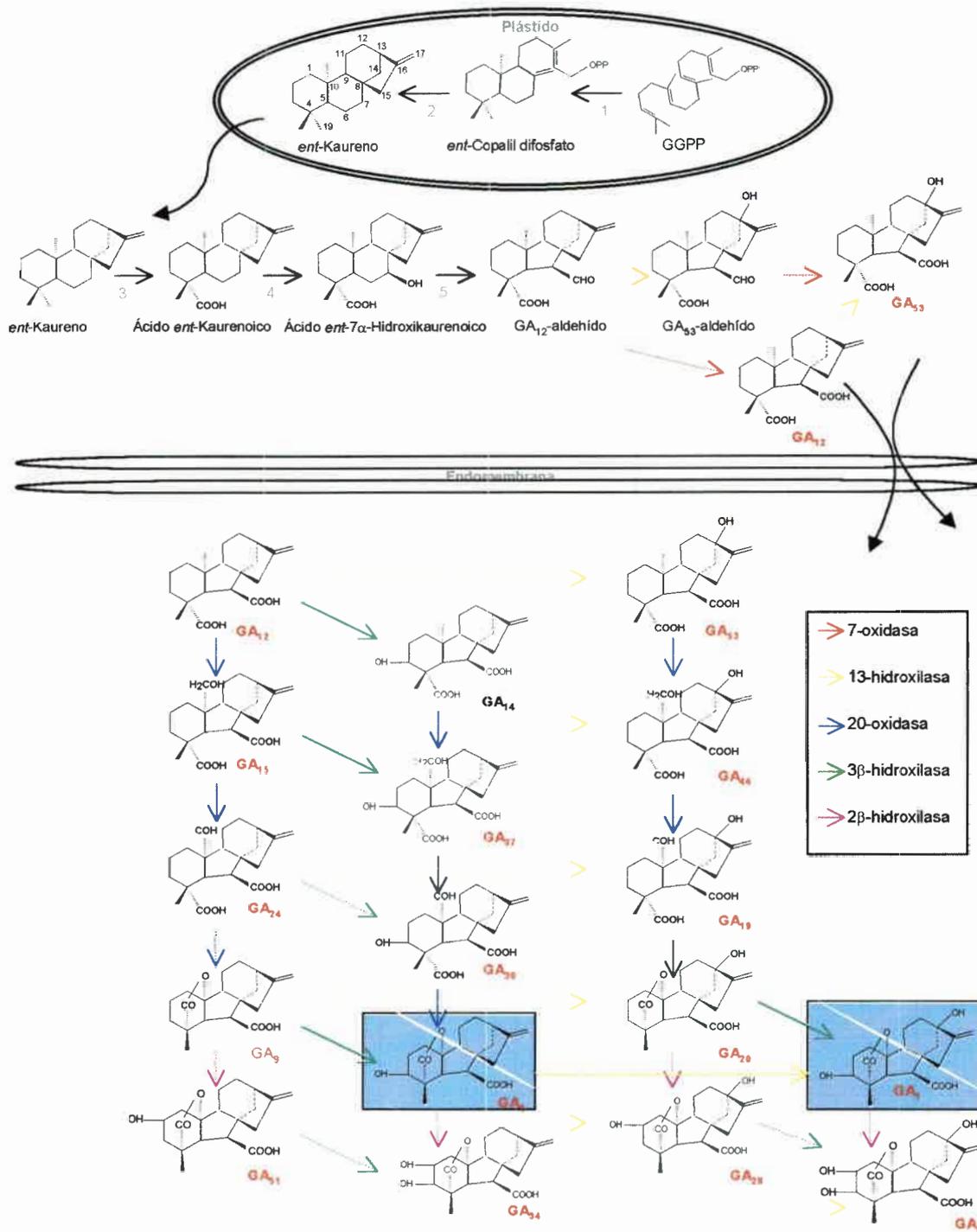


Figura 8. Ruta biosintética de GAs en *Arabidopsis*, mostrando la compartimentalización subcelular entre plástidos, endomembrana y citoplasma. Las flechas llenas, representan los pasos catalíticos demostrados *in vivo* o *in vitro* con enzimas recombinantes, mientras que las conversiones que no han sido demostradas en *Arabidopsis*, están conectadas por flechas punteadas. El color de cada flecha denota la actividad enzimática involucrada en cada paso metabólico. Las enzimas que catalizan las diferentes reacciones son: (1) *ent*-copalil difosfato sintasa, (2) *ent*-kaureno sintasa, (3) *ent*-kaureno oxidasa, (4) ácido *ent*-kaureno oxidasa, (5) GA₁₂-aldehído sintasa, (6) GA 7-oxidasa (GA7ox), (7) GA 13-hidroxilasa (GA13ox), (8) GA 20-oxidasa (GA20ox), (9) GA 3 β -hidroxilasa (GA3ox), (10) GA 2-oxidasa (GA2ox). Las tres rutas mostradas en la figura son, de izquierda a derecha: ruta 3 β , 13-hidroxilativa tardía, ruta 3 β -hidroxilativa temprana y la ruta 13-hidroxilativa temprana. Las GAs bioactivas en *Arabidopsis* (GA₁ y GA₄) están recuadradas en celeste. Tomado de Phillips 1998, Hedden y Phillips 2000, con modificaciones.

I.6.a.iii. Formación de GAs activas

Los productos intermediarios GA₁₂ y GA₅₃ constituyen el sustrato de las reacciones finales de oxidación de la ruta biosintética de GAs (**Figura 8**). En plantas estas reacciones son catalizadas por dioxigenasas solubles dependientes del 2-oxoglutarato; mientras que en hongos las enzimas que catalizan las reacciones finales de oxidación de GAs son citocromo P450 monoxigenasas (Tudzynski *et al.* 2003). Las GA 20-oxidases (GA20ox) catalizan la formación de GA₉ y GA₂₀, a partir de la oxidación del C-20 de la GA₁₂ y GA₅₃, respectivamente, a un grupo aldehído con la subsecuente pérdida de este átomo de C como CO₂ y la formación de un puente γ -19,10 lactona; característico de las GAs de 19 átomos de C. Las GAs activas GA₄ y GA₁, se forman a partir de los precursores GA₉ y GA₂₀, respectivamente, por la acción de GA 3 β -hidroxilasas (GA3ox). En algunas especies, diferentes a *Arabidopsis*, la GA₉ y GA₂₀ dan como producto de reacción otras GAs bioactivas como la GA₇ (ej. *Marah macrocarpus*, MacMillan *et al.* 1997) y GA₃ (ej. *Zea mays*, Fujioka *et al.* 1990 y *Prunus armeniaca*, Bottini *et al.* 1987), respectivamente, vía GA₉₅ (2,3-didehidroGA₉) y GA₅, probablemente como resultado de reacciones colaterales de actividad GA3ox.

Tanto hongos como bacterias son capaces de producir formas “activas” de GAs. En este sentido se ha visto que diferentes especies fúngicas, tales como *G. fujikuroi*, y pertenecientes a los géneros *Phaeosphaeria* y *Sphaceloma*, entre otros, producen diferencialmente GA₁, GA₃ y GA₄ (Hedden 2002). De forma similar, se logró identificar en cultivos químicamente definidos de *Rhizobium* sp. (Atzorn *et al.* 1988), *Azospirillum* sp. (Bottini *et al.* 1989, Jansen *et al.* 1992), *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* (Bastián *et al.* 1998) y *Bacillus* sp. (Gutiérrez-Manero *et al.* 2001), la producción diferencial de GA₁, GA₃ y GA₄. Sin embargo, a diferencia de las respuestas fisiológicas en las cuales se sabe participan estas formas activas de GAs en plantas, no se conoce aún su rol en hongos y bacterias. Se piensa que estos compuestos, productos del metabolismo secundario, podrían actuar como factores de señalización en su interacción con la planta (Bottini *et al.* 2004).

Como se mencionó anteriormente, los primeros pasos metabólicos que conducen a la formación del precursor GA₁₂-aldehído, son comunes en la síntesis de GAs de plantas y hongos. En estos últimos, la biosíntesis de estas hormonas difiere a la de plantas a tres niveles fundamentales: i) químico (ruta de síntesis), ii) bioquímico (enzimas involucradas) y iii) génico (Hedden *et al.* 2002) y bacterias (Bottini *et al.* 2004).

La principal diferencia a nivel de la ruta de síntesis de GAs entre *G. fujikuroi* y plantas, es la etapa en la cual ocurren las reacciones oxidativas mediante la adición de grupos hidroxilo (Hedden *et al.* 2002). Mientras que en plantas, la 3β- y 13β-hidroxilación pueden ocurrir tanto en los primeros pasos como tardíamente en la síntesis de GAs activas, en hongos, en cambio, estas reacciones oxidativas ocurren sólo tempranamente para el caso de la 3β-hidroxilación (GA₁₂-aldehído es 13β-hidroxilado a GA₁₄-aldehído, que luego se oxida en el C-7 para dar GA₁₄), y en los últimos pasos de la síntesis, para la 13β-hidroxilación. Otra importante diferencia, confirmada a nivel génico (Rojas *et al.* 2001, Tudzynski *et al.* 2002 y 2003), es que los pasos 20-oxidativos y la 3β-hidroxilación temprana en hongos son catalizadas por monooxigenasas dependientes del citocromo P450, mientras que en plantas, son dioxigenasas solubles las responsables de mediar estas reacciones (Hedden *et al.* 2002).

El descubrimiento de la producción de GAs en bacterias constituye un hecho relativamente reciente en ciencias (Artzorn *et al.* 1988, Bottini *et al.* 1989); por lo que, a pesar de su intenso estudio en los últimos años, poco se conoce aún sobre su ruta biosintética. Estudios realizados en *Azospirillum* sp., sugerirían que dos rutas diferentes para la síntesis de GAs estarían operando en bacterias; la 13-hidroxilativa temprana, que lleva a la formación de GA₁ (GA₁₉→GA₂₀→GA₁), y la 13-hidroxilativa tardía, donde GA₉ es (presumiblemente) el precursor de GA₃ (Piccoli y Bottini 1994a y b, Piccoli *et al.* 1996). Además, al igual que lo observado en plantas, estudios recientes en *A. lipoferum* sugerirían que los primeros pasos en la ruta biosintética de GAs serían regulados por monooxigenasas dependientes del citocromo P450 y asociadas a membrana, mientras que los pasos hidroxilativos tardíos estarían bajo el control de dioxigenasas solubles dependientes del 2-oxoglutarato (Bottini *et al.* 2004).

Un tercer grupo de dioxigenasas, las GA 2-oxidadas (GA2ox), desactivan las GAs por 2β-hidroxilación dando como resultado los catabolitos GA₃₄, producto de inactivación de la GA₄, y GA₈, producto de inactivación de la GA₁ (Hedden y Phillips 2000, Phillips 1998). Esta

clase de enzimas involucradas en el control de los niveles de GAs activas en los tejidos vegetales, está ausente en hongos (Hedden *et al.* 2002).

Las dioxigenasas son codificadas por pequeñas familias multigénicas, cuyos miembros muestran patrones de expresión diferencial específicos según el tejido vegetal y, en algunos casos, regulados tanto por señales endógenas como ambientales. En *Arabidopsis* se han identificado hasta el momento cinco genes *GA20ox*, cuatro *GA3ox* y seis *GA2ox* (Hedden *et al.* 2002).

Sobre la base de estudios tanto en tejidos como en cultivos celulares, se han establecido tres principales rutas en la biosíntesis de GAs en plantas, que si bien comparten los sucesivos pasos de oxidación del C-20, se diferencian en los patrones de 3 β - y 13-hidroxilación (**Figura 8**). La ruta 3 β , 13-hidroxilativa tardía ($GA_{12} \rightarrow \rightarrow \rightarrow GA_9 \rightarrow GA_4 \rightarrow GA_{34}$), la ruta 13-hidroxilativa temprana ($GA_{53} \rightarrow \rightarrow \rightarrow GA_{20} \rightarrow GA_1 \rightarrow GA_8$) y, finalmente, la ruta 3 β -hidroxilativa temprana ($GA_{14} \rightarrow \rightarrow \rightarrow GA_4 \rightarrow GA_{34}$). Si bien en plantas de *Arabidopsis* se han encontrado GAs pertenecientes a cada una de estas rutas biosintéticas (Talon *et al.* 1990), la abundancia relativa de estos intermediarios sugieren a la vía 3 β , 13-hidroxilativa tardía como la principal en la formación de GAs activas en esta especie. Debido a que la concentración de GA_4 en tallos de *Arabidopsis* es un orden de magnitud mayor a la de GA_1 , y que los mutantes enanos deficientes en GAs presentan una mayor respuesta a la aplicación exógena de GA_4 que de GA_1 , se ha propuesto a GA_4 como la principal GA bioactiva (Talon *et al.* 1990). Sin embargo, como GA_4 puede ser convertida a GA_1 por actividad 13-hidroxilativa en tallos (Kobayashi *et al.* 1993), la bioactividad de GA_4 en *Arabidopsis* debería ser estudiada con más detalle cuando se cuente, en un futuro, con mutantes de actividad 13-hidroxilasa. Asimismo, es de destacarse que Sansberro *et al.* (2002) encontraron que, en estacas uninodales de yerba mate cultivadas *in vitro*, GA_4 tuvo un efecto promotor mayor al de GA_1 . Además, se debe señalar que la presencia de determinadas GAs, representativas de cada vía metabólica, varía con el tejido y la ontogenia de la planta (Takahashi *et al.* 1990), de modo que lo sugerido por Talon *et al.* (1990) debe tomarse con precaución. Especialmente si se tiene en cuenta que en *Arabidopsis* también GA_3 se encuentra presente en plántulas de tres días todavía dependientes de la semilla (Bottini R, comunicación personal).

Además de las GAs libres, se han identificado en plantas superiores numerosas formas conjugadas de estas hormonas, cuya característica funcional más importante radica en el hecho de carecer de actividad biológica *per se* (Sembdner *et al.* 1994).

Las formas conjugadas de GAs más frecuentemente encontradas en plantas incluyen aquellas donde esta hormona se combina con glucosa. Estos conjugados pueden ser divididos en dos grandes grupos: glucosil éteres (GA-GS), donde la glucosa se une, mediante unión éter, a un grupo hidroxilo de la molécula de GA, y los glucosil ésteres (GA-GE), donde la glucosa se une a la molécula de GA mediante la formación de una unión éster con el grupo carboxilo del C-7 (Sembdner *et al.* 1994). En el caso de la formación de glucosil éteres, se han identificado conjugados donde la glucosa se une a la GA en posición 2', 3', 11', 13' o 17' (Sembdner *et al.* 1994). Además de los glucosil conjugados, se han encontrado formas conjugadas de GAs con aminoácidos, unidos al grupo carboxilo del C-7 del esqueleto de la GA por medio de una unión peptídica (Sembdner *et al.* 1980).

Los aspectos bioquímicos y fisiológicos de los conjugados de GAs han sido extensamente discutidos (Sembdner *et al.* 1994). La amplia ocurrencia de conjugados de GAs en plantas (especialmente glucósidos) y su fácil formación metabólica e hidrólisis (reversibilidad), hacen posible especular al menos en cuatro posibles roles fisiológicos de los conjugados de GAs en plantas: almacenamiento, transporte, regulación de los niveles de formas activas y posible ruta catabólica.

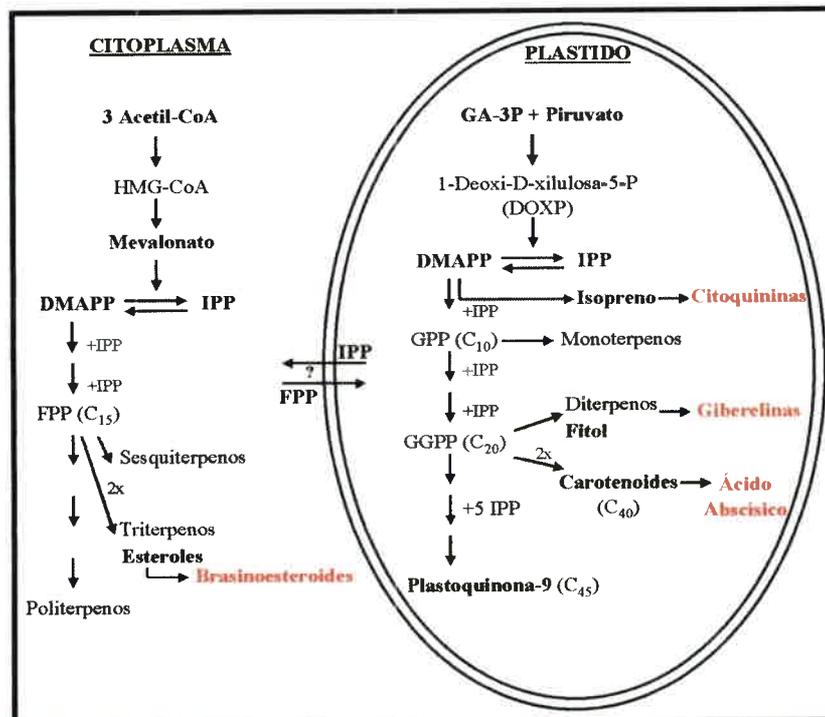


Figura 9. Compartimentalización en la síntesis de IPP e isoprenoides entre citosol (vía acetato/mevalonato) y plástidos (vía DOXP) en plantas vasculares. La figura muestra los orígenes de síntesis de GAs, citocininas, brasinoesteroides y ácido abscísico. IPP, isopentenil pirofosfato; DMAPP, dimetilalil difosfato; GPP, geranyl difosfato; FPP, farnesil difosfato; GGPP, geranylgeranyl difosfato. Tomado de Lichtenthaler 1999, con modificaciones.

I.6.b. Regulación de los niveles de GAs activas

El metabolismo de las GAs, y por ende los niveles endógenos de las formas bioactivas de esta fitohormona, son regulados por numerosos factores; los más estudiados son la especificidad del tejido, el estado de desarrollo, la luz y la respuesta a las GAs. Este último efecto, el cual provee un mecanismo para la homeostasis de los niveles de GAs, formaría parte de un mecanismo de control aún más complejo que incluye la acción de otras fitohormonas.

Salvo pocas excepciones, la mayor parte de los genes *GA20ox* y *GA3ox*, cuyos productos catalizan los últimos pasos en la formación de GAs activas, son regulados negativamente (mecanismo de retro-alimentación negativa) por la concentración de GAs bioactivas en los tejidos de la planta. En tal sentido, se ha observado que plantas con reducidos niveles de GAs activas en el crecimiento (ya sea como resultado de mutación en los genes de la síntesis de esta hormona o luego del tratamiento con inhibidores químicos de la síntesis de

GAs), contienen elevados niveles de transcriptos GA20ox (Martin *et al.* 1996, Ross *et al.* 1999, Xu *et al.* 1999) y GA3ox (Cowling *et al.* 1998, Martin *et al.* 1996, Ross *et al.* 1999). Contrariamente, la aplicación exógena de GAs activas reprime la transcripción de estos genes (Cowling *et al.* 1998, Martin *et al.* 1996, Xu *et al.* 1999). Para el caso de los genes que codifican GA2ox, que catalizan la inactivación de GAs al introducir un hidroxilo en posición 2 β de la molécula, se ha observado que el tratamiento de los tejidos con GAs activas estimula la transcripción de estos genes (mecanismo de retroalimentación positiva, Elliott *et al.* 2001, Thomas *et al.* 1999).

Además de los niveles de GAs activas en los distintos tejidos vegetales, otras señales endógenas regulan la expresión de genes que codifican dioxigenasas en la ruta de síntesis de GAs. En este sentido, se ha observado que plántulas mutantes de *Arabidopsis* deficientes tanto en la respuesta a brasinoesteroides (BR) como en la ruta de síntesis de estas hormonas, presentan bajos niveles de transcriptos GA20ox1, y que el tratamiento de estos mutantes con BR estimula la expresión del correspondiente gen (Bouquin *et al.* 2001).

Existen evidencias que indican una participación de las auxinas en la regulación de la síntesis de GAs. Se ha visto que la decapitación del tallo de plantas de arveja reduce significativamente la conversión de [3 H]GA $_{20}$ a [3 H]GA $_1$ (Sherriff *et al.* 1994), y consecuentemente el contenido endógeno de GA $_1$ del tallo (Ross *et al.* 2000). Ross *et al.* (2000) mostraron que la decapitación del tallo reduce el nivel de transcriptos PsGA3ox1, al mismo tiempo que aumenta los niveles de PsGA2ox1 (el cual cataliza la conversión de GA $_{20}$ a su producto inactivo, GA $_{29}$). Estos investigadores demostraron además que los efectos de la decapitación del tallo sobre la expresión de genes involucrados en la ruta de síntesis de GAs, son completamente revertidos por la aplicación de IAA en el extremo apical de las plantas decapitadas. La explicación a estos resultados es que en plantas intactas de arveja el IAA es transportado desde el ápice a las regiones de crecimiento del entrenudo donde, directa o indirectamente, mantiene los niveles de transcriptos PsGA3ox1 y, consecuentemente, controla los niveles de GA $_1$, que es la GA activa en la elongación de entrenudos en la especie.

Estudios recientes mostraron que la síntesis *de novo* de GAs es necesaria para la germinación de semillas de sorgo y que el ABA actuaría como un inhibidor de la germinación, a través del control de la biosíntesis de las GAs. En este sentido, Perez-Flores *et al.* (2003)

encontraron que el tratamiento de embriones de sorgo con ABA, inhibe fuertemente la expresión del gen *SbGA20ox*, el cual está correlacionado con distintos niveles de dormición encontrados en sorgo.

Además de las señales endógenas, existen factores ambientales que regulan la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de las GAs. Entre ellos, la calidad y cantidad de luz y duración de la misma (fotoperíodo), son factores externos que regulan importantes procesos tales como germinación, floración, elongación del tallo y tuberización (Clúa *et al.* 1996, Davies 1995, Kamiya y García-Martínez 1999, Zhao y Chory 2001).

Numerosos estudios indican que la LR promueve la germinación de lechuga (*Lactuca sativa*) y *Arabidopsis*. En lechuga, el gen *Ls3h1* (*LsGA3ox1*), el cual codifica para una GA 3 β -hidroxilasa, es fuertemente activado por LR, lo cual conduce a un incremento en los niveles de GA₁ (no observándose variaciones en los niveles de los precursores GA₁₉ y GA₂₀), estimulando así la germinación. La naturaleza reversible de esta inducción génica por un pulso de LRL, indica que la expresión de *Ls3h1* es regulada en lechuga por los receptores fitocromo (Toyomasu *et al.* 1998).

En *Arabidopsis*, tanto la síntesis *de novo* de GAs como las condiciones lumínicas adecuadas (LR) son esenciales para la germinación. Recientemente se mostró que los niveles de GA₄ aumentan justo antes de la emergencia de la radícula (Ogawa *et al.* 2003), apoyando esto la hipótesis de que las GAs, entre otras funciones, son necesarias para superar la barrera mecánica conferida por los tejidos (aleurona y testa) que rodean al embrión (Debeaujon y Koornneef 2000, Yamaguchi y Kamiya 2002). En concordancia con este aumento de los niveles de GAs activas, Yamaguchi *et al.* (1998 y 2001) demostraron que dos genes que codifican GA 3 β -hidroxilasas, *GA4* (*AtGA3ox1*) y *GA4H* (*AtGA3ox2*) son inducidos por LR. A través del uso de mutantes *phyB* pudo comprobarse que el gen *GA4H* es regulado por el *phyB*, mientras que algún otro miembro de la familia fitocromo regularía la expresión del gen *GA4* (Yamaguchi *et al.* 1998 y 2001). Sin embargo, todos los transcritos que codifican GA2ox (*AtGA2ox1-4*) permanecieron en niveles constantes de expresión antes de la emergencia de la radícula, sugiriendo que la síntesis *de novo* es el mecanismo principal para el incremento de los niveles de GA₄ observados y no una alteración de la actividad 2 β -hidroxilasa (Ogawa *et al.* 2003).

Las GAs actúan como intermediarios ante las respuestas de la planta al fotoperíodo (García-Martínez y Gil 2002). Por ejemplo, inducen la rápida elongación del tallo (bolting) que acompaña a la floración en plantas de días largos. En espinaca (*Spinacia oleracea* L.) la transferencia de plantas de días cortos (DC) a días largos (DL) estimula rápidamente el alargamiento caulinar, concomitantemente con un incremento en la actividad enzimática en varios pasos de la ruta biosintética incluyendo la síntesis de *ent*-Kaureno (Zeevaart y Gage 1993). En esta especie, los altos niveles de transcritos del gen *SoGA20ox1* en el ápice caulinar de plantas crecidas en condiciones inductivas (DL, Wu *et al.* 1996) determina un aumento en la conversión de GA₅₃ a GA₄₄ y de GA₁₉ a GA₂₀, no así la conversión de GA₄₄ a GA₁₉. Posiblemente, otra GA 20-oxidasa cataliza específicamente este paso metabólico no regulado por DL (Gilmour *et al.* 1986, Wu *et al.* 1996). En *Arabidopsis* se ha encontrado que el contenido de las dos GAs activas, GA₁ y GA₄, en hojas roseta, aumenta cuando las plantas son transferidas de condiciones DC a DL, con un incremento concomitantemente de los niveles de transcritos del gen *AtGA20ox1* (GA5, Xu *et al.* 1997).

El proceso de tuberización en papa es regulado tanto por las GAs como por el fotoperíodo (Jackson 1999). El nivel de GA₁ (una de las GAs bioactivas en papa) presente en los estolones (tallo subterráneo modificado que da origen al tubérculo), disminuye cuando éstos comienzan a engrosarse luego de la transferencia de las plantas de DL a condiciones inductivas de DC (Xu *et al.* 1998). En concordancia con estos resultados, se ha observado que plantas de papa silvestres *S. tuberosum* ssp. *andígena*, presentan bajo condiciones no inductivas (DL) un pico adicional en el contenido de transcritos del gen *StGA20ox1* (uno de los tres genes GA20ox de papa que se expresan en hoja) y del gen *StGA20ox3* (Carrera *et al.* 1999).

La dependencia fotoperiódica de *S. tuberosum* ssp. *andígena* se pierde en líneas transgénicas de papa con expresión antisentido de *PHYB* (anti-*PHYB*), las cuales tuberizan tanto bajo condiciones de DC como de DL (Jackson *et al.* 1996). Este hecho sugiere que el receptor phyB bajo condiciones de DL (no inductivas) produce un inhibidor que bloquea la formación del tubérculo (Jackson *et al.* 1998). Sin embargo, las plantas anti-*PHYB* son más altas que las silvestres y contienen mayores niveles de *StGA20ox1* (Jackson *et al.* 2000) y de GA₁ en tallo (Martínez-García *et al.* 2002). Una hipótesis que podría explicar esta aparente paradoja sería que una reducción del nivel de phyB en plantas de papa (como la observada en

plantas anti-*PHYB*) desencadenaría respuestas constitutivas, tanto las de corto plazo reguladas por condiciones de DC (por ejemplo, la elongación del tallo dependiente de las GAs), como la vía de tuberización dependiente del fotoperíodo en respuesta a una señal proveniente de las hojas que induce la formación del tubérculo (Martínez-García *et al.* 2002).

I.6.c. Control del alargamiento caulinar

El alargamiento de los tallos es el resultado de dos procesos celulares: división y elongación celular. La expansión celular en una dirección (elongación), es un proceso altamente coordinado el cual involucra la regulación de la orientación de los microtúbulos, la relajación de la pared celular, la biosíntesis y el ordenamiento de polímeros constituyentes de la pared, como así también el transporte e incorporación de nuevos componentes de la pared (Cosgrove 1997). Cabe señalar que si bien ambos procesos pueden participar, según la especie vegetal, en el crecimiento longitudinal de los tallos, la mayor proporción es por elongación más que por división celular.

La expansión celular es un proceso regulado tanto por estímulos externos, tales como luz, temperatura, gravedad y disponibilidad de agua, así como también por factores internos entre los que están las hormonas GAs, auxinas, ABA, BR y otros reguladores del crecimiento, las cuales se ha visto regulan además el proceso de división celular (Cosgrove 1997, Kerstens y Verbelen 2003, Vriezen *et al.* 2003).

El control de la expansión celular es esencial en todos los procesos morfogénicos de la planta debido a que la morfología de sus órganos está determinada por el número, tamaño y forma de las células. La forma que éstas adopten dependerá de la dirección de la expansión celular, que es regulada por las propiedades de la pared y, particularmente, por la orientación de las microfibrillas de celulosa en la pared, lo que a su vez está controlado por los microtúbulos (Verbelen *et al.* 2001). Los microtúbulos corticales generalmente están orientados transversalmente a la dirección de la expansión celular (Green 1980).

Bajo condiciones hipóxicas de anegamiento, el tratamiento de plántulas de arroz con GA₃ estimula durante las primeras 2 horas de tratamiento el crecimiento del entrenudo a través de la elongación de las células meristemáticas, siendo éstas 2,5 veces más largas que aquellas células del entrenudo completamente elongadas antes del inicio del tratamiento. Además, se

observó un aumento en el porcentaje de núcleos de células meristemáticas en fases S y G₂ luego de la aplicación de GA₃, indicando que las GAs estimulan no sólo la elongación celular, sino también la tasa de división celular (Sauter y Kende 1992).

En células epidérmicas formadas en el meristema intercalar de entrenudos de plantas de arroz, la orientación de las microfibrillas de celulosa es transversal, es decir perpendicular a la dirección del crecimiento, cambiando a oblicuas cuando dichas células alcanzan la fase de cese de la elongación (Sauter *et al.* 1993). Al parecer, una orientación oblicua a la longitudinal de las microfibrillas inhibe la elongación celular (Green 1980, Shibaoka 1994). Se ha visto que los inhibidores de la biosíntesis de GAs producen un desarreglo de los microtúbulos, orientándose éstos de forma oblicua o longitudinal al eje celular (Shibaoka 1994). Esto indicaría que las GAs están involucradas en el mantenimiento de los microtúbulos corticales en una orientación transversal, regulando así la dirección de la expansión celular (elongación, Shibaoka 1994).

A diferencia de lo observado en arroz, el crecimiento del hipocótilo de plántulas de *Arabidopsis* es debido enteramente al proceso de elongación celular. Este proceso de elongación comienza en la base del hipocótilo y continúa acrópetamente hasta el ápice del mismo (Gendreau *et al.* 1997). En presencia de luz la elongación es limitada y las células más largas corresponden a aquellas ubicadas en la parte media del órgano. Luego de 10 días de crecimiento, la elongación celular prácticamente ha cesado; sin embargo, las células del ápice mantienen la capacidad de elongarse cuando las plántulas son transferidas desde la luz a oscuridad o luego del tratamiento con etileno (Kerstens y Verbelen 2003).

En plántulas de *Arabidopsis* de 6 días las células epidérmicas de la región apical del hipocótilo presentan una orientación transversal de las fibrillas de celulosa, en concordancia con su menor tamaño (alrededor de 600 µm) y su capacidad de elongación. En la región basal y media del hipocótilo el proceso de elongación ha cesado (alrededor de 200 µm) y las células epidérmicas se caracterizan por la orientación longitudinal de las microfibrillas de celulosa (Kerstens y Verbelen 2003).

Además de las GAs, otras fitohormonas desempeñan la función de regular la expansión celular. En tal sentido, las auxinas estimulan la elongación a través de la relajación de la pared. Mientras que el etileno y el ABA, quienes inhiben el alargamiento (ambos) y promueven la expansión lateral de los tallos (etileno), producen un desarreglo de los microtúbulos corticales

(Shibaoka 1994). No obstante, en el caso de ABA se ha visto en yerba mate (*Ilex paraguariensis*) que éste puede indirectamente estimular crecimiento, tanto a nivel tisular como celular, al mejorar el estado hídrico de los tejidos por cierre parcial de estomas evitando así el déficit hídrico provocado por desbalances entre transpiración y absorción de agua (Sansberro *et al.* 2004).

I.6.d. Inhibidores de la biosíntesis de GAs

Los reguladores del crecimiento vegetal representan sólo una pequeña parte (aproximadamente 4%) de los herbicidas utilizados en el campo de la agricultura y horticultura. La mayor parte de estos reguladores del crecimiento son compuestos sintéticos que reducen el crecimiento longitudinal del tallo (retardantes del crecimiento), bloqueando principalmente ciertos pasos en la ruta biosintética que conduce a la formación de GAs activas en el crecimiento caulinar; ya sea a través de la interrupción de las vías metabólicas de precursores de la síntesis de GAs o bien a la conversión de éstas a sus formas activas. Hasta el momento se conocen cuatro diferentes grupos de inhibidores de la síntesis de GAs en plantas superiores (**Figura 10**), clasificados de acuerdo al paso de la biosíntesis de GAs en el que intervienen (Rademacher 1991 y 2000):

- Compuestos tipo “cebolla”. Bloquean la síntesis de *ent*-Kaureno, inhibiendo la ciclización de geranyl geranyl pirofosfato (GGPP), al bloquear la actividad tanto de la enzima CPP-sintasa (responsable de la formación de copalil pirofosfato, CPP), como a través de la inhibición de la enzima *ent*-Kaureno sintasa. Los compuestos pertenecientes a este grupo presentan un amonio cargado positivamente, fosfatos o grupos sulfónicos. Entre estos compuestos se cuentan los retardantes del crecimiento más antiguos y comunes, caracterizados por tener un grupo amonio cuaternario como son: CCC (cloruro de 2-cloroetil-trimetilamonio) y DPC (2,5-diclorofenol), usados principalmente como inhibidores del “vuelco” en la producción de cereales y para reducir el crecimiento vegetativo en plantas de algodón. Otros retardantes pertenecientes a este grupo son, AMO-1618, FOSFON D, ALAR ó B9.

- Compuestos con un heterociclo conteniendo N. Este grupo de retardantes del crecimiento inhiben los pasos sucesivos desde la conversión de *ent*-Kaureno al ácido *ent*-Kaurenoico; debido a que bloquean las monooxigenasas que catalizan estas reacciones de oxidación. Entre los más conspicuos representantes de este grupo podemos citar a Uniconazol y Paclobutrazol, utilizados en prácticas agrícolas con arroz, árboles frutales y plantas ornamentales.

- Ciclohexantrionas. Son un grupo de retardantes de aparición más reciente que bloquean los pasos tardíos en la ruta biosintética de las GAs. Esta especificidad de acción les da a este tipo de compuesto la ventaja de bloquear la síntesis de GAs activas pero no la vía de síntesis de los terpenos, evitando así los efectos colaterales del uso de los otros tipos de retardantes mencionados anteriormente. Las ciclohexantrionas inhiben principalmente el paso de 3 β -hidroxilación, catalizado por dioxigenasas, que conduce a la formación de GA₁, GA₃ y GA₄, principales GAs activas en el crecimiento caulinar. Dentro de este grupo, un compuesto cuyo uso se ha extendido en los últimos años es el Prohexadiona-Ca ó BX-112.

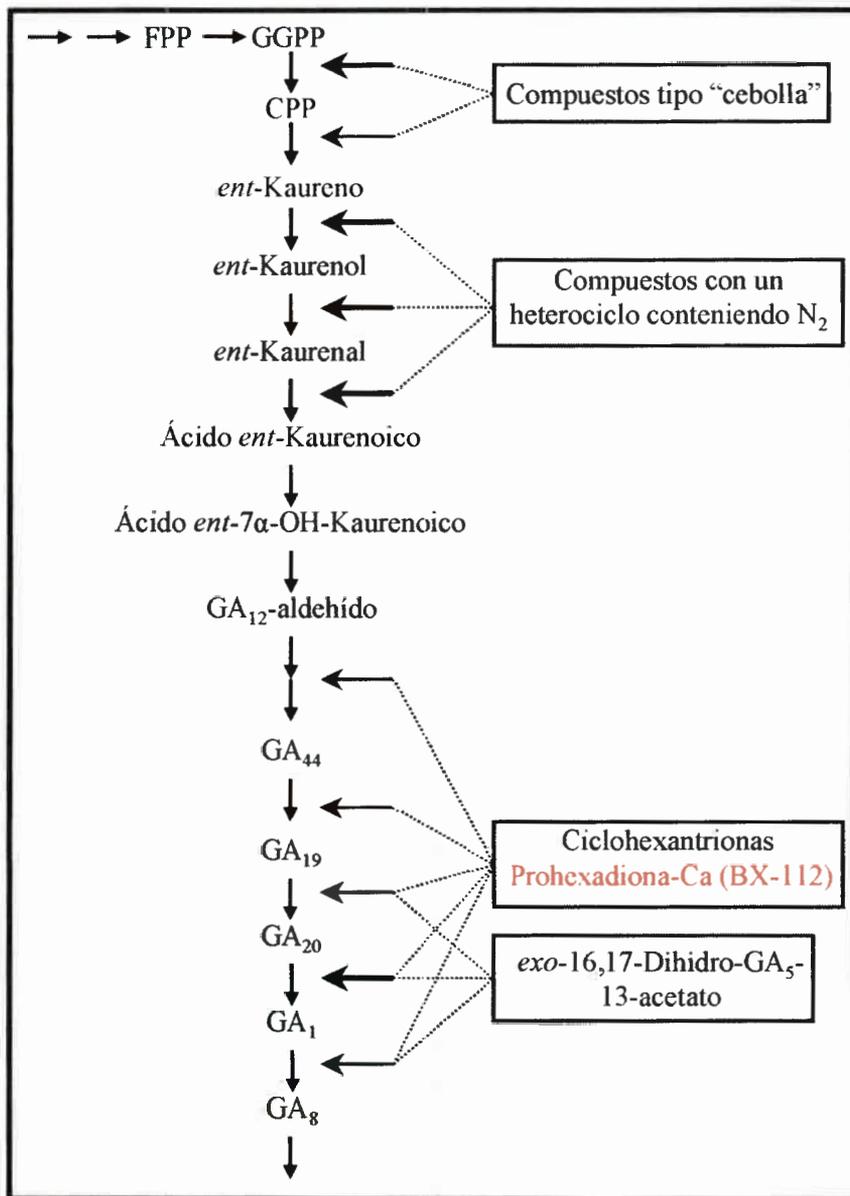


Figura 10. Esquema simplificado de la ruta biosintética de GA_1 , mostrando los pasos metabólicos inhibidos por los diferentes grupos de retardantes del crecimiento vegetal (los distintos grados de actividad son indicados según el grosor de las flechas: \rightarrow bajo grado, \rightarrow alto grado de actividad. FPP, farnesil difosfato; GGPP, geranilgeranil difosfato; CPP, copalil difosfato. Tomado de Rademacher 1991 y 2000.

Prohexadiona-Ca (ácido 1,3-dioxo-2-propionilciclohexano-5-carboxílico cálcico; BX-112) es un retardante del crecimiento usado ampliamente tanto en el ámbito agronómico como científico (Rademacher 2000). Fue desarrollado primeramente por Kumiai Chemical Industry Co. y actualmente es comercializado en diferentes países por BASF.

BX-112 inhibe significativamente el crecimiento longitudinal del tallo en una amplia variedad de especies (Nakayama *et al.* 1991), bloqueando los pasos tardíos en la biosíntesis de GAs activas. Dichos pasos son catalizados por GA hidroxilasas (dioxigenasas) las cuales requieren de 2-oxoglutarato como co-sustrato. Debido a la similitud estructural entre Prohexadione-Ca y 2-oxoglutarato (**Figura 11**), este retardante es capaz de unirse estrechamente al sitio activo de la GA hidroxilasa y así inhibir su acción como tal (Griggs *et al.* 1991).

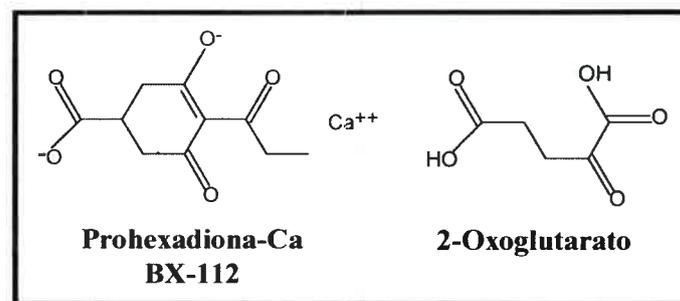


Figura 11. Similitud estructural entre Prohexadione-Ca (BX-112) y 2-Oxoglutarato. Tomado de Rademacher 2000.

Como ya mencionáramos anteriormente un paso clave en la formación de GAs activas en el crecimiento es la 3 β -hidroxilación de formas biológicamente inactivas, GA₂₀, GA₅ y GA₉, a sus derivados activos, GA₁, GA₃ y GA₄, respectivamente. BX-112 inhibe principalmente la actividad 3 β -hidroxilativa, aunque se ha visto también afecta la 2 β -hidroxilación; un paso de inactivación que conduce a la formación de los catabolitos inactivos de GA₁ y GA₄, GA₈ y GA₃₄, respectivamente. En plantas tratadas con BX-112 es común encontrar que aumentan los niveles de GA₂₀ (precursor de GA₁) al tiempo que disminuyen los del metabolito 3 β -hidroxilado, GA₁. Este hecho se ve acompañado, aunque no tan importante como de la actividad 3 β -hidroxilativa, por una reducción de la actividad 2 β -hidroxilativa de GA₁ a GA₈ (Brown *et al.* 1997).

- 16-17-Dihidro-GAs. Representan al grupo de retardantes del crecimiento de más reciente aparición; cuya actividad se debe a un efecto inhibitorio de las dioxigenasas, particularmente aquellas que catalizan la 3 β -hidroxilación y el paso de inactivación por la hidroxilación del C-2 β (Junttila *et al.* 1997). Hasta el momento se han descrito un número de

distintas estructuras de este tipo, principalmente derivados de GA₅, que reducen la elongación del tallo en *Lolium temulentum* (Mander *et al.* 1998) y otras herbáceas (King *et al.* 1997). La *exo*-16,17-dihidro-GA₅-13-acetato representa el retardante del crecimiento más activo conocido hasta el momento en gramíneas. Bajo condiciones de crecimiento en invernadero, el uso de concentraciones de tan sólo 500 mg por ha, producen efectos retardantes en plantas de cebada y trigo. Sin embargo, este compuesto y estructuras relacionadas son inactivas en reducir el crecimiento del tallo en otras especies vegetales testeadas (Rademacher *et al.* 1999), sugiriendo una cierta especificidad entre la especie vegetal (particularidades de la síntesis de GAs, transporte, catabolismo, etc) y la estructura molecular del retardante.

Aparentemente, las siguientes características estructurales de esta nueva clase de retardantes del crecimiento, serían esenciales para determinar su actividad: presencia de una doble ligadura entre los C-2 y C-3, ausencia de grupos hidroxilos en estos átomos de carbono y finalmente la función 16,17-dihidro (Rademacher 2000).

I.7. Ácido Abscísico

El ácido abscísico (ABA), fue descubierto independientemente por dos grupos de investigadores en la década del '60. Originalmente, se lo indicó como un inhibidor del crecimiento vegetal, involucrado en los procesos de abscisión de frutos de algodón y en la inducción fotoperiódica de la dormición en yemas vegetativas. Sin embargo, el ABA desempeña un importante papel en la regulación de muchos procesos fisiológicos del crecimiento y desarrollo, como así también, de las respuestas fisiológicas de la planta frente a situaciones de estrés, tales como sequía, salinidad, frío, ataque de patógenos y radiación UV (Rock 2000).

I.7.a. Biosíntesis

El ABA es un sesquiterpeno (C₁₅) ácido, cuya molécula presenta isomería óptica debido a la presencia de un átomo de carbono anomérico en posición 1'. De los enantioisómeros, sólo la forma S-ABA se encuentra naturalmente en plantas. La molécula de ABA presenta además isomería geométrica, pudiendo existir la forma *cis* (+) o *trans* (-) en el

átomo de carbono 2. De estos isómeros presentes en plantas, sólo la forma S-(+)-ABA es biológicamente activa (Finkelstein y Rock 2002).

Se han propuesto dos rutas para la síntesis de ABA: i) una **ruta directa** de producción de ABA a partir de isopentenil pirofosfato (C_5) vía farnesil difosfato (C_{15}), y una **ruta indirecta**, en la cual el ABA es sintetizado mediante el clivaje oxidativo de carotenoides de 40 átomos de carbono (**Figura 12**).

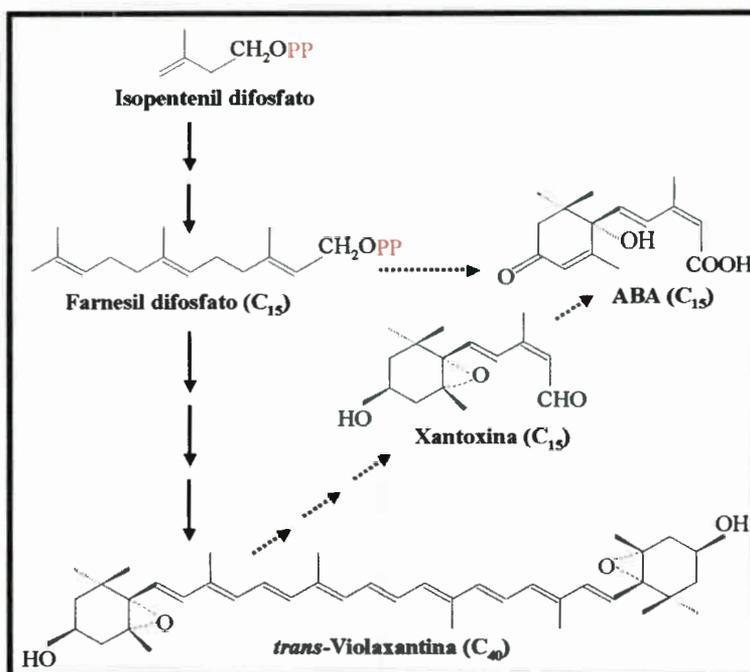


Figura 12. Esquema resumido mostrando las dos posibles rutas biosintéticas de ABA. La vía directa, a partir de farnesil difosfato (C_{15}); y la vía indirecta, a partir del clivaje de 9-*cis*-biolaxantina (C_{40}) para formar un precursor de ABA, xantoxina (C_{15}). Tomado de Crozier *et al.* 2000.

Tras el descubrimiento, en el año 1977, de que la ruta directa de biosíntesis de ABA operaba en algunos hongos tales como los del género *Cercospora*, a través de la C1-hidroxilación de 1-deoxiABA, estos compuestos fueron estudiados para investigar su papel en la biosíntesis de ABA y así determinar la ocurrencia de la vía directa de formación de esta hormona en plantas. Creelman y Zeevaart (1988) concluyeron que xantófilos de 40 átomos de carbono son los intermediarios en la biosíntesis de ABA en plantas vasculares. Estos autores incubaron hojas de *P. Vulgaris* y *Xanthium strumarium* sometidas a estrés hídrico en la presencia de $^{18}O_2$, con lo cual si el 1-deoxiABA fuera el precursor inmediato (como en hongos) del ABA en plantas, un átomo ^{18}O sería incorporado a través de la 1C-hidroxilación a

la molécula de ABA en la posición 1'. Sin embargo, el análisis por GC-MS, no reveló la presencia de ^{18}O incorporado al ABA. En los últimos años, la identificación y caracterización de mutantes deficientes en ABA ha constituido una herramienta fundamental para la identificación de muchos de los genes que codifican las enzimas involucradas en la biosíntesis de ABA (Schwartz *et al.* 2003), por lo que actualmente se tiene un conocimiento bastante detallado de la ruta biosintética de ABA en plantas vasculares.

I.7.a.i. Formación de carotenoides

La ruta de síntesis de ABA en plantas comienza con la formación de carotenoides en los cloroplastos. Las primeras reacciones de síntesis involucran la formación de isopentenil pirofosfato (IPP) a partir de piruvato y gliceraldehído fosfato, vía la formación de 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfato (**Figura 9**). Ocho residuos IPP se combinan para la formación de un fitoeno carotenoide no cíclico de 40 átomos de carbono, el cual tras progresivas reacciones de desaturación y dos ciclizaciones da como resultado la síntesis de β -caroteno (**Figura 13**); el que es convertido posteriormente en un xantófilo, Zeaxantina (**Figura 11**, Milborrow 2001, Mitsunori y Koshiha 2002). La reacción de síntesis de IPP en cloroplastos, constituye un paso común de las rutas de biosíntesis tanto de carotenoides como monoterpenos, diterpenos, el residuo fitol de la clorofila y plastoquinonas (**Figura 9**, Lichtenthal 1999, Sponsel 2002).

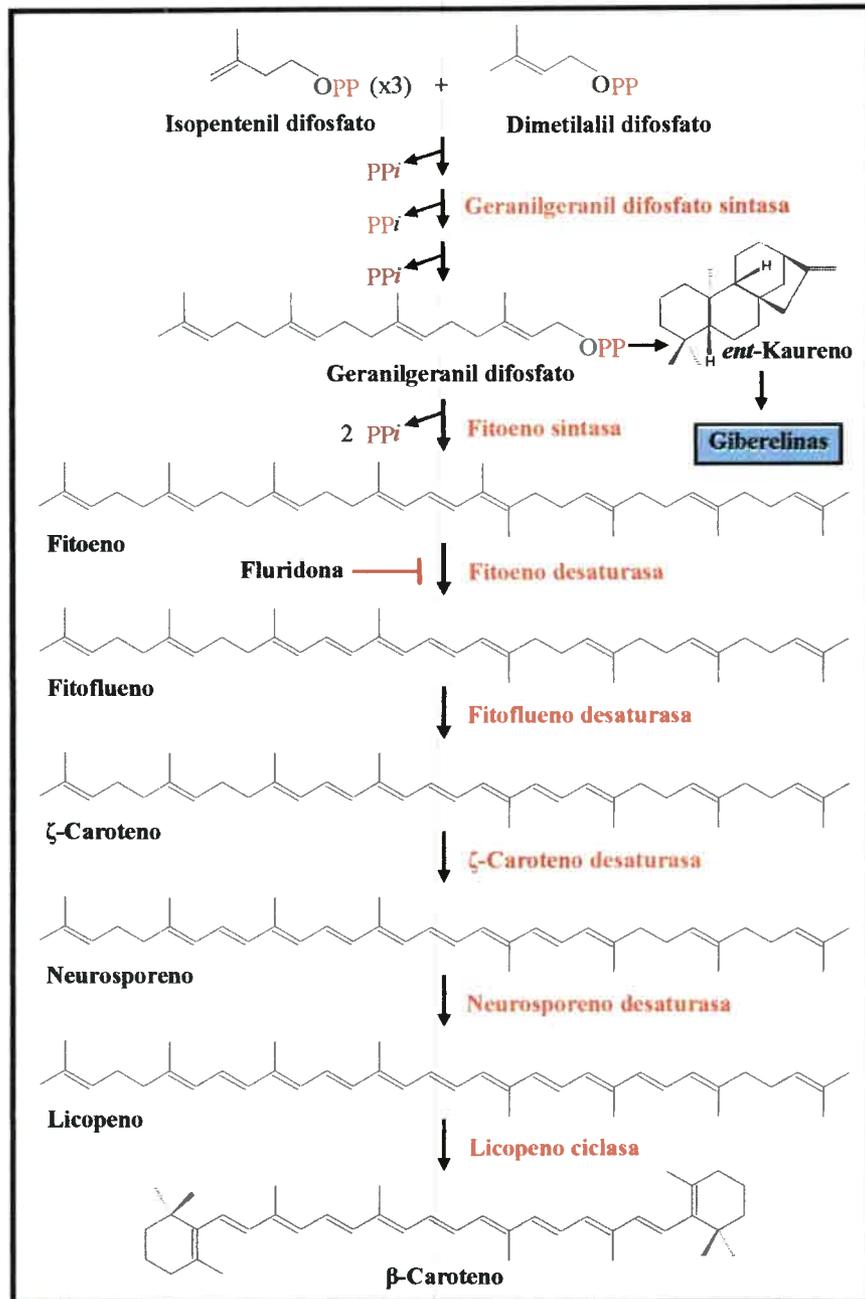


Figura 13. Pasos tempranos en la ruta indirecta (C₄₀) de biosíntesis de ABA: producción de geranilgeranil difosfato y síntesis de β-carotenos. El inhibidor fluridona (Sonar) bloquea la conversión de fitoeno a fitoflueno. Tomado de Crozier *et al.* 2000.

I.7.a.ii. Formación de ABA

El primer paso específico en la ruta de biosíntesis de ABA es la epoxidación de zeaxantina, reacción catalizada por una zeaxantin epoxidasa (ZEP, **Figura 14**). La primer

etapa resulta en la formación de violaxantina a través de un intermediario, anteraxantina. Posteriormente, la violaxantina sufre reacciones de isomerización dando como resultado *trans*-neoxantina y *9-cis*-violaxantina, quienes originan *9-cis*-neoxantina. El clivaje oxidativo de estos *9-cis*-epoxicarotenoides origina un compuesto de 15 átomos de carbono, *2-cis*-xantoxina (actualmente denominado xantoxal, Milborrow *et al.* 1997) y un co-producto de 25 átomos de carbono, aún no identificado, el cual se piensa es rápidamente degradado tras la reacción de clivaje (Schwartz *et al.* 1997). Tan *et al.* (1997) utilizando mutantes de maíz deficientes en ABA (*vp14*), aislaron el gen que codifica la enzima *9-cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) encargada de catalizar la reacción de clivaje. La identificación y caracterización de enzimas NCEDs en una variedad de especies vegetales (Chernys y Zeevaart 2000, Iuchi *et al.* 2000 y 2001, Qin y Zeevaart 1999); ha permitido sugerir que si bien estas enzimas presentan una cierta plasticidad de sustrato *in vitro*, la *9-cis*-neoxantina sería el principal precursor en la síntesis de ABA. El último paso en la ruta de síntesis de ABA requiere el transporte del producto *2-cis*-xantoxina al citosol, el cual tras reacciones de oxidación e isomerización, da como resultado final ABA, vía ABA-aldehído. Estas reacciones son catalizadas por una alcohol dehidrogenasa/reductasa de cadena corta (SDR) y ABA aldehído oxidasa (AOA) , respectivamente.

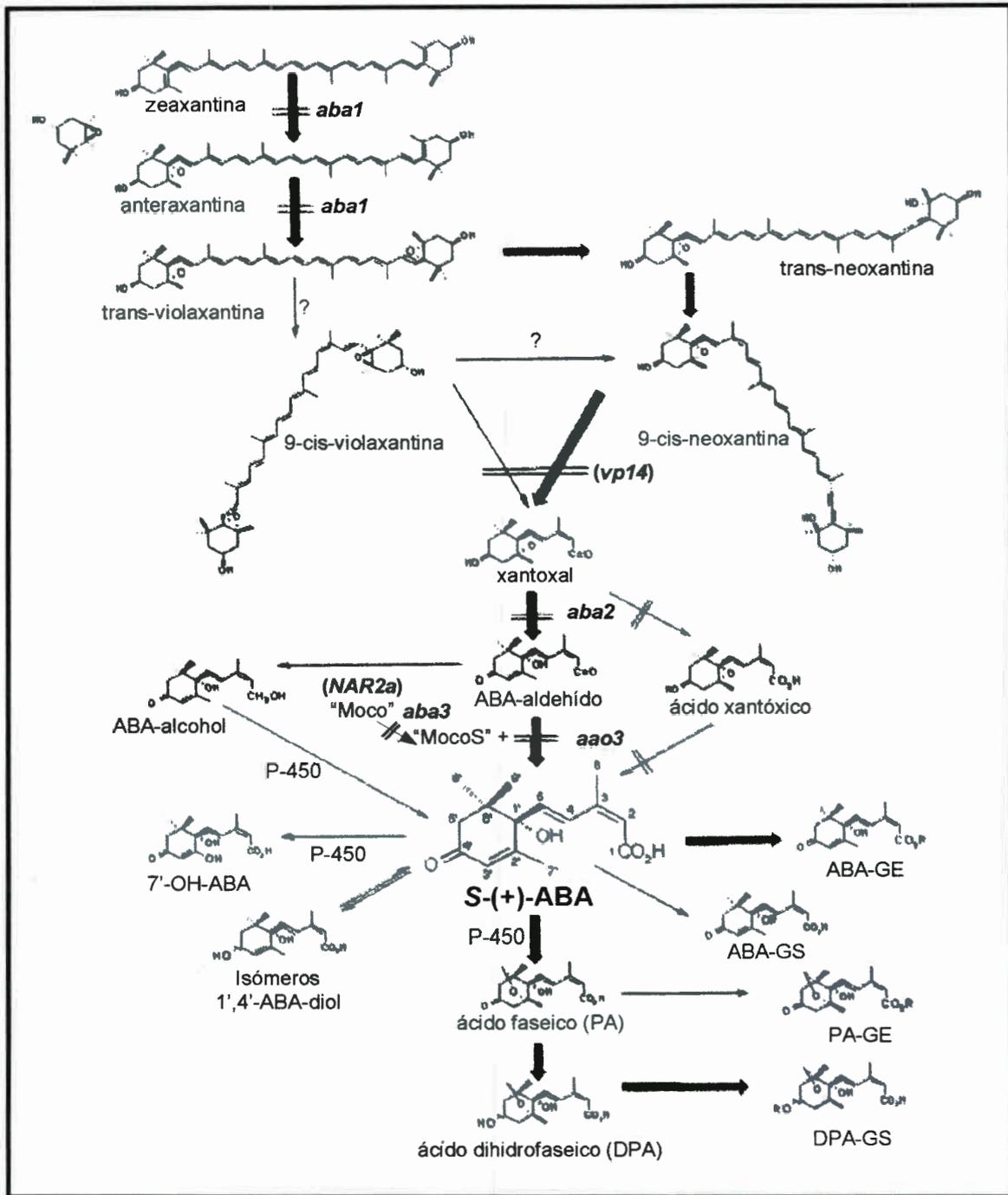


Figura 14. Pasos tardíos en la ruta indirecta (C₄₀) de biosíntesis de ABA: a partir de zeaxantina, mostrando los pasos biosintéticos bloqueados en diferentes especies de mutantes de ABA. Principales productos de inactivación de ABA (ácido faseico [PA], ácido dihidro-faseico [DPA], y ABA glucosil éster [ABA-GE]) y otros metabolitos menores (7-hidroxi-ABA [7-OH-ABA], ABA-1-glucósido [ABA-GS], PA glucosil éster [PA-GE], y DPA-glucósidos [DPA-GS]). Tomado de Finkelstein y Rock 2002.

I.7.b. Catabolismo del ABA

El ABA puede ser catabolizado por oxidación, reducción o conjugación (Cutler y Krochko 1999, **Figura 14**). La principal ruta de oxidación del ABA en plantas implica la hidroxilación del átomo de carbono 8 dando como producto un intermediario inestable, 8-hidroxi-ABA (8-OH-ABA), el cual origina rápidamente ácido faseico (PA, Zhou *et al.* 1995). El PA puede ser conjugado, de forma irreversible, formando glucosil éster (PA-GE), o reducido a dihidro-faseico (DPA). A su vez, el DPA puede ser también metabolizado formando DPA-glucósidos (DPA-GS, Zeevaart 1999). Una segunda ruta de oxidación del ABA, de menor importancia que la del PA, es la hidroxilación del átomo de carbono 7 para formar 7-hidroxi-ABA (7-OH-ABA, Lehmann *et al.* 1983). Si bien se ha reportado que tanto el PA como el DPA serían moléculas hormonalmente inactivas (Cutler y Krochko 1999), los metabolitos hidroxilados 8-OH-ABA y 7-OH-ABA, han mostrado una actividad hormonal significativa en aquellos estudios en los cuales estos compuestos lábiles fueron comparados con ABA (Hill *et al.* 1995, Zhou *et al.* 1995). Sin embargo, cabe preguntarse si la actividad biológica es *per se* o por hidrólisis (reversible) de estos compuestos que forman ABA.

Recientemente se ha identificado una tercera ruta de oxidación del ABA, en la cual el átomo de carbono 9 es hidroxilado para formar 9-hidroxi-ABA (9-OH-ABA), compuesto que origina posteriormente neoPA (Zhou *et al.* 2004). Al igual que lo observado para los metabolitos 8-OH-ABA y 7-OH-ABA, la forma abierta del isómero +-9-OH-ABA es hormonalmente activa (aunque en menor grado que el S-(+)-ABA), mientras que la molécula neoPA (forma cerrada) es inactiva (Zhou *et al.* 2004).

El ABA también puede ser inactivado por conjugación reversible mediante la formación de ABA glucosil éster (ABA-GE) y, en menor medida, por la formación del metabolito ABA-1-glucósido (ABA-GS, Zeevaart y Creelman 1988).

I.7.c. Inhibidores de la biosíntesis de ABA

La ruta biosintética de los terpenos en plantas (**Figura 9**) da origen a diferentes tipos de metabolitos primarios, entre los cuales se incluyen los carotenoides y las fitohormonas ABA y GAs. Una de las reacciones iniciales de la ruta de biosíntesis de carotenoides, es decir

la formación de fitoeno (**Figura 13**), compite con el primer paso en la biosíntesis de GAs, que es la formación de kaureno a partir de geranil geranil pirofosfato (GGPP, **Figura 8**). De este modo las manipulaciones sobre la biosíntesis de carotenoides que conducen tanto a aumentar como disminuir la producción de los mismos, tendrán un impacto sobre los niveles y funciones de ambas fitohormonas, ABA y GAs.

Existen comercialmente herbicidas que interfieren con varias enzimas participantes en la ruta biosintética de los carotenoides, como por ejemplo, a nivel de la fitoeno desaturasa, ζ -caroteno desaturasa y licopeno ciclasa. Un amplio espectro de herbicidas, dentro del cual podemos citar a fluridona, inhiben la actividad fitoeno desaturasa, la cual cataliza el paso de desaturación de fitoeno a fitoflueno en la ruta de síntesis de β -carotenos (**Figura 10**, Bartels y Watson 1978, Sandmann 2001).

Fluridona (1-metil-3-fenil-5-(3-trifluorometilfenil)-4-(1*H*)-piridinona, **Figura 15**) es un herbicida de amplio uso en USA utilizado para controlar la proliferación de “malezas” acuáticas en estanques, fuentes, etc. Esta sustancia es absorbida tanto por hojas y tallos como raíces (Fluridone-Sonar, Washington State Department of Health, marzo 2000).

Se designa como fluridona al ingrediente activo del herbicida Sonar (Sonar A.S), actualmente comercializado por SEPRO Co.

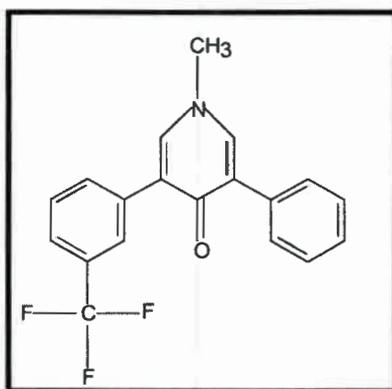


Figura 15. Estructura química del inhibidor Fluridona. Tomada de: <http://www.alanwood.net/pesticides/fluridone.html>

Fluridona inhibe en forma indirecta la síntesis de ABA, ya que bloquea un paso temprano en la formación de carotenoides, lo que trae como consecuencia para la planta la foto-oxidación de la clorofila. No obstante esta limitación, fluridona ha sido ampliamente

usada, contribuyendo significativamente al estudio de las respuestas mediadas por ABA en plantas (Popova y Riddle 1996, Xu y Bewley 1995, Yoshioka *et al.* 1998). Se ha propuesto que fluridona tiene efectos directos sobre los niveles endógenos de ABA, ya que dichos efectos pueden ser revertidos por la aplicación simultánea de esta hormona (Johson-Flanagan 1991). La aplicación de fluridona incrementó significativamente las tasas de germinación y de crecimiento de plántulas de poroto (*Vigna radiata* Wilzec.) tanto en condiciones óptimas como supraóptimas de temperatura, al tiempo que estimuló la acumulación de azúcares bajo estrés por alta temperatura (Thind *et al.* 1997).

El tratamiento de semillas de lechuga con fluridona restauró la germinación bajo condiciones supraóptimas de temperatura. Esta respuesta es mediada por la reducción del contenido endógeno de ABA de las semillas tras la aplicación de este inhibidor (Yoshioka *et al.* 1998). En esta misma especie, la aplicación exógena de una combinación de GA₃, IAA y fluridona fue capaz de revertir el efecto inhibitorio de la LA sobre la elongación de plántulas de lechuga etioladas (Volmato *et al.* 1998). De forma similar, la aplicación simultánea de fluridona y GA tuvo un efecto sinérgico sobre la elongación de tallos de plantas de maíz (Devlin *et al.* 1980).

I.7.d. Efectos fisiológicas

El ABA participa en numerosos procesos del crecimiento y desarrollo durante todo el ciclo de vida de la planta, ya sea sólo o a través de la interacción con otras fitohormonas. Desempeña un papel importante en procesos celulares que incluyen el desarrollo del embrión, dormición y germinación de la semilla, así como también en el control del crecimiento. Se ha sugerido mediante estudios con *Arabidopsis* que durante el desarrollo de la semilla se producirían dos picos en los niveles endógenos de ABA (Finkelstein *et al.* 2002). Un pico temprano, aproximadamente 10 d posteriores a la polinización, requerido para prevenir la germinación prematura al final de la fase de división celular de la embriogénesis (Raz *et al.* 2001) y para la síntesis de proteínas de almacenamiento de la semilla (Phillips *et al.* 1997). El segundo pico en los niveles de ABA sería esencial para inducir la dormición de la semilla mediante la activación de la síntesis de proteínas LEA (late embryogenesis-abundant), que preparan al embrión para tolerar condiciones de desecación (Finkelstein *et al.* 2002).

Finalmente, durante la última etapa de maduración de la semilla, los niveles de ABA disminuyen drásticamente y rápidamente a valores significativamente bajos.

Si bien los niveles endógenos de ABA son esenciales para inducir la dormición de la semilla y el mantenimiento de dicha dormición está correlacionado con la síntesis *de novo* de ABA durante la inbibición, los bajos niveles de ABA no serían suficientes para promover la germinación. En este sentido se ha observado que varias hormonas tales como GAs, BR y etileno pueden promover la germinación de *Arabidopsis*, y que mutaciones que afectan a cada una de estas vías reducen la capacidad germinativa en la presencia de ABA exógeno (Beaudoin *et al.* 2000, Ghassemian *et al.* 2000, Steber *et al.* 1998, Steber y McCourt 2001). Otro ejemplo de interacción hormonal durante la germinación, lo constituye el antagonismo entre ABA y GAs durante la germinación de semillas de cebada, donde el embrión sintetiza y secreta a la capa de aleurona GAs, las cuales inducen la transcripción de genes que codifican α -amilasa y proteasas (Lovegrove y Hooley 2000). La expresión de estos genes es suprimida por ABA durante el desarrollo de la semilla o bajo condiciones desfavorables para la germinación (Gómez-Cadenas *et al.* 2001). También, se ha encontrado en semillas germinantes de sorgo que el ABA disminuye la expresión de genes que codifican GA 20-oxidasas (Perez-Flores *et al.* 2003).

Una vez que la plántula ha emergido, el rol fisiológico del ABA en el control del crecimiento caulinar es mucho menos conocido. Sin embargo, y al igual que lo observado durante la germinación, frecuentemente se ha propuesto que el ABA regularía el crecimiento del tallo en antagonismo con las GAs. Se ha sugerido que la acción inhibitoria del ABA sobre el crecimiento involucraría una limitada extensibilidad de la pared celular (Kutschera y Schopfer 1986), así como también la detención del ciclo celular en la fase G1, con la consiguiente inhibición de la división celular (Liu *et al.* 1994). En otros casos, en cambio, en que se ha observado un efecto promotor del crecimiento por aplicaciones de ABA, es posible que los efectos de la hormona se deban más al mantenimiento de la turgencia (al disminuir el déficit hídrico temporario por cierre estomático) que a un efecto directo de este inhibidor sobre la elongación caulinar (Sansberro *et al.* 2004).

En plantas de arroz, la elongación del tallo en respuesta a condiciones de anegamiento constituye parte del mecanismo fisiológico que determina la supervivencia del vegetal. Dicha respuesta de crecimiento es mediada al menos por tres fitohormonas, etileno, GAs y ABA.

Estas hormonas determinan un incremento de la elongación del entrenudo. En tal sentido, se ha visto que en plántulas de arroz las condiciones hipóxicas de anegamiento conducen a un incremento en la biosíntesis de etileno en el meristema intercalar y zona de elongación del entrenudo. Esta alta concentración de etileno causa una disminución en los niveles de ABA del entrenudo, al tiempo que aumentan tanto los niveles de GA₁, como la sensibilidad de los tejidos del entrenudo a las GAs (Vriezen *et al.* 2003). De forma similar, plantas de *Rumex palustris* frente a estrés por inundación muestran un fuerte incremento en la tasa de crecimiento de pecíolos jóvenes. Al igual que en *Oriza sativa*, esta respuesta adaptativa está mediada por un aumento en el contenido de etileno de los tejidos, así como también una rápida y fuerte disminución de los niveles de ABA. Se especula que esta disminución del ABA endógeno podría estimular la acidificación de la pared celular, proceso importante para inducir la elongación celular durante las primeras horas de respuesta, y la síntesis de nuevos compuestos de pared a través de la actividad α -amilasa. Si bien las GAs no participan durante la etapa temprana de elongación de los pecíolos foliares, se observó un incremento en la concentración de GA₁ luego de 6 h de inmersión de los mismos (Voesenek *et al.* 2003).

Es necesario destacar que, bajo condiciones no estresantes, la concentración de ABA en los tejidos se mantiene en niveles relativamente bajos, niveles que serían requeridos para el crecimiento normal de la planta, como pudo ser observado en plantas deficientes de ABA cuyo fenotipo achaparrado pudo ser revertido mediante la aplicación exógena de esta fitohormona (Finkelstein y Rock 2002).

Se ha observado un efecto opuesto entre el ABA y las GAs sobre la expresión de genes participantes en el control del crecimiento caulinar. Estas fitohormonas regulan la expresión del gen *GAST1* (GA-stimulated transcript) de tomate, el cual sería principalmente activo en tallos. Mientras la aplicación exógena de GA₃ incrementó la tasa de transcripción de *GAST1*, el tratamiento con ABA bloqueó su efecto (Shi *et al.* 1992, Shi y Olszewski 1998).

1.8. Auxinas

Las auxinas participan en la regulación de numerosos procesos fisiológicos del crecimiento y desarrollo vegetal (Crozier *et al.* 2000, Davies 1995). Si bien la mayor parte de las investigaciones se han centrado en el estudio de la principal auxina libre, el ácido indol-3-

acético (IAA), existen además otras auxinas en plantas tales como IBA (ácido indol-3-butírico) que comprende aproximadamente el 25-30% del total de auxinas libres en plántulas de *Arabidopsis* (Ludwing-Muller *et al.* 1993), 4Cl-IAA (ácido indol 4-cloro-3-acético) derivado halogenado de IAA, y otras auxinas derivadas de ácidos fenólicos tales como PAA (ácido fenilacético), las que presentan menor actividad que las auxinas indólicas (Davies 1995).

I.8.a. Biosíntesis

A pesar del amplio conocimiento sobre los roles fisiológicos e importancia de las auxinas en el control del crecimiento y desarrollo vegetal, aún se desconoce bastante sobre la ruta biosintética que conduce a la formación de la auxina más abundante en plantas, IAA, debido probablemente a la existencia de múltiples vías y/o redundancia funcional de varias enzimas participantes en dicha ruta de síntesis (Normanly y Bartel 1999).

Mediante experimentos genéticos y bioquímicos se ha demostrado la existencia en plantas de dos vías diferentes de síntesis de IAA; una dependiente de triptofano que opera a través de la decarboxilación oxidativa y deaminación de triptofano, y otra independiente de triptofano en la cual el IAA se sintetiza a partir de un precursor de la ruta biosintética de dicho aminoácido (**Figura 16**, Ljung *et al.* 2002). Se piensa que la co-existencia de estas dos rutas de síntesis de auxinas permitiría a la planta el control de los niveles de dichas hormonas en diferentes estados del desarrollo y/o distintos órganos de la planta (Müller *et al.* 1998, Östin *et al.* 1999).

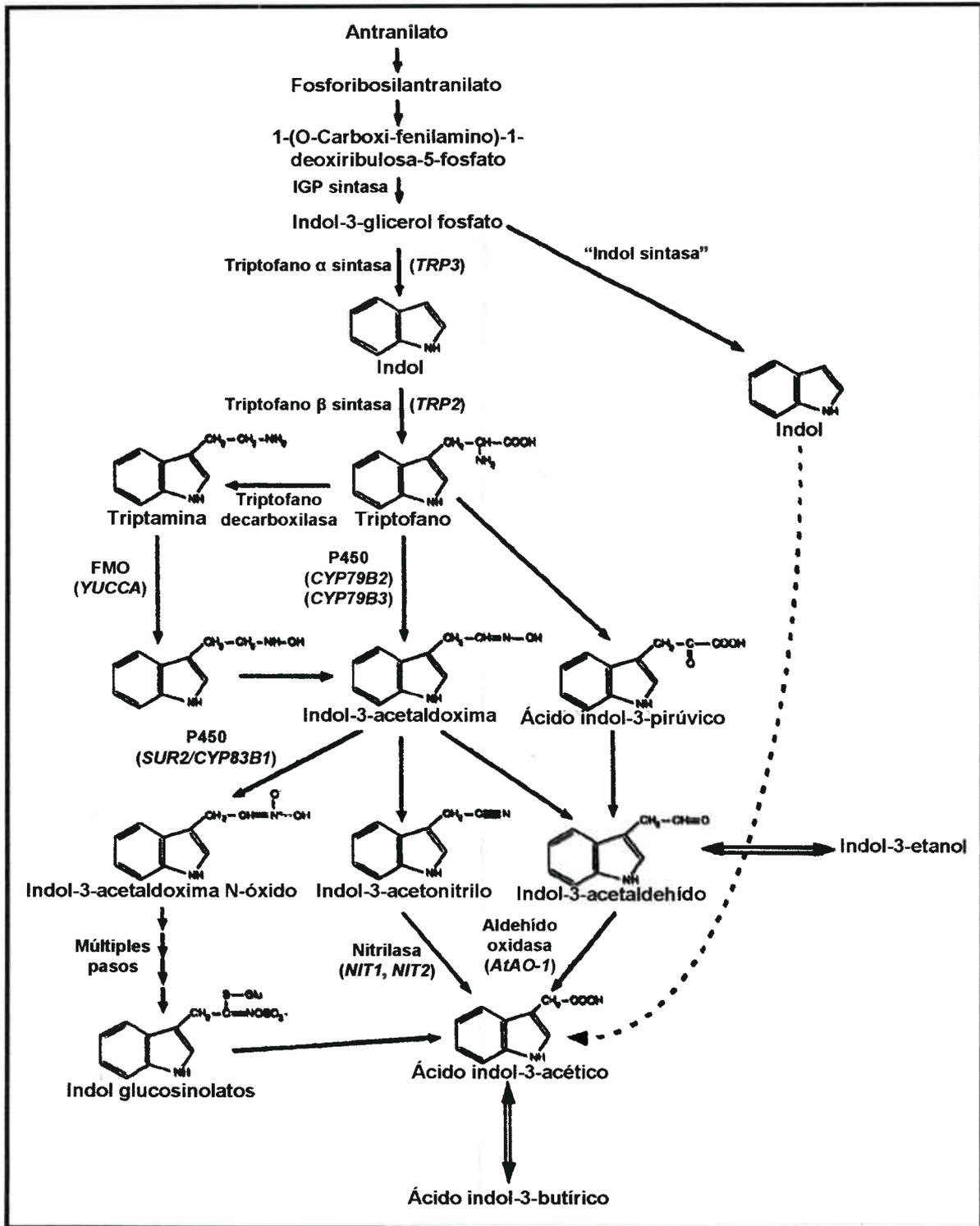


Figura 16. Ruta biosintética de IAA en *Arabidopsis thaliana*; mostrando aquellos genes y actividades enzimáticas identificadas en esta especie. La flecha punteada indica la vía de síntesis de IAA independiente de triptofano. Tomada de Ljung *et al.* 2002.

En plantas, al igual que lo observado en microorganismos, el triptofano es sintetizado a partir de corismato a través de la formación de una serie de compuestos intermediarios que incluyen, entre otros, indol-3-glicerol fosfato (IGP) e indol (Figura 17). A partir de experimentos realizados con *Arabidopsis* se ha sugerido que existirían dos vías independientes de síntesis de indol (Figura 17), una destinada a la formación de triptofano y regulada por el complejo enzimático TS (tryptophan synthase) que cataliza la conversión de IGP a indol (y de este último a triptofano), y otra destinada a la biosíntesis de metabolitos secundarios, incluyendo al IAA, que sería catalizada por una indol sintasa posiblemente homóloga a TSA1 (subunidad α del complejo enzimático TS, Ouyang *et al.* 2000).

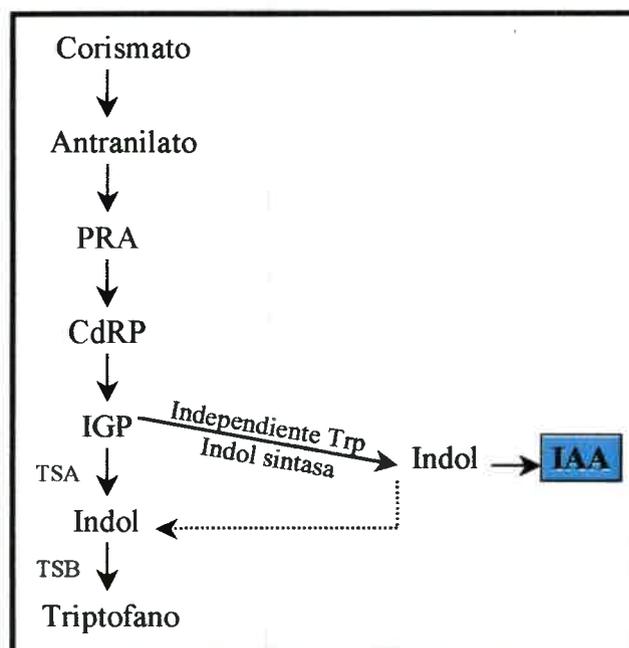


Figura 17. Biosíntesis de IAA independiente de triptofano en *Arabidopsis thaliana*. Se muestran los pasos metabólicos de formación de triptofano y la conversión de IGP a indol para la síntesis de IAA. La conversión de IGP a indol es catalizada tanto por la subunidad TS α (TSA) del complejo TS para la síntesis de triptofano; como por la proteína tipo TSA (indol sintasa) para la biosíntesis de IAA independiente al triptofano. Trp, triptofano; PRA, 5-fosforibosilantranilato; CdRP, 1-(O-carboxifenilamina)-1-desoxiribulosa-5-fosfato; IGP, indol-3-glicerolfosfato. Tomado de Ouyang *et al.* 2000.

En plantas, al menos tres rutas de síntesis de IAA a partir de triptofano serían activas: la vía del ácido indol pirúvico, la vía de la triptamina y, finalmente, la ruta de la indol cetoxima (Figura 16, Cohen *et al.* 2003, Ljung *et al.* 2002). La sustitución del grupo amino del triptofano por oxígeno conduce a la formación del compuesto intermediario ácido indol-3-

pirúvico (IPA). Si bien en bacterias y hongos han sido identificados algunos genes participantes en esta vía metabólica, aún no se han identificado en plantas homólogos que codifiquen estas enzimas con actividad amonitransferasa. Sin embargo, se sabe que el IPA se formaría en plantas como intermediario que luego por descarboxilación es convertido a indol-3-acetaldehído (IAA1d, Zazimalova y Napier 2003).

La reciente caracterización en *Arabidopsis* de una flavina monooxigenasa codificada por el gen *YUCCA*, permitió definir claramente una nueva ruta para la síntesis de IAA a partir de triptofano, en la cual dicha enzima cataliza la hidroxilación de triptamina a *N*-hidroxil triptamina, compuesto que luego es convertido a indol-3-acetaldoxima (IAOx) mediante otra reacción de hidroxilación (**Figura 16**, Zhao *et al.* 2001).

El triptofano puede ser convertido directamente a IAOx a través de la acción de dos enzimas citocromo P450s, identificadas en *Arabidopsis* como CYP79B2 y B3 (**Figura 16**, Hull *et al.* 2000). El IAOx puede dar como producto tanto IAA1d, que sirve como sustrato para aldehído oxidasas que sintetizan IAA (Normanly y Bartel, 1999), como así también indol-3-acetonitrilo (IAN) que tras la actividad de nitrilasas puede ser también convertido a IAA (Ljung *et al.* 2002).

En *Arabidopsis*, el IAOx sirve como sustrato de otra enzima citocromo P450 identificada, CYP83B1, que es la responsable de la incorporación del núcleo indol a la ruta de síntesis de glucosinolatos, vía la formación de indol-3-glucosinolato (**Figura 16**, Bak *et al.* 2001). Aunque este último compuesto actuaría principalmente como una molécula de reserva, también podría contribuir al pool de IAA libre a través de la acción de diferentes enzimas. Estudios recientes utilizando mutantes de *Arabidopsis* sugirieron que la vía de síntesis de los glucosinolatos contribuye a la regulación de la biosíntesis de IAA, modulando la disponibilidad de IAOx, considerado como el compuesto limitante de dicha ruta de síntesis (Bak *et al.* 2001).

Se cuenta con escasa información acerca de los mecanismos que regulan la biosíntesis de IAA en plantas. Recientemente se ha demostrado que los niveles de IAA serían controlados por un mecanismo de retro-alimentación negativa (Ljung *et al.* 2001, Ribnicky *et al.* 1996). El tratamiento de plántulas de *Arabidopsis* con el inhibidor del transporte de auxinas, NPA, produjo un aumento significativo de los niveles de IAA en hojas en expansión, sin embargo luego de alcanzar un máximo en el contenido de dicha hormona (16 h luego del inicio de

tratamiento), los niveles de IAA comenzaron a disminuir, lo que estaría indicando el inicio de una inhibición de la síntesis de IAA en este tejido por retroalimentación negativa (Ljung *et al.* 2001).

En diferentes especies vegetales, se ha visto que las plántulas dependen de las formas conjugadas de IAA como las principales fuentes de IAA libre durante los primeros días de germinación, y que la síntesis *de novo* de dicha hormona se iniciaría más tarde durante el crecimiento de la plántula (Bialek *et al.* 1992). Si bien se ha propuesto que las hojas jóvenes constituirían la fuente más importante de IAA para el crecimiento y desarrollo de la planta, se han realizado escasas investigaciones para verificar dicha hipótesis. Experimentos realizados con plántulas de *Arabidopsis*, han permitido identificar aquellos órganos con capacidad de síntesis *de novo* de IAA (Ljung *et al.* 2001). Como se esperaba, las hojas jóvenes en desarrollo (con altas tasas de división y expansión celular) mostraron la mayor capacidad de síntesis de IAA, sin embargo todas las partes de la plántula de *Arabidopsis* incluyendo cotiledones, hojas en expansión y tejido radical, tienen capacidad de sintetizar dicha hormona. En el caso del sistema radical, se observó que dicho tejido es capaz de sintetizar su propio pool de IAA, el cual constituye aproximadamente el 33% del total de IAA de la plántula. Los cotiledones tienen una capacidad relativamente alta de síntesis *de novo* de IAA, lo cual hace posible que éstos sirvan como una fuente importante de dicha hormona durante los estadios tempranos del desarrollo o bajo determinadas circunstancias cuando otras fuentes de IAA, tales como las hojas, no se desarrollan normalmente (Ljung *et al.* 2001).

1.8.b. Metabolismo del IAA

El IAA regula numerosos procesos del crecimiento y desarrollo a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta. Diferentes mecanismos mantienen el pool de IAA en un nivel “óptimo” para el crecimiento y desarrollo normales de la planta. El balance entre biosíntesis, conjugación, degradación y transporte determinará el nivel de IAA en un tejido específico (Ljung *et al.* 2002). El proceso degradativo de IAA involucra principalmente reacciones de oxidación, que pueden modificar tanto el anillo indol como la cadena lateral de la molécula de IAA. Un ejemplo de ello lo constituye el catabolismo decarboxilativo del IAA, cuyas complejas reacciones son catalizadas por una amplia variedad de peroxidasas vegetales

conocidos como IAA oxidasas. Si bien se han identificado *in vitro* numerosos productos de esta ruta catabólica, sólo algunos de ellos (ej. Indol-3-metanol) han sido identificados en plantas (Chevolleau *et al.* 1997). Sumado esto, a los bajos niveles de estos compuestos encontrados en distintas especies vegetales, hace suponer que esta vía degradativa de IAA no sería el principal mecanismo para regular los niveles de dicha hormona *in vivo*. La oxidación no-decarboxilativa del anillo indol, constituye la ruta catabólica más importante encargada de regular los niveles de auxinas libres en *Arabidopsis* (Östin *et al.* 1998). Vías similares han sido descritas en otras especies vegetales, observándose una amplia variedad de compuestos como productos oxidativos finales de dichas vías (Ljung *et al.* 2002).

El proceso de conjugación constituye otro proceso importante que regula los niveles de IAA libre de un tejido en una determinada etapa ontogénica de la planta. Las formas conjugadas de IAA, descritas en una amplia variedad de especies vegetales, pueden ser divididas en dos grandes grupos: conjugados tipo éster, en los que el grupo carboxilo de la molécula de IAA se une mediante esterificación a distintos azúcares (ej. glucosa) o polialcoholes cíclicos (ej. inositol) y conjugados donde el grupo carboxilo del IAA forma una unión amida con aminoácidos o polipéptidos (Bandurski *et al.* 1995). Si bien la mayor parte de las formas conjugadas de IAA se caracterizan por ser reversibles y cumplen en la planta funciones de transporte, almacenaje y fuente de IAA libre mediante hidrólisis; otros en cambio, que no pueden ser hidrolizados, sirven principalmente como intermediarios para el catabolismo de IAA, removiendo permanentemente dicho compuesto del pool de IAA libre (Bartel *et al.* 1997).

I.8.c. Transporte de IAA e inhibidores del transporte de auxinas

La peculiaridad más notable del transporte auxínico es que se realiza en forma polar. Tanto el transporte polar célula-célula de IAA, como el transporte a través del floema que ocurre a nivel de las células parenquimáticas vecinas a los haces vasculares, serían mediados por proteínas transportadoras específicas (Bennett *et al.* 1996, Gälweiler *et al.* 1998, Jones 1998).

Bennett *et al.* (1996) revelaron la identidad de la primera proteína transportadora (importadora) de auxina, AUX1. Dos años más tarde, cuatro grupos de investigadores aislaron

simultáneamente genes que codifican proteínas exportadoras de auxinas, entre los cuales, el gen *PIN1* (Gälweiler *et al.* 1998) fue el primer integrante de una amplia familia multigénica en ser caracterizado (Jones 1998).

Se han propuesto distintos mecanismos para explicar el transporte polar célula-célula de auxinas (**Figuras 18a y b**, Baluska *et al.* 2003). Una posibilidad sería que las auxinas son transportadas activamente a través de la membrana plasmática mediante proteínas transportadoras específicas (**Figura 18a**); sin embargo, no se ha podido probar aún la existencia de este mecanismo en plantas. Otra posibilidad, que ha surgido recientemente y que se apoya en el modelo de transporte de los neurotransmisores, es aquel donde los transportadores de auxinas serían los encargados de mediar la incorporación de dicha hormona dentro de vesículas endosomales derivadas de la membrana plasmática o del endosoma, de esta manera el transporte polar célula-célula involucraría la secreción de auxinas a través del tráfico vesicular (**Figura 18b**). En concordancia con este modelo, se observó que el transportador de auxina PIN1 se localiza no sólo en la membrana plasmática, si no también en vesículas de reciclaje y endosomas (Geldner *et al.* 2001, Geldner *et al.* 2003).

De acuerdo con el modelo de transporte polar de auxinas basado en el tráfico vesicular, numerosos estudios *in vitro* han mostrado la activa acumulación de auxinas dentro de vesículas derivadas de la membrana plasmática (Lützelshwab *et al.* 1989). *In vivo*, el transporte polar de auxinas se acompañaría por la existencia de vesículas secretoras derivadas del endosoma que serían recicladas en la región apical de la membrana plasmática, permitiendo así una exportación de auxinas de tipo secretora (**Figura 18b**). Más aún, con el objeto de aumentar la polaridad del transporte célula-célula de auxinas sería posible que la exportación de dicha hormona fuera realizada a través de un proceso de exocitosis, basado en el reciclaje de vesículas, que ocurriría en un polo de la célula; mientras que la importación de auxinas estaría estrechamente relacionada con un proceso de endocitosis en el extremo opuesto (Baluska *et al.* 2003). Este modelo podría explicar así, la existencia de dos poblaciones de vesículas que acumulan auxinas, las vesículas secretoras con transportadores PIN1 y aquellas con transportadores AUX1 (Swarup *et al.* 2001). Estas dos poblaciones vesiculares se integrarían a través de endosomas móviles y del citoesqueleto de actina, en el cual los filamentos de actina se ensamblan formando ejes longitudinales que interconectan los polos apical y basal de las células en elongación (Waller *et al.* 2002).

Existen inhibidores sintéticos tales como NPA (ácido *N-1*-naftiltalamico) y TIBA (ácido 2,3,5-triidobenzoico) que inhiben el transporte polar de auxina en la planta (Muday y DeLong 2001). Si bien aún no se conoce claramente el mecanismo de acción de estos compuestos, se cree que ellos bloquearían el transporte de auxinas alterando el reciclaje de las proteínas transportadoras de dicha hormona hacia y desde la membrana plasmática (Geldner *et al.* 2001, Muday y DeLong 2001).

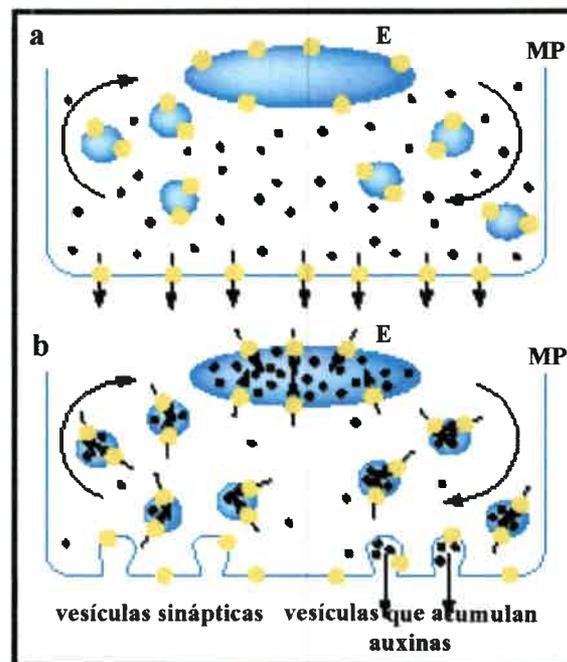


Figura 18. Modelo de reciclaje de PIN1 en el polo apical de una célula hipotética de raíz. El transportador vesicular PIN1 (círculos amarillos) se recicla entre el polo apical de la membrana plasmática (MP) y el endosoma (E). **a**, Modelo convencional, donde PIN1 media el transporte (indicado con flechas) de auxinas (puntos negros) sólo cuando esta localizada en la membrana. **b**, Nuevo modelo, donde PIN1 es el transportador vesicular que media la incorporación de auxinas (puntos negros) desde el citoplasma a vesículas o endosomas. En este caso, la localización de PIN1 en la membrana plasmática es sólo transitoria debido a su secreción vesicular y rápido reciclaje dentro de membranas internas. Tomado de Baluska *et al.* 2003.

I.8.d. Efectos fisiológicos

Las auxinas están involucradas en el control de numerosos procesos del crecimiento y desarrollo vegetal tales como, división y expansión celular, diferenciación del tejido vascular, crecimiento de raíces y hojas, maduración del fruto, así como también intervienen en las respuestas fototrópicas y gravitropicas del crecimiento, regulan dominancia apical, promueven

la formación de raíces laterales, retrasan abscisión de hojas y frutos (Crozier *et al.* 2000, Davies 1995).

La división celular es un proceso importante en los primordios foliares y hojas jóvenes en desarrollo. Cuando la lámina foliar alcanza una cierta longitud, dependiendo la especie, la división celular cesa y así el crecimiento foliar depende exclusivamente del proceso de expansión celular, etapa en la cual se diferencia el tejido vascular (Ljung *et al.* 2001). Se ha visto que la división celular cesa en una forma basípeta, desde el ápice a la base de la lámina foliar, en plantas de distintas especies tales como *Arabidopsis*, girasol y tabaco (Granier y Tardieu 1998, Ljung *et al.* 2001). En este sentido, en diversos estudios se ha analizado la participación del IAA en el control de los procesos de división y expansión de células foliares. En plántulas de *Arabidopsis*, el contenido de IAA es significativamente alto en hojas con elevadas tasas de división celular, comparado a aquellos niveles de hojas en expansión. De forma similar, un análisis espacial de los niveles de IAA en el mesófilo de hojas de tabaco en expansión, mostró que los niveles más altos de IAA están estrictamente correlacionados con aquellas áreas donde la tasa de división celular es mayor. Mostrando además, que los niveles de IAA del mesófilo disminuyen siguiendo la progresión basípeta de expansión celular (Ljung *et al.* 2001). Se cree que el IAA estaría involucrado en el control de la expansión de células foliares, a través de la acción de proteínas específicas, expansinas, participantes en el ablandamiento de la pared celular (Cosgrove 2000).

I.9. Brasinoesteroides y etileno en el proceso de de-etiolación

Además de GAs, IAA y ABA, otras fitohormonas como los brasinoesteroides (BR) y el etileno podrían estar involucrados en la regulación del proceso de de-etiolación (Chory y Li 1997, Kraepiel y Miginiac 1997, Nemhauser y Chory 2002). Algunos estudios han sugerido que los BR tendrían un rol regulatorio negativo en la de-etiolación. Esta idea está fundamentada en el hecho que numerosos mutantes de *Arabidopsis* y tomate deficientes tanto en la síntesis como en la respuesta a brasinólido (BL) presentan un fenotipo de-etiolado cuando crecen en condiciones de oscuridad, y que la aplicación exógena de BL es capaz de restaurar el fenotipo etiolado silvestre de aquellos mutantes deficientes en la síntesis (Bishop *et al.* 1999, Chory *et al.* 1996, Chory y Li 1997, Li *et al.* 1996). En concordancia con estos

resultados, se ha visto en *Arabidopsis* que la expresión de genes regulados por luz es estimulada en condiciones de oscuridad tanto en mutantes deficientes en BL como en plantas silvestres tratadas con un inhibidor de la síntesis de este compuesto (Chory *et al.* 1991, Li *et al.* 1996, Szekeres *et al.* 1996, Asami *et al.* 2000). Sin embargo, no se cuenta hasta la fecha con mediciones del contenido endógeno de BR en plantas de *Arabidopsis* crecidas en luz y oscuridad, datos que serían cruciales para apoyar o refutar la hipótesis de que los niveles de BR tienen un rol regulatorio negativo en el proceso de de-etiolación en esta especie.

La hipótesis de que los niveles de BR tienen un rol regulatorio negativo en la de-etiolación implicaría que los niveles endógenos de moléculas bioactivas deberían disminuir cuando las plantas etioladas son expuestas a luz. Sin embargo, en estudios con plántulas silvestres de arveja crecidas 5 d en luz blanca se incrementaron los niveles de BL y su precursor directo, CS (Castasterona. BL y CS son los únicos BR con actividad biológica *per se* identificados hasta el momento. Symons *et al.* 2002, Yokota 1997) comparado con plántulas crecidas en oscuridad. Resultados similares se obtuvieron en plántulas etioladas de arveja que fueron transferidas a luz blanca por 24 h (Symons *et al.* 2002). Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de una reducción transitoria en los niveles de BR en plántulas etioladas de arveja expuestas a luz. Existen evidencias indirectas que indicarían que los niveles de BR no tendrían un rol regulatorio negativo en la de-etiolación en esta especie. Mutantes de arveja deficientes en BR no presentan un fenotipo de-etiolado ni alterada expresión de genes regulados por luz cuando crecen en condiciones de oscuridad (Symons *et al.* 2002). Además, plantas silvestres de arveja tratadas con un inhibidor de la síntesis de BR no muestran un fenotipo de-etiolado cuando crecen en oscuridad (Symons *et al.* 2002).

Se conoce que el proceso de de-etiolación en plántulas de arveja involucra una reducción inicial en el contenido de GA₁ (principal GA activa sobre alargamiento caulinar en *Pisum sativum*, Ait-Ali *et al.* 1999, Gil y García-Martínez 2000, Reid *et al.* 2002), seguida por un restablecimiento de dichos niveles hormonales a valores suficientes u “homeostáticos” y un concomitante cambio en la sensibilidad de los tejidos a las GAs activas (O’Neill *et al.* 2000, Reid 1988). En base a estos antecedentes, Symons y Reid (2003) analizaron la cinética de cambios en los niveles endógenos de BR en plántulas etioladas silvestres de arveja transferidas a luz blanca continua por un período de 4 d. Mediante análisis por GC-MS-SIM mostraron niveles similares de CS y de 6-DeoxoCS (principal precursor de CS) tanto en plántulas de-

etioladas como crecidas en oscuridad, lo que sugiere que en arveja una inhibición en la biosíntesis de BR no sería necesaria para la transición de un desarrollo etiolado a uno de-etiolado. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de una disminución en los niveles de BL en plántulas etioladas de arveja transferidas a luz. Se ha propuesto que BL presentaría una mayor actividad biológica comparado a CS (Symons y Reid 2003, Yokota 1999), por lo que sería fundamental tener datos sobre los cambios en los niveles endógenos de este regulador durante la transición de un crecimiento etiolado a uno de-etiolado. En este sentido, han fallado los únicos dos intentos hasta el momento de cuantificar los niveles de BL en *P.sativum*, en los cuales los niveles hormonales estuvieron por debajo de los límites de detección de los equipos utilizados (Kang *et al.* 2001, Symons y Reid 2003).

La falta de evidencias sobre una disminución en los niveles de BR luego de que plántulas etioladas de arveja son transferidas a condiciones lumínicas, hacen pensar en la posibilidad que los cambios morfológicos durante la de-etiolación sean mediados por una disminución en la respuesta a estas hormonas. Sin embargo, se vio que la respuesta de elongación del epicótilo a la aplicación exógena de BL fue significativamente mayor en plántulas crecidas en luz o de-etioladas comparadas a aquellas crecidas en oscuridad (Symons y Reid 2003), lo que sugiere que a diferencia de lo observado para GA₁ (O'Neill *et al.* 2000), la fotoinhibición del crecimiento del epicótilo en *P.sativum* no parece ser mediada por una disminución de la respuesta de los tejidos a BR.

Con el objeto de analizar la participación de los BR en la cascada de señales desencadenada por el receptor *cry1* se analizaron en el presente trabajo, ensayos de crecimiento de plántulas silvestres y mutantes *cry1* tratadas con distintas concentraciones de BL (**Figura 33**). Los resultados obtenidos en estos experimentos con *Arabidopsis* concuerdan con los encontrados por Symons y Reid (2003) en cuanto a que la fotoinhibición del crecimiento del hipocótilo mediada por *cry1* no parece involucrar una disminución de la respuesta de los tejidos del tallo a BR. Mientras que la aplicación de BL no produjo efecto alguno sobre la elongación del hipocótilo de mutantes *cry1* crecidos en LA, en cambio, las concentraciones más altas de BL utilizadas fueron capaces de producir un significativo efecto estimulador sobre el crecimiento de plántulas silvestres (**Figura 33**). Sin embargo, es necesario destacar que tanto las plántulas silvestres como la de mutantes *cry1* crecidas 3 d en LA con la aplicación de BL exhibieron un hipocótilo significativamente "ondulado" y

acompañado en algunos casos por un color amarillento pálido, hecho que hace pensar en un posible efecto del etileno sobre el crecimiento.

Se sabe que el gas etileno regula la expansión celular de una manera dependiente del tejido y de la luz. En la oscuridad el etileno inhibe la elongación celular, mientras que en condiciones lumínicas promueve la apertura del gancho apical (proceso que involucra expansión celular) y la elongación del hipocótilo (Raz y Ecker 1999, Smalle *et al.* 1997). Estudios indican una interacción entre la síntesis de etileno y BR. En este sentido se ha visto que BL promueve la expresión de genes que codifican para una ACC sintasa (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa), lo que resulta en un aumento endógeno de etileno (Nemhauser y Chory 2002). Además, la aplicación exógena de BL estimularía la producción de etileno en epicótilos de arveja crecidos en oscuridad (Brosa 1999, Symons y Reid 2003). Estos antecedentes nos llevan a pensar que posiblemente la elongación del hipocótilo observada en plántulas silvestres de *Arabidopsis* tratadas con BL (**Figura 33**) pueda ser en parte la consecuencia de una producción de etileno inducida por este regulador, y no exclusivamente el efecto directo de la aplicación de este BR activo sobre el crecimiento. Cabe destacar que ensayos de crecimiento realizados en plántulas de lechuga con la aplicación de distintas concentraciones de CoCl_2 , el cual bloquea la conversión de ACC a etileno al inhibir la acción de la “enzima formadora de etileno” EFE, y del inhibidor específico de la acción del etileno, STS, no mostraron un efecto significativo en el crecimiento del hipocótilo tanto en plántulas crecidas 3 d en LA como en oscuridad (Pontin M, Luna V y Bottini R, resultados no publicados).

Un análisis de la participación de los BR en la respuesta inhibitoria del crecimiento inducida por cry1, implicaría tanto la realización de ensayos de crecimiento como de mediciones de los niveles de BR y, como vimos, de la producción de etileno. La imposibilidad de contar con los correspondientes deuterados para la cuantificación de formas bioactivas de BR hizo que el análisis de la respuesta de crecimiento inducida por cry1 se centrara en el estudio del efecto de este receptor sobre los niveles de GAs, IAA y ABA. Sin embargo, sería interesante en un futuro estudiar la participación tanto del etileno como de los BR en la respuesta de inhibición del crecimiento mediada por cry1; lo que además brindaría importante información sobre el supuesto de que los BR, a diferencia de los observado en *P. sativum*

(Symons *et al.* 2002, Symons y Reid 2003), tendrían un rol regulatorio negativo en el proceso de de-etiolación de *Arabidopsis* (Bishop *et al.* 1999, Chory *et al.* 1996, Chory y Li 1997, Kang *et al.* 2001, Li *et al.* 1996).

I.10. PLANTEO DE LA HIPÓTESIS DE TRABAJO

En los últimos años se han realizado muchos esfuerzos para definir la compleja red de eventos (iniciados por los receptores de LA) que median entre la información lumínica percibida por los criptocromos y una determinada respuesta fotomorfológica, como es el caso de la inhibición del crecimiento del tallo. Se han propuesto al menos dos formas por las cuales los criptocromos podrían desencadenar esta respuesta del crecimiento (Lin y Shalitin 2003). Una posibilidad es que el fotorreceptor pueda amplificar la señal lumínica por medio de la acción de mensajeros secundarios citosólicos (Folta *et al.* 2003, Guo *et al.* 2001, Long y Jenkins 1998) que alterarían la actividad celular. Otra posibilidad es que la presencia del receptor en el núcleo haría posible la interacción directa de éste con un aparato regulador de la transcripción, o aún postranscripcional, afectando así la expresión de genes involucrados en el desarrollo vegetal (Lin 2002a). En *Arabidopsis*, las evidencias disponibles apoyarían la existencia de ambos mecanismos. En estudios farmacológicos y electrofisiológicos realizados con plántulas de *A. thaliana* se demostró que la rápida activación de canales aniónicos (que depolarizan transitoriamente la membrana plasmática) sería necesaria para el comienzo de la inhibición del crecimiento controlada por el complejo cry1/cry2/phot1; sin embargo, otros mecanismos tales como los cambios en la expresión de genes involucrados en el control de la extensibilidad y relajación de la pared celular y/o variación de los niveles hormonales endógenos y la sensibilidad de los tejidos a estos reguladores, serían responsables de mantener dicha respuesta durante la “fase criptocromo” o fase dependiente de cry1 (Folta y Spalding 2001a, Parks *et al.* 1998, Spalding 2000). En experimentos con microarreglos se ha evidenciado que la LA induce cambios en la expresión de aproximadamente un tercio de los genes de *Arabidopsis*, y que los criptocromos son los principales receptores que median estas alteraciones en los patrones de expresión (Ma *et al.* 2001). Por otro lado, numerosos estudios indican la participación de las fitohormonas GAs , IAA , ABA , BR y etileno (Baraldi *et al.* 1995, Clúa *et al.* 1996, Crozier *et al.* 2000, Davies 1995, Shibaoka 1994, Volmaro *et al.* 1998)

en el control del alargamiento caulinar; existiendo evidencias de una interacción entre estos tipos de hormonas sobre elongación (Bouquin *et al.* 2001, Goda *et al.* 2002 y 2004, Grossmann y Hansen 2001, Mussing *et al.* 2002, Nemhauser *et al.* 2004, O'Neill y Ross 2002, Ross *et al.* 2000, 2002 y 2003, Volmaro *et al.* 1998).

En cuanto a la respuesta fotomorfogénica de de-etiolación representada como la inhibición de la elongación de las células del epi/hipocótilo, no es clara la interrelación entre las fitohormonas y el crecimiento regulado por la luz. En este sentido, se cuenta con algunos estudios realizados principalmente en *Pisum sativum* (Ait-Ali *et al.* 1999, Behringer y Davies 1992, Gil y García-Martínez 2000, O'Neill *et al.* 2000, Reid *et al.* 2002, Symons y Reid 2003, Yang *et al.* 1996), *Prunus cerasus* (Baraldi *et al.* 1995), *Zea mays* (Jones *et al.* 1991, Barker-Bridgers *et al.* 1998), *Lycopersicon esculentum* (Kraepiel *et al.* 2001), y *Lactuca sativa* (Toyomasu *et al.* 1992, Volmaro *et al.* 1998), que muestran una participación de GAs, IAA y ABA en el control del crecimiento caulinar mediado por luz. Sin embargo, en *Arabidopsis* se conoce poco acerca del papel de estas fitohormonas en el fotocontrol del crecimiento del hipocótilo (Romano *et al.* 1995, Jensen *et al.* 1998), y menos aún sobre la participación de estos reguladores específicamente en la vía de transducción de señales de los fotorreceptores de LA.

En estudios preliminares realizados con plántula de lechuga (Volmaro *et al.* 1998) demostramos que la LA inhibe la elongación del hipocótilo en relación directa con la fluencia de fotones, y que una combinación de reguladores del crecimiento, es decir GA₃, IAA y el inhibidor de la síntesis de ABA, fluridona, revirtió completamente los efectos inhibitorios de la LA, aún la expansión cotiledonar. Estos resultados se correspondieron con la variación de los niveles hormonales medidos por GC-MS-SIM. Bajo LA el contenido de ABA se incrementó al doble, mientras que los de GA₃ e IAA disminuyeron a un tercio y la mitad, respectivamente.

En base a estos antecedentes se formula la **hipótesis general** que *el receptor de LA cry1 disminuye la elongación del hipocótilo de plántulas etioladas de Arabidopsis thaliana regulando los niveles endógenos de GAs (activas y catabolitos inactivos), IAA y ABA, y que dicha regulación estaría mediada por cambios en los patrones de expresión de genes involucrados en el metabolismo de dichas hormonas.*



OBJETIVOS



OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la participación de las GAs, IAA y ABA como intermediarios en la cascada de transducción de señales que media entre la señal de luz azul percibida por *cry1* y la inhibición de la elongación del hipocótilo en plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos específicos

1. Analizar la participación de las hormonas GAs, IAA y ABA en la respuesta de elongación del hipocótilo mediada por el receptor *cry1*, de plántulas silvestres (Col) y mutantes *cry1* de *A. thaliana*; mediante la aplicación exógena de GAs y IAA, analizando además el efecto de sustancias inhibitoras de su síntesis (Prohexadiona-Ca, fluridona) y del transporte de auxinas (TIBA).
2. Medir los niveles endógenos de GAs (formas activas y catabolitos inactivos), IAA y ABA en hipocótilos de plántulas etioladas silvestres (Col) y mutantes *cry1* de *Arabidopsis thaliana*, crecidas bajo luz azul.
3. Identificar, mediante el uso de microarreglos de ADN, genes diferencialmente expresados en plántulas silvestres (Col y Ler) y mutantes *cry1* de *A. thaliana* que participarían en el control del crecimiento del hipocótilo mediado por el receptor *cry1*.

CAPÍTULO II
ACCIÓN DEL RECEPTOR CRY1 SOBRE EL NIVEL
HORMONAL



CAPITULO II

ACCIÓN DEL RECEPTOR CRY1 SOBRE EL NIVEL HORMONAL

II.1. INTRODUCCIÓN

A pesar de lo mucho que se ha estudiado la respuesta de inhibición del crecimiento inducida por LA, se conoce poco sobre los mecanismos por los cuales los receptores criptocromo regulan los cambios en el crecimiento del tallo. A partir de estudios farmacológicos y electrofisiológicos realizados en plántulas de *Arabidopsis* se ha demostrado que la activación de canales aniónicos, la cual depolariza transitoriamente la membrana plasmática dentro de segundos de exposición a LA (Cho y Spalding 1996), tiene un rol importante en la transducción de las primeras señales desencadenadas por los criptocromos y que median la fase inicial de inhibición del crecimiento regulada por *cry1/cry2* (Parks *et al.* 1998, Spalding 2000). Aparentemente, la activación de canales aniónicos es una respuesta rápida necesaria para el comienzo pero no para el mantenimiento de la inhibición del crecimiento dependiente de *cry1*. Otros mecanismos tales como cambios en la expresión de genes involucrados en el control de la extensibilidad y relajación de pared (Cho y Kende 1997, Fry *et al.* 1992, Hayashi *et al.* 1984, Li *et al.* 2002, MacQueen-Mason *et al.* 1992, Okamoto y Okamoto 1995, Refrégier *et al.* 2004) y/o variación de los niveles hormonales y sensibilidad de los tejidos a estos reguladores, serían responsables de mantener la respuesta de inhibición del crecimiento del hipocótilo. Dado que existen múltiples evidencias experimentales demostrativas de que la luz ejerce un control sobre las rutas de síntesis y respuesta a las fitohormonas (Baraldi *et al.* 1995, Barker-Bridgers *et al.* 1998, Clúa *et al.* 1996, Colon-Carmona *et al.* 2000, Jones *et al.* 1991, Symons y Reid 2003, Toyomasu *et al.* 1998, Volmaro *et al.* 1998, Yamaguchi *et al.* 1998 y 2001), podría sugerirse la existencia de distintos complejos reguladores que corresponderían a los puntos de integración entre las señales de los fotorreceptores y la de las diferentes hormonas. Estos complejos reguladores serían los responsables de activar (o reprimir) la transcripción de los gen(es) de la ruta de acción hormonal, regulados en respuesta a la señal luminosa (Cluis *et al.* 2004, Salomé Prat, comunicación personal a Pontin M).

En algunas especies, la luz regula los niveles de GAs mediante el control de su biosíntesis. Por ejemplo, el mutante de sorgo *ma3^R*, deficiente en phyB, tiene un alto contenido de GAs, lo cual sugiere que dicho receptor controlaría la biosíntesis de dicha hormona en esta especie (Foster y Morgan 1995).

O'Neill *et al.* (2000) mostraron que el nivel de la principal GA bioactiva sobre alargamiento caulinar en *Pisum sativum*, GA₁, disminuye rápidamente durante las primeras 24 h de exposición a luz blanca; para luego aumentar dicho nivel en los tallos en elongación y alcanzar niveles similares a aquellos encontrados en plantas de arveja crecidas en oscuridad. De este modo la inhibición de la elongación del tallo que continúa aún cuando los niveles de GA₁ vuelven a valores suficientes u “homeostáticos”, sería atribuible a una reducción de la sensibilidad de los tejidos en crecimiento del tallo a GA₁ (Reid 1988).

Estudios recientes (Reid *et al.* 2002, Symons y Reid 2003) han demostrado que el phyA y un receptor específico de LA controlan la de-etiolación de plantas de arveja regulando el nivel de GA₁. Los diferentes tratamientos lumínicos indujeron, dentro de las primeras 4 h de exposición, una significativa reducción en los niveles de GA₁ y un concomitante incremento en los niveles de GA₈ (catabolito inactivo de GA₁); sin que se observara, en cambio, variaciones en los niveles de los precursores de GA₁, GA₁₉ y GA₂₀, y del catabolito inactivo de la GA₂₀, GA₂₉. Estos cambios observados en los niveles hormonales parecen ser el resultado de una compleja regulación de los genes involucrados en los pasos tardíos del metabolismo de las GAs. Al respecto, Reid *et al.* (2002) observaron que la LR y LA parecen controlar tempranamente (dentro de 0,5-1 h de exposición) el nivel de GA₁ disminuyendo la expresión del gen Mendeliano *LE* (*PsGA3ox1*, el cual codifica una GA 3-oxidasa que cataliza la conversión de GA₂₀ a GA₁), y sobreexpresando el gen *PsGA2ox2* (el cual codifica una GA 2-oxidasa que inactiva a GA₁ convirtiéndola en su producto catabólico GA₈). Por el contrario, el principal gen GA 20-oxidasa, *PsGA20ox1*, que controla la conversión de GA₁₉ a GA₂₀, no parece estar bajo el control lumínico y su activación luego de 4 h de exposición a LR podría ser el resultado de un control de tipo de retroalimentación positiva. La similitud en la respuesta a LR y LA obtenidos en *P. sativum* sugiere que en esta especie, aunque dos tipos de fotorreceptores distintos (phyA y un receptor específico de LA) captan diferentes señales lumínicas, éstos compartirían una vía de transducción común que conduce a cambios similares en la expresión de los genes involucrados en la respuesta a GAs modificando así los niveles, o

la sensibilidad de los tejidos a dichas hormonas. Adicionalmente debería considerarse que la regulación de los niveles endógenos de GAs, o de cualquier hormona ácida como IAA o ABA, están además regulados por conjugación reversible, especialmente con glucosa (Piccoli *et al.* 1997, Cassán *et al.* 2001).

En los últimos años se han hecho importantes progresos en la identificación de los componentes de la vía de transducción de la señal de GAs (Sun y Gubler 2004). El modelo actual de transducción se basa en la existencia de una compleja red de reguladores transcripcionales que directa o indirectamente regulan la expresión de genes inducidos por GAs (**Figura 19**). La caracterización de mutantes tanto en la ruta de síntesis como de respuesta a las GAs, ha permitido la identificación de varios factores de transcripción que actúan como reguladores positivos (promueven la expresión de genes sensibles a GAs) o negativos (inhiben la expresión de genes sensibles a GAs) de la señal hormonal. La **Figura 19** presenta un esquema de una célula con los componentes involucrados en la transmisión de la señal de GAs, la ubicación celular y los posibles roles que desempeñarían en dicha vía. Este esquema representa los eventos que ocurren en una célula, aun cuando, hay evidencias que este proceso se desarrolla sólo en cierto tipo de células y en determinados tejidos y/u órganos que dan las respuestas a esta señal. Es importante destacar la estrecha interacción entre el metabolismo de GAs y la vía de transducción de la señal hormonal que mantiene la homeostasis de GAs en plantas (**Figura 19**, Sun y Gubler 2004).

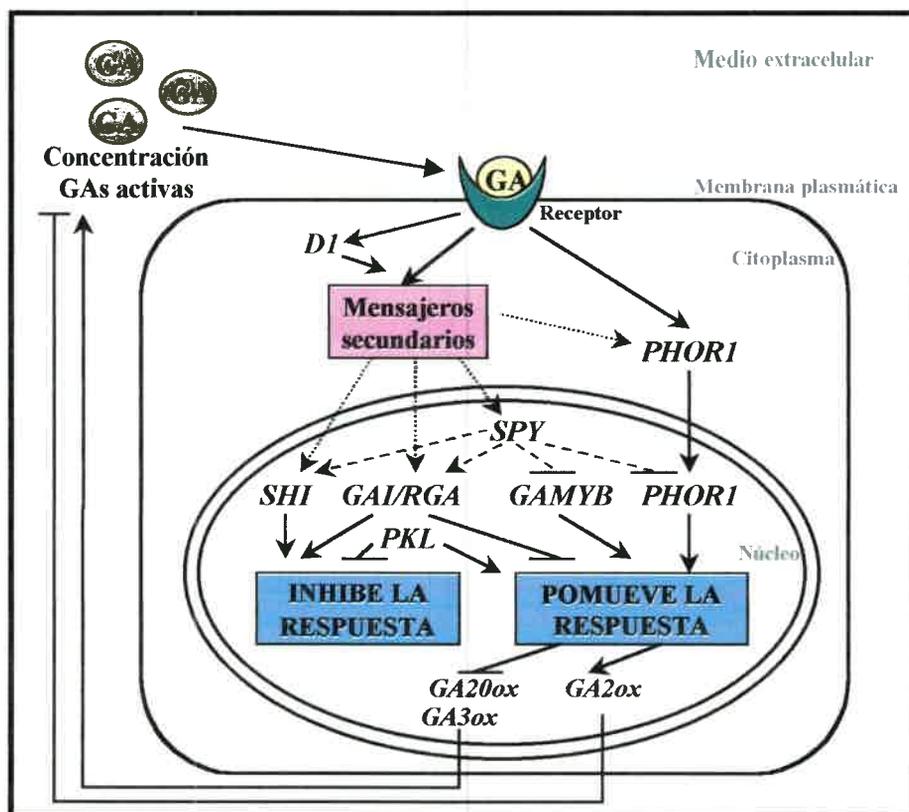


Figura 19. Componentes de la vía de transducción de la señal de GAs. El esquema muestra los posibles roles de los componentes de esta vía y su ubicación celular. Las moléculas de GAs activas se unen al receptor* (aún no identificado) lo que activa, directa o indirectamente, a los mensajeros secundarios y a la proteína G (D1). La proteína PHOR1 entra al núcleo. GAI/RGA se degradan. PKL permite la transcripción de genes de respuesta a esta hormona. SPY inhibe la vía, posiblemente, modificando a componentes de la ruta de señalización, mediante la modificación de grupos N-acetilglucosamina, en forma competitiva con quinasas que fosforilan los mismos residuos. La respuesta a GAs regula la concentración de GAs activas, mediante la modificación de los niveles de mensajeros de los genes que codifican las enzimas de síntesis (GA 20-oxidasa, GA 3 β -hidroxilasas) y de catabolismo (GA 2-oxidasa).

* El receptor de GAs se muestra asociado a membrana, sin embargo aún no ha sido identificado (Napier 2004).

El rol fisiológico del ABA en el control del crecimiento caulinar es mucho menos conocido que el de las GAs. Sin embargo, se ha propuesto frecuentemente que el ABA regularía el crecimiento del tallo en forma antagónica a las GAs. En este sentido, se ha observado un efecto opuesto entre el ABA y las GAs sobre la expresión de genes que participan en el control del crecimiento caulinar. Ambas fitohormonas regulan la expresión del gen *GAST1* de tomate, el cual sería principalmente activo en tallos (Shi *et al.* 1992). Mientras

que la aplicación de GA₃ incrementó la tasa de transcripción de *GAST1*, el tratamiento con ABA bloqueó su efecto (Shi y Olszewski 1998).

En algunas especies la luz regula los niveles de ABA controlando su metabolismo. Por ejemplo, Kraepiel *et al.* (1994) demostraron que el mutante de tabaco *pew1*, deficiente en *phyA*, tiene un contenido de ABA mayor al de plantas silvestres, y que dicho nivel elevado de ABA parece ser el resultado de la incapacidad del mutante en fitocromo en activar la degradación de esta fitohormona. En concordancia con estos resultados, Weatherwax *et al.* (1996) encontraron que la exposición de plantas etioladas de *Lemna gibba* a un breve pulso de LR, disminuyó significativamente la concentración de ABA; cuyo nivel se midió indirectamente mediante inmunoanálisis. La reversión por LRL de dicho efecto sugiere que el fitocromo puede regular negativamente los niveles de ABA. A pesar de estos estudios que indican la participación del ABA en el control de los procesos de de-etiolación y desarrollo regulados por luz, es necesario realizar mayores estudios en este campo para poder establecer una relevancia fisiológica del ABA más clara en la relación entre calidad de luz, niveles de ABA y respuesta fotomorfogénica (Kraepiel y Miginiac 1997).

Entre las fitohormonas involucradas en el crecimiento del tallo, también se ha sugerido que el IAA regularía la elongación caulinar mediada por luz. Existen evidencias de una interacción entre GAs y auxinas en producir un máximo crecimiento (Okamoto *et al.* 1995, Yang *et al.* 1996). Estudios realizados utilizando distintas especies vegetales tales como arveja, maíz y pepino (Behringer y Davies 1992, Jones *et al.* 1991, Shinkle *et al.* 1998), han proporcionado información importante acerca del posible fotocontrol del transporte y localización de las auxinas en estas especies.

Varios grupos de investigadores han sustentado la hipótesis que las células epidérmicas contienen un "pool de auxinas limitante para el crecimiento" (Behringer y Davies 1992, Jones 1992, Jones *et al.* 1991), asumiendo que las células a lo largo del tallo son igualmente sensibles a estas hormonas o, al menos, que la epidermis no es más sensible a las auxinas que los tejidos internos del tallo. Jones *et al.* (1991) demostraron que la LR disminuye el nivel de IAA difusible en las células epidérmicas de mesocótilos de maíz, y que esta disminución en los niveles de IAA sería la responsable de la disminución de la tasa de crecimiento del mesocótilo entero. Años después Barker-Bridgers *et al.* (1998) encontraron que la LR media la inhibición de la elongación del mesocótilo disminuyendo principalmente el nivel de IAA libre

de las células epidérmicas, las cuales presentan una tasa de crecimiento significativamente menor a la de células de otros tejidos de la planta, regulando en consecuencia el crecimiento del tallo. En concordancia con estos resultados, Behringer y Davies (1992) habían encontrado en plantas de arveja que la LR reducía en un 40% el nivel de IAA de los tejidos epidérmicos y en un 80% la tasa de crecimiento de los epicótilos. Estos antecedentes sugerirían que el nivel de auxinas de los tejidos epidérmicos es un factor limitante del crecimiento regulado por luz.

Algunos investigadores proponen que existe una cierta independencia entre la regulación del crecimiento inducido por luz y aquel mediado por las auxinas. En plántulas de pepino, la LR de baja intensidad ($0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la cual induce cambios en la tasa de crecimiento del hipocótilo pero preservando la “morfología etiolada”), incrementó tanto la velocidad como la intensidad del transporte de IAA en el hipocótilo, comparado con plántulas crecidas en oscuridad. Sin embargo, el patrón de capacidad de transporte a lo largo del hipocótilo no se correlacionó con el patrón de crecimiento, sugiriendo que en esta especie la LR regularía estos dos procesos a través de mecanismos independientes (Shinkle *et al.* 1998). Mediante el uso de plantas transgénicas sobreproductoras de auxinas y mutantes insensibles al IAA, Romano *et al.* (1995) demostraron en *Arabidopsis* que una modificación importante en el contenido o de la sensibilidad de los tejidos a las auxinas, no afectó el control lumínico de la elongación del hipocótilo. Sin embargo, Jensen *et al.* (1998) utilizando un inhibidor del transporte de auxinas (NPA), demostraron que dicho transporte es requerido para la elongación del hipocótilo en plántulas de *Arabidopsis* crecidas en luz pero no en condiciones de oscuridad.

En tomate, el alargamiento del hipocótilo involucra diferencialmente el transporte y la sensibilidad del tejido a las auxinas, dependiendo de las condiciones lumínicas bajo las que ocurre dicho alargamiento (Kraepiel *et al.* 2001). Mientras que el crecimiento en plántulas de etioladas parece ser independiente al transporte de auxinas y, excepto para el que ocurre bajo LR, independiente de la respuesta a auxinas (es decir bajo LA y LRL), la elongación del hipocótilo en plántulas etioladas parece estar regulada tanto por la sensibilidad como por el transporte polar de esta hormona (Kraepiel *et al.* 2001).

Los antecedentes arriba expuestos dan una idea acerca de la compleja y aún poco clara participación de las auxinas en la respuesta de elongación caulinar inducida por luz. Si bien el

aislamiento de mutaciones en genes regulados por auxinas (Hsieh *et al.* 2000) así como también, a nivel molecular, la fosforilación inducida por fitocromo de factores de transcripción inducidos por auxinas (Colon-Carmona *et al.* 2000) han aportado evidencias para una interacción directa entre estas hormonas y la vía de señales desencadenadas por la luz, todavía es necesario un estudio más acabado de estos procesos para establecer una relación clara de causalidad entre auxinas y respuesta fotomorfogénica.

Algunos estudios muestran evidencias que apoyan la existencia de una interacción entre el IAA y las GAs en el control del crecimiento del tallo. Se ha visto que la decapitación del tallo de plantas de arveja reduce significativamente la conversión de [^3H]GA₂₀ a [^3H]GA₁ (Sherriff *et al.* 1994), y consecuentemente el contenido endógeno de GA₁ del tallo (Ross *et al.* 2000). Ross *et al.* (2000) mostraron que la decapitación del tallo reduce el nivel de transcritos PsGA3ox1, al mismo tiempo que aumenta los niveles de PsGA2ox1 (el cual cataliza la conversión de GA₂₀ a su producto inactivo, GA₂₉). Estos investigadores encontraron además que los efectos de la decapitación del tallo sobre la expresión de genes involucrados en la ruta de síntesis de GAs, son completamente revertidos por la aplicación de IAA en el extremo superior de las plantas decapitadas. La implicancia de estos resultados es que en plantas intactas de arveja el IAA es transportado desde el ápice a las regiones de crecimiento del entrenudo donde, directa o indirectamente, mantiene los niveles de transcritos PsGA3ox1 y, consecuentemente, controla los niveles de GA₁. Un esquema similar fue observado en plantas de cebada, en las cuales las inflorescencias constituyen una fuente importante de IAA que es transportada basípetamente hacia los entrenudos y nudos, donde se sintetizan las GAs bioactivas para el crecimiento del tallo en esta especie (GA₁ y GA₃). Se demostró que el IAA es requerido para la síntesis normal de GAs en el tallo, al regular múltiples pasos en la etapa tardía de síntesis de estas hormonas (Wolbang *et al.* 2004).

Basado en los diferentes y variados antecedentes sobre la participación de distintos reguladores del crecimiento en el control por luz de la elongación caulinar, se ha sugerido que una compleja red de diferentes señales hormonales iniciadas por fotorreceptores específicos controlaría el crecimiento del tallo (Baraldi *et al.* 1995, Casal 2002, Volmaro *et al.* 1998). En este sentido, tanto el fitocromo como un receptor de LA controlarían, al menos en parte, la elongación del tallo en *Prunus cerasus*, modulando los niveles endógenos de GAs, IAA y ABA, como parte de un balance entre promotores e inhibidores encargado de regular el

crecimiento en esta especie (Baraldi *et al.* 1995). En *Lactuca sativa* Volmaro *et al.* (1998) encontraron que la irradiación con LA provocó en plántulas etioladas una fuerte inhibición de la elongación del hipocótilo. Si bien la aplicación individual de GA₃ o de IAA, así como también la disminución de los niveles de ABA con fluridona (inhibidor de su síntesis) fueron capaces de revertir parcialmente la de-etiolación causada por LA, una combinación de reguladores del crecimiento, GA₃, IAA y (eventualmente) fluridona, fue necesaria para suprimir completamente los efectos inhibitorios de la LA. Los resultados se correspondieron con la variación de los niveles hormonales medidos mediante cromatografía gaseosa-espectrometría de masas-monitoreo selectivo de iones (GC-MS-SIM).

Estudios recientes mostraron que un complejo patrón de cambios en los niveles de distintas fitohormonas regularía el crecimiento mediado por luz de plántulas etioladas de arveja (Symons y Reid 2003). La exposición de plántulas silvestres a luz blanca redujo significativamente los niveles de GA₁ durante las primeras horas de tratamiento; contrariamente, se midió un incremento de 2-veces el contenido de IAA en relación al control oscuridad. En ambos casos tanto los cambios en el nivel de GA₁ como de IAA fueron transitorios y, 96 h luego del comienzo de la irradiación el contenido hormonal entre plantas crecidas en luz y en oscuridad no mostraba diferencias. A diferencia de los cambios tempranos en los niveles de IAA y de GA₁ medidos en plántulas de arveja crecidas en luz, se observó una disminución tardía en los niveles de ABA.

Basado en lo descripto, la **hipótesis** de trabajo fue que *el receptor de luz azul cry1 modula el crecimiento del hipocótilo de plántulas etioladas de Arabidopsis thaliana regulando los niveles endógenos de GAs (activas y catabolitos inactivos), IAA y ABA*. Con el objeto de poner a prueba dicha hipótesis, el contenido de GAs, IAA y ABA, fue cuantificado en plántulas silvestres y mutantes *cry1* de *Arabidopsis thaliana* crecidas tanto en LA como oscuridad, mediante el empleo de cromatografía de gases capilar acoplada a espectrometría de masa con monitoreo selectivo de iones (GC-MS-SIM). Complementariamente, se realizaron experimentos de crecimiento bajo LA y en condiciones de oscuridad, analizando el efecto de la aplicación exógena de GAs, IAA, BX-112 (inhibidor de la síntesis de GAs bioactivas), fluridona (inhibidor de la síntesis de ABA) y TIBA (inhibidor del transporte de auxinas); lo que proporcionó información indirecta acerca del efecto de *cry1* sobre los niveles hormonales en plántulas etioladas de *Arabidopsis*.

II.2. MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.a. Material vegetal y condiciones experimentales de crecimiento

Semillas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia, silvestres (col-0) y del mutante *cry1-304* (alelo nulo, Ahmad y Cashmore 1997) fueron desinfectadas con etanol 75% + Tritón X-100 0,1% durante 30 s. Posteriormente fueron enjuagadas 3 veces con etanol 95% y una vez secas fueron sembradas individualmente en cajas de Petri con agar 1% (Difco Laboratories, Detroit, MI), 1 mM KCl y 1 mM CaCl₂ (medio agar buffer), previamente esterilizado en autoclave. Las semillas fueron estratificadas durante 2 d en oscuridad a 4°C. La germinación se promovió exponiendo las semillas a luz blanca (20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 30-60 min. Las plantas crecieron durante 32-36 h en completa oscuridad a 23°C. Para los distintos experimentos de crecimiento, las plántulas fueron seleccionadas en base a uniformidad de tamaño y apertura del gancho plumular.

II.2.b. Experimentos de cinética de crecimiento del hipocótilo

Para las mediciones de tasa de crecimiento del hipocótilo durante un corto periodo de tiempo de exposición a LA (2 h); se seleccionaron (en base a su tamaño y grado mínimo de apertura del gancho plumular) 3 plántulas de entre 2 a 3 mm de longitud del mutante *cry1-304*, que fueron transferidas a una caja de Petri conteniendo 220 μM Prohexadiona-Ca (BX-112, cedido por el Dr. W. Rademacher, BASF, Limburgerof, Alemania) añadidos al medio líquido de incubación antes de su solidificación. La tasa de crecimiento del hipocótilo fue medida fotografiando las plántulas (colocadas verticalmente) a intervalos de 5 min, por un período de 1 h en oscuridad y 2 h de LA (450 nm), proporcionada por una fuente LED (Quantum Devices, Bameveld, WI, USA) a una tasa de fluencia de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las imágenes digitales se tomaron con una cámara CCD (EDC-1000N; Electrim Corp, Princeton, NJ) equipada con una lente de aproximación (K52-274; Edmund Scientific), conectada a un sistema de adquisición de datos computarizado, alcanzando una resolución de 5,7 $\mu\text{m pixel}^{-1}$. Para la determinación de tasa de crecimiento del hipocótilo en oscuridad (1 h), las plántulas se

expusieron a radiación proveniente de diodos de emisión infrarroja ($290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 948 nm, 50-nm de ancho de banda), la cual no induce fotomorfogénesis en *Arabidopsis* (Parks *et al.* 1999), permitiendo así la visualización de las mismas y la correspondiente captura de imágenes digitales. Los datos de tasa de crecimiento del hipocótilo se obtuvieron a partir del análisis de las imágenes digitales usando el software Lab View. Graphical programming for Instrumentation (National Instruments, Austin, TX) versión 5.0. Los datos de tasa de crecimiento del hipocótilo fueron normalizados a la tasa promedio obtenida durante el período inicial (1 h) de oscuridad (0,25 mm/h) para el mutante *cry1*. Los resultados presentados en la **Figura 21b**, representan el promedio de cuatro ensayos independientes.

Para las mediciones de tasa de crecimiento del hipocótilo durante un largo periodo de exposición a LA (12 h), se seleccionaron 8 plántulas de entre 2 a 3 mm de longitud y grado máximo de apertura del gancho plumular, de los distintos genotipos (*col-0* y *cry1-304*), que fueron transferidas a una caja de Petri conteniendo medio agar buffer estéril y $1 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ y $150 \mu\text{M}$ GA₄ (100% de pureza, cedida gentilmente por el Dr. R.P Pharis, University of Calgary, Canadá); $220 \mu\text{M}$ Prohexadiona-Ca; $0,5 \mu\text{M}$ y $5 \mu\text{M}$ IAA (Sigma Chemical Co.); $0,3 \mu\text{M}$ y $30 \mu\text{M}$ Fluridona (Sonar, Dow Elanco), y sus combinaciones. En la preparación de las soluciones de los distintos reguladores del crecimiento e inhibidores se utilizaron los siguientes solventes a una concentración final máxima por placa de: 0,005% de etanol 95% para la solución de BX-112, 0,05% de etanol 95% para las soluciones de GA₄, y $10^{-5}\%$ de etanol 95% para las soluciones de IAA. Las plántulas control de ambos genotipos recibieron volúmenes equivalentes de los distintos solventes utilizados en cada tratamiento. En este caso, la tasa de crecimiento de las plántulas fue medida fotografiando las mismas a intervalos de 30 min, por un período de 2 h en oscuridad y 12 h de LA (450 nm , $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) emitida por un arreglo de luces azules LED (Quantum Devices, Bameveld, WI, USA). La longitud de los hipocótilos se determinó a partir del análisis de las imágenes digitales usando el software Image Tool versión 1.28 (University of Texas Health Science Center, San Antonio). Cada experimento fue hecho por triplicado. Los datos obtenidos fueron altamente repetitivos. Los resultados presentados corresponden a una de las repeticiones.

Las manipulaciones de las plántulas en todos los ensayos se hicieron bajo luz de seguridad verde de $0,002 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad. La tasa de fluencia se midió utilizando un

fotorradiómetro (modelo IL1700, International Light, Newburyport, MA) equipado con sensores SED 033 y SED 005 (International Light).

II.2.c. Experimentos de crecimiento a largo plazo del hipocótilo

Para determinar si el efecto del receptor *cry1* sobre los niveles endógenos de GAs y IAA se mantienen transcurridas las 12 h de exposición a LA, se realizaron experimentos de medición de longitud del hipocótilo luego de 3 d bajo LA. Además, se realizaron experiencias adicionales (no incluidas inicialmente en los objetivos) para determinar la posible participación de los Brasinoesteroides en la cascada de señales desencadenada por el receptor *cry1* que culmina en la inhibición del crecimiento del hipocótilo (sección **Resultados del Capítulo III**).

En estos ensayos se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia, silvestres (*col-0*) y del mutante *cry1-304*, las cuales crecieron durante 24-28 h en completa oscuridad a 23°C. Posteriormente, las semillas germinadas fueron transferidas a cajas de Petri conteniendo medio agar buffer y 50 μM , 100 μM y 150 μM GA₄; 150 μM GA₁ (100% de pureza, cedida gentilmente por el Dr. R.P Pharis); 220 μM Prohexadiona-Ca; 0,5 μM IAA; 5 μM TIBA (97% de pureza, Sigma Chemical Co.); 0,05 μM , 0,1 μM , 0,2 μM y 0,5 μM Brasinolide (BL, 100% pureza, cedido gentilmente por el Dr. R.P Pharis), y sus combinaciones. En la preparación de las soluciones de los distintos reguladores del crecimiento e inhibidores se utilizaron los siguientes solventes a una concentración final máxima por placa de: 0,05% de etanol 95% para la solución de GA₁, 10⁻⁵% de etanol 95% para la solución de IAA, 10⁻⁴% de etanol 95% para las soluciones de Brasinolide (BL), y 10⁻⁵% de metanol (grado HPLC) para la solución de TIBA. Las plántulas control de ambos genotipos recibieron volúmenes equivalentes de los distintos solventes utilizados en cada tratamiento. Las plántulas crecieron (en posición vertical) durante 3 d bajo LA (20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), emitida por 3 tubos fluorescentes (F20T12/BB, Philips) + 1 filtro Roscolux # 85, u oscuridad durante 3 y 4 d. Transcurridos los 3 y 4 d de tratamiento, las plántulas fueron transferidas individualmente a cajas de Petri con medio agar buffer para ser fotografiadas y, la longitud de los hipocótilos se determinó usando el software Image Tool versión 2.00

(University of Texas Health Science Center, San Antonio). Los datos fueron analizados estadísticamente por medio de un ANOVA de una vía y la posterior aplicación del test de Scheffé para la comparación de medias, a un nivel de confianza del 95%. Para ello se utilizó el software MATLAB versión 6.0, release 12.

Las manipulaciones de las plántulas en todos los ensayos se hicieron bajo luz de seguridad verde de $0,02 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad. La tasa de fluencia se midió utilizando un fotoradiómetro LI-COR LI-250).

II.2.d. Preparación del material vegetal para la determinación de hormonas

Aproximadamente 0,1 ml de semillas de *Arabidopsis thaliana* silvestres (col-0) y del mutante *cry1-304* colocadas en tubos plásticos de 15 ml fueron desinfectadas con 1 ml de etanol 75% + 0,1% Tritón X-100 durante 1 min. Posteriormente fueron enjuagadas 3 veces con volúmenes iguales (10 ml) de agua destilada estéril. Luego se añadió a cada tubo 4 ml de agarosa 0,8% (de bajo punto de fusión), a una temperatura de 60 °C aproximadamente. El contenido de cada tubo fue distribuido homogéneamente en cajas de Petri conteniendo 1% agar + 1 mM KCl + 1 mM CaCl₂ (30-35 ml). Tras 5 min a temperatura ambiente, las cajas se colocaron a 4°C durante 2 d en oscuridad. La germinación se promovió exponiendo las semillas a luz blanca ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 30 min-1 h. Las plantas crecieron en posición horizontal durante 36-48 h en completa oscuridad y a 23°C. Posteriormente las plántulas fueron expuestas a LA (450 nm, proporcionada por una fuente LED. Quantum Devices, Bameveld, WI, USA), a una tasa de fluencia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ u oscuridad (tratamientos realizados simultáneamente) por 6 h. Finalizado los tratamientos lumínicos el material vegetal (parte aérea: hipocótilo + cotiledones) fue recolectado, pesado y liofilizado para su posterior utilización en la determinación y cuantificación hormonal.

La recolección del material vegetal se realizó bajo luz de seguridad verde ($0,002 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

II.2.e. Determinación y cuantificación de GAs por GC-MS-SIM

II.2.e.i. Extracción, purificación y separación de GAs

Se tomaron 0,5 g de peso fresco (PF) de parte aérea (hipocótilo + cotiledones) de cada muestra y se homogeneizaron con N₂ líquido; añadiendo como solvente de extracción una mezcla de metanol/agua (4:1 v/v) a 4°C durante 16 h. Como estándares internos se adicionaron a cada muestra 50 ng de 17,17-[²H₂]-GA₁, 17,17-[²H₂]-GA₃, 17,17-[²H₂]-GA₄, 17,17-[²H₂]-GA₉, 17,17-[²H₂]-GA₂₀, 17,17-[²H₂]-GA₈ (L. Mander, Australian National University, Adelaide, Australia); dejando las muestras en reposo durante 1 h a 4°C para permitir la adecuada mezcla de isótopos. Luego de evaporar la fase metanol a baja presión, la fracción acuosa fue ajustada a pH 3,0 y particionada tres veces con acetato de etilo saturado con ácido acético 1%, obteniéndose dos fracciones. Tras evaporar el solvente de la fracción acetato de etilo, que contiene las GAs libres, el residuo se disolvió en metanol 10% en ácido acético 1%, para su posterior purificación por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Para ello se utilizó un aparato KONIK 500 equipado con una columna en fase reversa de octasil silano (C₁₈, μ- Bondapack 3,9 x 300 mm, Waters Associates, USA), a una tasa de flujo de 2 ml min⁻¹ y con el siguiente programa de elusión: 10% metanol en 1% ácido acético durante los primeros 10 min, 10 a 73% metanol en 1% ácido acético desde los 10 hasta los 40 min, 73% metanol en 1% ácido acético desde los 40 hasta los 50 min y finalmente 100% metanol durante los últimos 10 min (50-60 min).

Las fracciones correspondientes a los tiempos de retención entre los 12 a los 32 min fueron combinadas, concentradas y secados a baja presión y derivatizadas para la identificación y cuantificación de GAs libres presentes en las distintas fracciones mediante la técnica combinada de cromatografía de gases capilar y espectrometría de masas con monitoreo selectivo de iones (GC-MS-SIM; gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring).

II.2.e.ii. Identificación y cuantificación de GAs por GC-MS-SIM

El análisis de GAs por GC-MS, desde sus primeras aplicaciones en la identificación de GAs en extractos crudos de semillas (MacMillan *et al.* 1967), se ha convertido actualmente en la técnica más utilizada para la identificación de pequeñas cantidades (del orden de ng o pg) de GAs presentes en los extractos crudos vegetales. Esto debido a que las características de la misma hacen a esta técnica sumamente sensible, de alta performance y reproducibilidad. La misma implica la separación de una mezcla de componentes por medio de cromatografía de gases capilar y la posterior introducción de estos componentes ya separados dentro de una fuente de iones de un espectrómetro de masas.

Dado que las GAs son terpenos ácidos estables, el análisis de las mismas por GC-MS, implica la necesidad de derivatizar previamente las moléculas en muchos casos con grupos alcohol (1, 2, 3 y hasta 4 hidroxilos), es decir, convertirlas en derivados volátiles previo a su inyección al cromatógrafo gaseoso. El procedimiento más recomendado para la derivatización de los extractos vegetales es la conversión de los grupos carboxilos en metil ésteres (Me) y de los grupos hidroxilos en trimetilsilil éteres (TMSi). Las características de alta volatilidad y estabilidad térmica de los derivados MeTMSi proporcionan ventajas adicionales sobre otros derivados ya que, eliminan la formación de múltiples picos que provienen de la descomposición en el inyector o en la columna del cromatógrafo, y bajo el impacto de los electrones los MeTMSi producen una fragmentación con patrones perfectamente definidos y establecidos a partir de numerosos estudios (Gaskin y MacMillan 1991, Pearce *et al.* 1994) que permiten una identificación más precisa de los compuestos.

La derivatización de las muestras a analizar se realizó en dos pasos sucesivos. Las muestras fueron primeramente metiladas mediante el agregado de 10 µl de metanol más 100 µl de diazometano etéreo (preparado según Cohen, 1984), a temperatura ambiente durante al menos 20 min; el solvente se removió luego bajo corriente de N₂ líquido.

Posteriormente, las fracciones fueron trimetilsililadas; es decir, convertidas a sus derivados TMSi mediante la adición de N,O-bis-trimethylsilyltrifluoroacetamide (BSTFA) catalizada con 1% trimetilclorosilano (TMCS, Pierce Chemical Co., USA) en piridina anhidra

(3:1). La mezcla se calentó mediante fuente de calor seco a 80°C durante 15 min y posteriormente fue secada bajo corriente de N₂ líquido.

Tras la derivatización-metilación del grupo ácido y trimetilsililación de grupos alcoholes; alícuotas de 1 µl de cada muestra disueltas en 5 µl de n-hexano fueron inyectadas en un equipo GC-MS-SIM. El mismo consistió de un cromatógrafo de gases Hewlett Packard (HP) 5890, Serie II, acoplado por una interfase capilar directa a un detector selectivo de masas HP5972; utilizando el software Chemstation para la adquisición y análisis de datos, que fue controlada por una computadora HP Vectra 486. Para la cromatografía de gases se utilizó una columna capilar HP5 de 0,22 mm de diámetro interno, 30 m de largo y 0,25 µM de grosor de película. El programa de temperatura para el cromatógrafo fue de 100°C a 260°C, con un incremento de 20°C por min y 10 min a 260°C. Como gas transportador se utilizó He, a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹.

La identificación de GA₁, GA₈, GA₃, GA₄, GA₉ y GA₂₀ se realizó mediante el monitoreo selectivo de los siguientes iones (m/z): 508/506, 493/491, 450/448 para ²H₂GA₁/GA₁; 596/594, 581/579, 450/448 para ²H₂GA₈/GA₈; 506/504, 491/489, 447/445 para ²H₂GA₃/GA₃; 420/418, 316/314, 286/284 para ²H₂GA₄/GA₄; 332/330, 300/298, 272/270 para ²H₂GA₉/GA₉ y 420/418, 405/403, 377/375, 303/301 para ²H₂GA₂₀/GA₂₀. La caracterización de GAs se hizo por comparación de los tiempos de retención y abundancia relativa de los iones característicos ya mencionados. La cuantificación se realizó por comparación de la intensidad de iones característicos para proteo vs. deuterio-GAs. Las determinaciones de GAs en parte aérea (hipocótilo+cotiledones), de cada tratamiento se hicieron por duplicado en muestras provenientes de dos experimentos independientes.

II.2.f. Determinación y cuantificación de ABA por GC-MS-SIM

El equivalente a 0,5 g de peso fresco de parte aérea (hipocótilo + cotiledones), correspondientes a cada muestra, fue homogeneizado en un mortero con N₂ líquido; añadiendo como solvente de extracción la mezcla metanol/agua/ácido acético (80:20:1) a 4°C durante 16 h. Transcurrido este período, se adicionaron a cada muestra 50 ng de [²H₆]-ABA (Cohen J. D, USDA-ARS of Beltsville, Maryland, USA), como estándar interno más el agregado de BHT

como antioxidante. Transcurrida 1 h, las muestras fueron filtradas y el residuo fue re-extraído con metanol 80% y BHT. Tras la evaporación del solvente a baja presión, la fase acuosa se ajustó a pH 3,0 y particionó tres veces con acetato de etilo saturado con 1% de ácido acético. Una vez evaporada, la fracción acetato de etilo fue diluida en una pequeña cantidad de metanol 30% en ácido acético 1%, e inyectada en un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) para su separación en fase reversa. El cromatógrafo KONIK 500 (KONIK Instruments) utilizado estaba equipado con una columna de octadecil silano (C_{18} , μ -Bondapak 3,9 x 300 mm, Waters Associates column, USA); utilizándose el siguiente programa de solventes: metanol 10% en ácido acético 1% por 10 min, metanol 10 a 73% desde los 10 a los 40 min, metanol 73% desde los 40 hasta los 50 min y metanol 100% durante los 10 min finales (50-60 min). La elusión se realizó a una tasa de flujo de 2 ml min⁻¹, recolectándose los efluentes entre los tiempos de retención de 12 a 34 min.

Posteriormente, las muestras fueron secadas a baja presión y derivatizadas, es decir, convertidas a sus derivados volátiles, para la identificación y cuantificación de ABA mediante GC-MS-SIM. Las muestras a analizar fueron metiladas mediante el agregado de 10 μ l de metanol más 100 μ l de diazometano etéreo (preparado según Cohen, 1984), a temperatura ambiente durante al menos 20 min; el solvente se removió luego bajo corriente de N₂ líquido.

Una vez derivatizadas las distintas muestras, alícuotas de 1 μ l disueltas en 5 μ l de n-hexano, fueron inyectadas en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard (HP) 5890, Serie II, acoplado por una interfase capilar directa a un detector selectivo de masas HP5972. Para la cromatografía gaseosa se utilizó una columna capilar HP1 (Chrompack CPSil 19) de 0,25 mm de diámetro interno, 12 m de largo y 0,25 μ M de grosor de película. El programa de temperatura para el cromatógrafo fue de 90°C hasta 195°C con un incremento de 5°C por min, luego hasta 260°C con un incremento de 4°C por min. Como gas transportador se utilizó He, a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹.

La cuantificación de ABA endógeno se realizó mediante la comparación del estándar interno [²H₆]-ABA con los siguientes iones monitoreados (m/z): 194/166 y 190/162.

La determinación y cuantificación de ABA en parte aérea (hipocótilo + cotiledones), de cada tratamiento se realizó por duplicado en muestras provenientes de dos experimentos independientes.

II.2.g. Análisis de AIA

Para la extracción de AIA, 0,5 g de peso fresco de material vegetal (hipocótilo+cotiledones), fueron macerados en N₂ líquido, añadiendo una mezcla de isopropanol 65% con buffer imidazol 0,02 M pH 7,0. Posteriormente se adicionaron 50 ng de [¹³C₆]-IAA (Cohen J. D, USDA-ARS of Beltsville, Maryland, USA) como estándares internos para el análisis cuantitativo de espectrometría de masas. Luego de 24 h, el análisis de IAA libre se realizó de acuerdo a lo propuesto por Chen *et al.* (1998). Para la purificación del IAA por HPLC se utilizó una columna C₁₈ Partisphere (Whatman, 110 mm x 5 mm), y las muestras fueron eluidas utilizando un flujo de 1 ml min⁻¹ de acetonitrilo/agua 20% y ácido acético 1%. La cuantificación de IAA fue realizada mediante GC-MS-SIM utilizando para ello un equipo Hewlett packard 5890-5970 equipado con una columna capilar CPSil 19 (Chrompack, 0,25 mm de diámetro interno, 12 m de largo y 0,25 µm de grosor de película). Se utilizó como gas transportador He a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹. La temperatura del inyector del GC fue de 280°C con un incremento desde 50°C a 110°C a una tasa de 30°C min⁻¹ y luego a una tasa de 6°C min⁻¹ hasta los 280°C. La identificación de IAA se realizó mediante el monitoreo selectivo de los siguientes iones (m/z): 130/136 y 189/195.

II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objeto de evaluar el efecto del receptor de luz azul, cry1, sobre los niveles endógenos de GAs, IAA y ABA, se realizó una combinación de ensayos de crecimiento del hipocótilo del alta resolución y cuantificaciones de los niveles de dichos reguladores del crecimiento en plántulas etioladas silvestres y mutantes *cry1* de *Arabidopsis* crecidas en LA.

La **Figura 20** muestra la cinética de la respuesta de inhibición del crecimiento del hipocótilo inducida por LA en plántulas silvestres (WT) y mutantes *cry1* de *Arabidopsis*. Como puede observarse, las plántulas silvestres de *Arabidopsis* crecen rápidamente en condiciones de oscuridad, alcanzando una tasa de crecimiento promedio durante las primeras 2 h que precedieron el inicio del tratamiento lumínico, de aproximadamente 0,20 mm h⁻¹ (Parks *et al.* 1998).

En concordancia con los resultados obtenidos por Parks *et al.* (1998), se observó en plántulas silvestres que la LA produce una fuerte reducción en la tasa de elongación del hipocótilo, la cual alcanza valores próximos a cero dentro de los 30 min de irradiación, y persiste por las próximas 12 h (Figura 20). Los mutantes *cry1* exhibieron la misma respuesta de inhibición del crecimiento del hipocótilo observada durante los primeros minutos de exposición a LA; sin embargo, en contraste con las plántulas silvestres, la tasa de elongación de mutantes *cry1* aumentó progresivamente alcanzando, dentro de las 5 h de irradiación, aproximadamente el mismo valor que aquel registrado para las plántulas *cry1* crecidas en oscuridad (Figura 20). De este modo, el fenotipo “hipocótilo elongado” característico de mutantes *cry1* crecidos en LA, es el resultado de un escape de la fase inicial de inhibición del crecimiento mediada por el receptor del fototropismo, phot1 (Folta *et al.* 2001a).

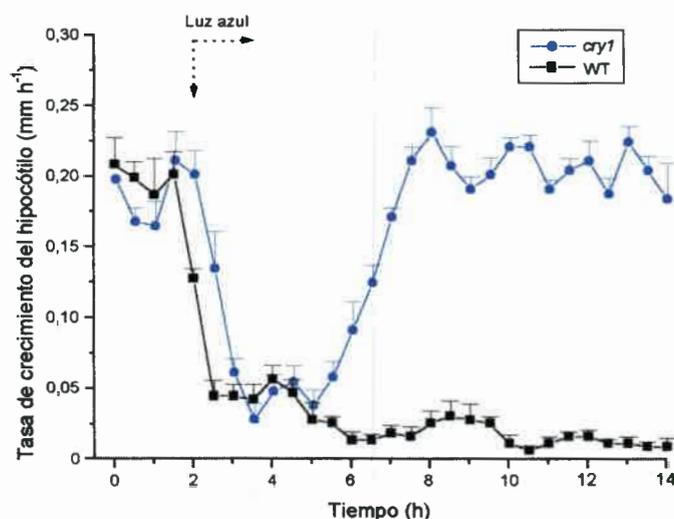


Figura 20. Tasa de crecimiento de plántulas silvestres (WT) y mutantes *cry1* expuestas a luz azul (450 nm, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La flecha indica el inicio del tratamiento lumínico. Cada punto representa la media \pm SE de 8 mediciones para cada tratamiento.

Con el objeto de analizar si la diferencia entre las tasas de crecimiento del hipocótilo de plántulas silvestres y mutantes *cry1* se debe a una mayor producción de GAs en el mutante, se trataron plántulas *cry1* con Prohexadiona-Ca (BX-112), el cual se sabe bloquea la síntesis de GAs activas en el crecimiento (tales como GA₄ en *Arabidopsis*), inhibiendo la actividad 3 β -hidroxilativa. Las tasas de crecimiento del hipocótilo fueron determinadas a partir del análisis

de imágenes digitales tomadas a intervalos de 30 min y por un período de 12 h bajo LA. Los resultados de la **Figura 21a** muestran que el tratamiento de plántulas *cry1* con Prohexadiona-Ca disminuyó fuertemente la tasa de crecimiento del hipocótilo bajo LA, registrando ésta un valor promedio semejante al de las plántulas silvestres. A diferencia de estos resultados, el tratamiento con el inhibidor BX-112 no afectó la fase inicial de inhibición del crecimiento ni la tasa de elongación del hipocótilo de mutantes *cry1* crecidos en oscuridad (2 h previas al inicio del tratamiento con LA).

En un intento por definir más precisamente el efecto del inhibidor Prohexadiona-Ca sobre la elongación del hipocótilo durante las primeras horas de la fase de crecimiento dependiente del receptor *cry1*, se procedió al tratamiento de plántulas mutantes *cry1* con el inhibidor Prohexadiona-Ca al igual que lo descrito anteriormente (**Figura 21b**). Sin embargo, para este propósito las plántulas fueron fotografiadas a intervalos de 5 min y por un período de 2 h bajo LA. Las tasas de crecimiento promedio se calcularon utilizando un software especial que mide a partir imágenes digitales tomadas a distintos tiempos, la altura comprendida entre la base de la imagen fotográfica (que no necesariamente coincide con la base del hipocótilo) y el punto superior máximo de la plántula (ápice del hipocótilo, ver Materiales y Métodos). Como puede verse en la **Figura 21b**, se observó un efecto inhibitorio de Prohexadiona-Ca sobre el crecimiento de mutantes *cry1* tempranamente a partir de los 70 min de exposición a LA. Sin embargo, dada la imposibilidad de utilizar este método para el análisis de imágenes digitales tomadas durante largos tratamiento lumínicos, los cuales típicamente causan apertura del gancho apical (y con ello el punto superior máximo de la plántula puede no ser necesariamente el ápice del hipocótilo), los ensayos de crecimiento se realizaron en todos los casos mediante la toma de secuencias fotográficas a intervalos de 30 min y por un período de 12 h bajo LA.

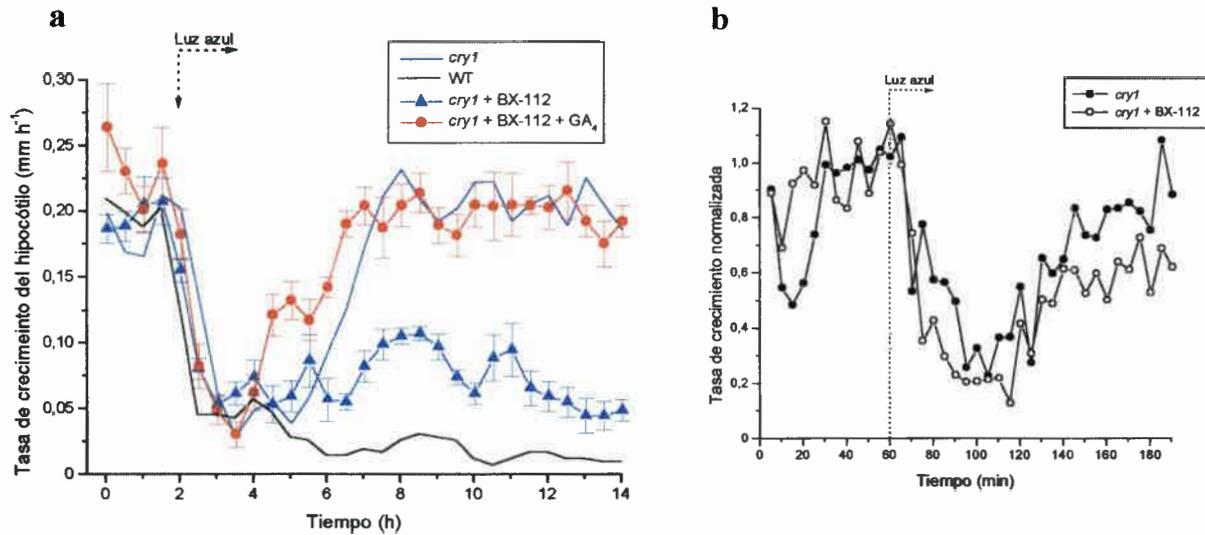


Figura 21. Efecto de Prohexadiona-Ca (BX-112) y de GA₄ + BX-112 sobre la tasa de crecimiento de plántulas silvestres (WT) y mutantes *cry1* expuestas a luz azul (450 nm, 100 μmol m⁻² s⁻¹). Plántulas etioladas silvestres y mutantes *cry1* (2 d de edad) se transfirieron a cajas de Petri con 220 μM BX-112 y 150 μM GA₄ + 220 μM BX-112, y crecieron por 2 h en oscuridad (Figura a) antes del inicio del tratamiento lumínico (representado por una flecha). Cada punto representa la media±SE de 8 mediciones para cada tratamiento. La figura b, representa la tasa de crecimiento relativa a la tasa promedio durante el período inicial (1 h) en oscuridad (0,26 mm h⁻¹). Cada punto representa la media de 10 mediciones para cada tratamiento. Las barras de error (SE) no se muestran para dar una mayor claridad a la gráfica.

La hipótesis de trabajo fue que, si el inhibidor Prohexadiona-Ca disminuye la tasa de crecimiento del hipocótilo en plántulas *cry1* exclusivamente al bloquear la actividad 3β-hidroxiactiva, es de esperar que la aplicación exógena de GA₄ (GA activa en el crecimiento de *Arabidopsis* y producto de una reacción catalizada por 3β-hidroxiactivas) en presencia del inhibidor Prohexadiona-Ca, sea capaz de restaurar la cinética de crecimiento tipo *cry1* (Figura 21a). En efecto, la co-aplicación de GA₄ a plántulas *cry1* restauró el fenotipo de los mutantes *cry1* crecidos en presencia del inhibidor, proporcionando así fuertes evidencias de que un efecto sobre los niveles de GAs activas y no algún efecto secundario del inhibidor Prohexadiona-Ca, fue responsable de la significativa disminución de la tasa de crecimiento del mutante *cry1* (Figura 21a). Cabe destacar que la coincidencia entre el comienzo de las respuestas del crecimiento con el agregado exógeno de GA₄ y/o Prohexadiona-Ca y el escape, observado en el mutante *cry1*, de la fase inicial de inhibición del crecimiento, sugiere que las GAs participan específicamente en la “fase criptocromo” de inhibición del crecimiento del hipocótilo mediada por el receptor *cry1*.

Los efectos de la manipulación de los niveles de GAs activas durante las primeras horas de crecimiento del hipocótilo de mutantes *cry1*, fueron evaluados también durante un mayor período de exposición a LA. La **Figura 22** muestra la longitud del hipocótilo de plántulas *cry1* crecidas durante 3 d bajo LA, con el agregado exógeno del inhibidor Prohexadiona-Ca y el co-tratamiento con GA₄. Como puede observarse, la reducida tasa de crecimiento de mutantes *cry1* tratados con Prohexadiona-Ca (**Figura 21a**), persistió durante los 3 d de exposición a LA, resultando la longitud del hipocótilo en una fenocopia de las plántulas silvestres crecidas en idénticas condiciones lumínicas (**Figura 22**). Sin embargo, el co-tratamiento de mutantes *cry1* con GA₄ no fue capaz de revertir completamente el efecto inhibitorio de Prohexadiona-Ca sobre el crecimiento del hipocótilo, observándose una diferencia significativa entre la longitud de plántulas *cry1* tratadas con Prohexadiona-Ca + GA₄ y la de mutantes no tratados (**Figura 22**).

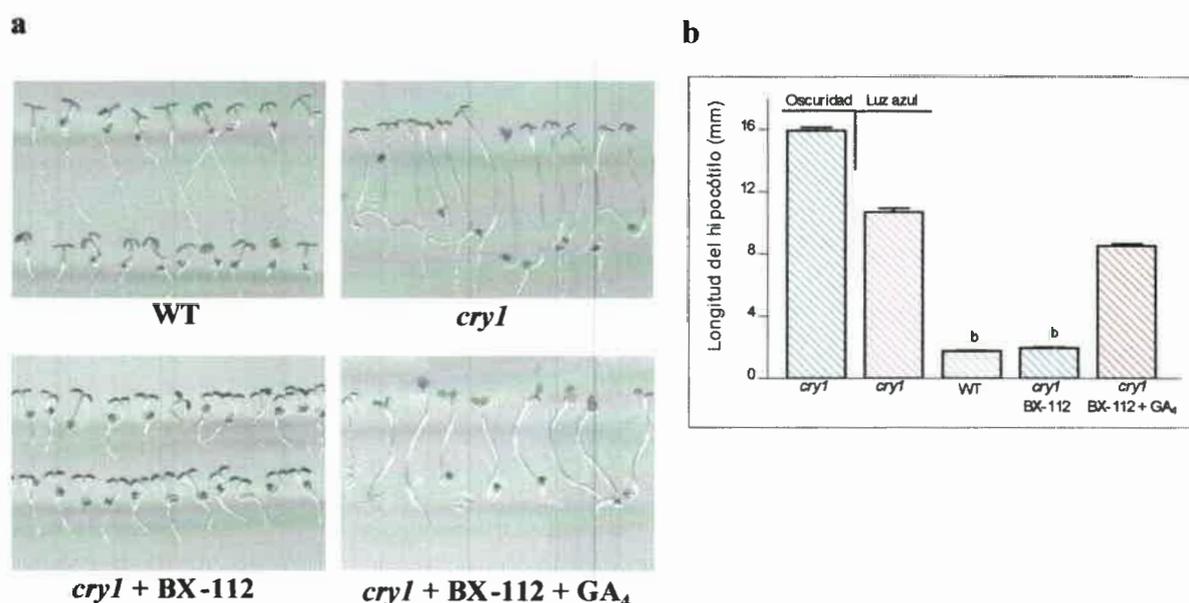


Figura 22. Efecto de Prohexadiona-Ca (BX-112) y de GA₄ + BX-112 sobre la longitud del hipocótilo de plántulas silvestres (WT) y mutantes *cry1* crecidas 3 d en luz azul (LA, 20 μmol m⁻² s⁻¹). Semillas germinadas, silvestres y del mutante *cry1*, se transfirieron a cajas de Petri con 220 μM BX-112 y 150 μM GA₄ + 220 μM BX-112, y crecieron durante 3 d en LA. En la figura b, cada barra representa la longitud promedio ± SE de 40 plántulas por cada tratamiento. Donde las barras de SE no son visibles, los valores de SE quedaron incluidos dentro de las dimensiones de la barra del promedio. Las barras acompañadas por letras iguales no difieren estadísticamente a un P=0.05.

Si la inhibición del crecimiento mediada por el receptor *cry1* en plántulas silvestres crecidas bajo LA (**Figura 20**) fuera consecuencia exclusiva de una capacidad reducida en la biosíntesis de GAs activas, el tratamiento de plántulas silvestres con GA₄ debería revertir el efecto inhibitorio de *cry1* sobre el crecimiento del hipocótilo y copiar el fenotipo de mutantes *cry1* crecidos en LA. La aplicación exógena de distintas concentraciones de GA₄ produjeron un aumento en la tasa de crecimiento del hipocótilo de plántulas silvestres crecidas bajo LA (**Figuras 23a y b**), pero el aumento observado en la longitud del hipocótilo sólo fue parcial y transitorio. La tasa de crecimiento de plántulas silvestres tratadas con GA₄ alcanzó un valor máximo (>50% de la tasa de crecimiento de plántulas *cry1*) entre las 6 h de LA, para luego disminuir y retornar, dentro de las 9 h de exposición lumínica, a valores semejantes al de las plántulas silvestres no tratadas. La aplicación de GA₄ no afectó la tasa de crecimiento de plántulas silvestres en oscuridad (2 h previas al inicio del tratamiento con LA), ni la fase inicial de inhibición del crecimiento.

Es posible que la baja respuesta de las plántulas silvestres, crecidas en LA, a la GA₄ aplicada exógenamente pueda ser una consecuencia de un rápido catabolismo. De esta manera, si se diseña un experimento capaz de bloquear o disminuir la remoción de GAs activas, entonces podría esperarse una mayor respuesta al tratamiento con GAs. Como se vio en el capítulo I, la disminución de los niveles de GAs activas puede ocurrir a través de la 2 β -hidroxilación que convierte formas activas, GA₄ y GA₁, a catabolitos inactivos, GA₃₄ y GA₈, respectivamente (Hedden y Phillips 2000). Se testeó así, la acción de Prohexadiona-Ca, el cual se sabe inhibe tanto la 3 β como la 2 β -hidroxilación de GAs (Brown *et al.* 1997, Rademacher 2000), para determinar si el co-tratamiento con este inhibidor incrementa la respuesta de las plántulas silvestres a las GAs aplicadas exógenamente (**Figuras 23a y b**). Sin embargo, el tratamiento de plántulas silvestres crecidas en diferentes concentraciones de GA₄ con Prohexadiona-Ca no tuvo un efecto promotor adicional sobre la tasa de crecimiento del hipocótilo, resultando sólo en un retraso para alcanzar los valores de tasa de crecimiento de plántulas silvestres no tratadas (**Figuras 23a y b**). Resultados similares se observaron durante los ensayos de crecimiento de plántulas silvestres por un período de 3 d bajo LA (**Figura 24**), donde el tratamiento con GA₄ + Prohexadiona-Ca resultó en un pequeño aumento de la longitud de los hipocótilos. Esto sugiere que la baja respuesta de las plántulas silvestres a GA₄ no es consecuencia de una alta tasa de desactivación de GAs por 2 β -hidroxilación; sino que el

nivel de GAs activas no sería el único factor regulado por el receptor cry1 para controlar el crecimiento del hipocótilo en plántulas silvestres crecidas bajo LA (Volmaro *et al.* 1998). Sin embargo no debería descartarse la posibilidad que en las plántulas silvestres la LA promueva la desactivación de GAs por conjugación con glucosa formando GA-G o GA-GE (Baraldi *et al.* 1990).

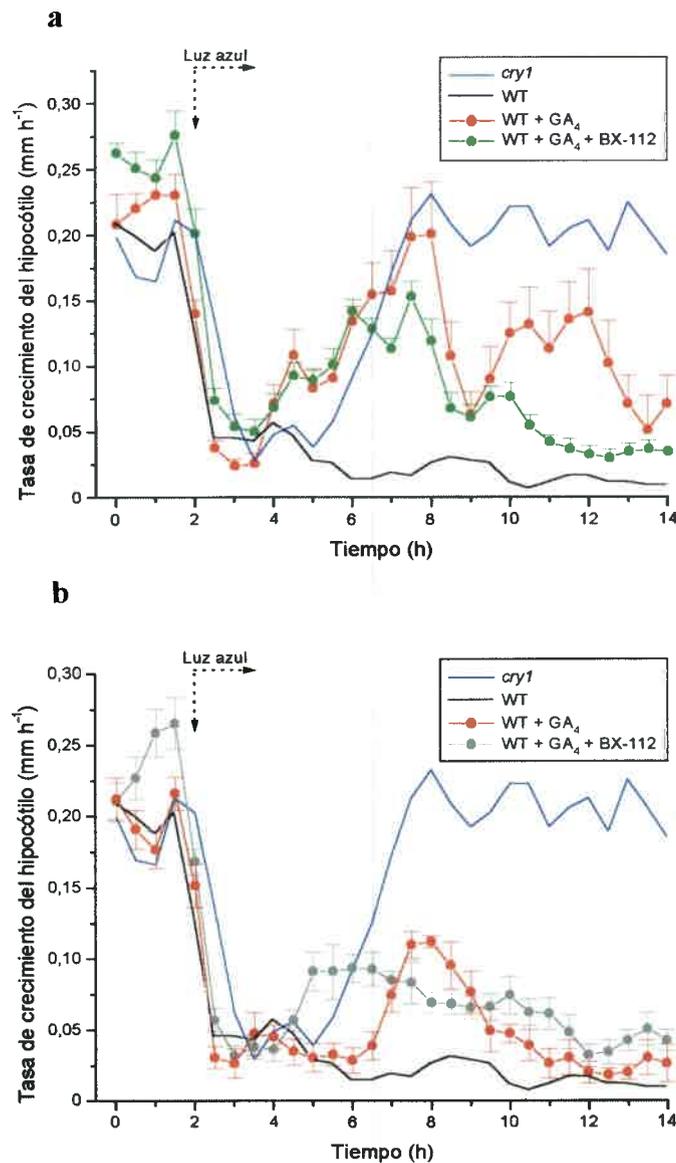


Figura 23. Efecto de GA_4 y GA_4 + Prohexadiona-Ca (BX-112) sobre la tasa de crecimiento de plántulas silvestres (WT) crecidas en luz azul (450 nm , $100\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$). Plántulas etioladas silvestres (2 d de edad) se transfirieron a cajas de Petri con GA_4 (a, 50 y b, $150\ \mu\text{M } GA_4$) y GA_4 + $220\ \mu\text{M BX-112}$, y crecieron por 2 h en oscuridad antes del inicio del tratamiento lumínico (representado por una flecha). Cada punto representa la media \pm SE de 8 mediciones para cada tratamiento.

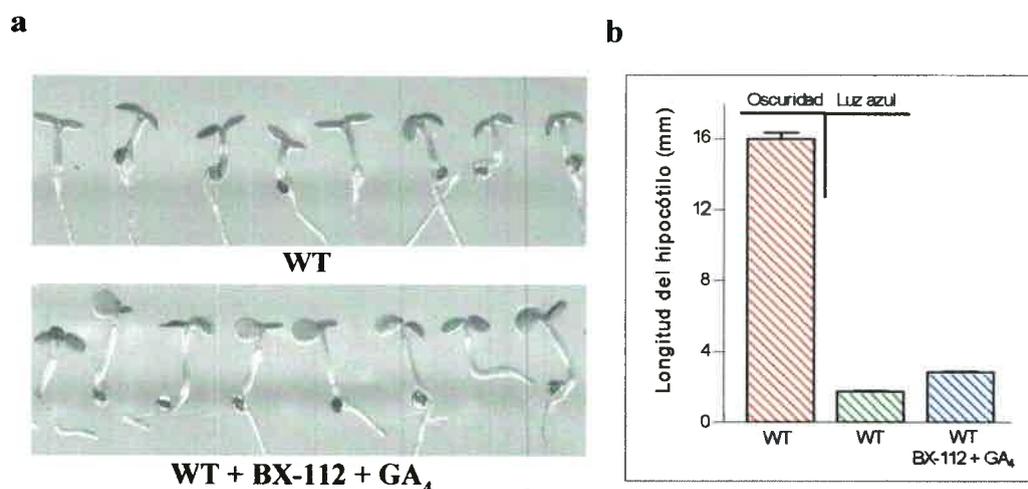


Figura 24. Efecto de Prohexadiona-Ca (BX-112) + GA₄ sobre la longitud del hipocótilo de plántulas silvestres (WT) crecidas 3 d en luz azul (LA, 20 μmol m⁻² s⁻¹). Semillas germinadas silvestres se transfirieron a cajas de Petri con 220 μM BX-112 + 50 μM GA₄, y crecieron durante 3 d en LA. En la figura b, cada barra representa la longitud promedio ± SE de 40 plántulas por cada tratamiento. Donde las barras de SE no son visibles, los valores de SE quedaron incluidos dentro de las dimensiones de la barra del promedio.

La **Figura 25** muestra el efecto de la aplicación exógena de GA₄ y/o Prohexadiona-Ca sobre la longitud del hipocótilo de plántulas silvestres y mutantes *cry1* crecidas durante 3 d en oscuridad. Como puede observarse, el tratamiento de dichas plántulas con GA₄ no tuvo efecto diferencial alguno sobre el crecimiento del hipocótilo, sugiriendo que en oscuridad tanto las plántulas silvestres como *cry1* presentan niveles suficientes u “homeostáticos” de GAs, que serían los responsables al menos en parte, del crecimiento “elongado” del hipocótilo bajo esta condición lumínica. Cuando esos niveles de GAs (específicamente aquellas GAs bioactivas en el crecimiento del tallo tal como GA₄) fueron reducidos por la aplicación del inhibidor de la 3β-hidroxilación de GAs, Prohexadiona-Ca, se observó una disminución significativa del crecimiento del hipocótilo tanto en mutantes *cry1* como en plántulas silvestres, las cuales no mostraron diferencias significativas entre la longitud de sus hipocótilos. En ambos casos se logró una completa reversión fenotípica de dicho efecto inhibitorio con el agregado de GA₄.

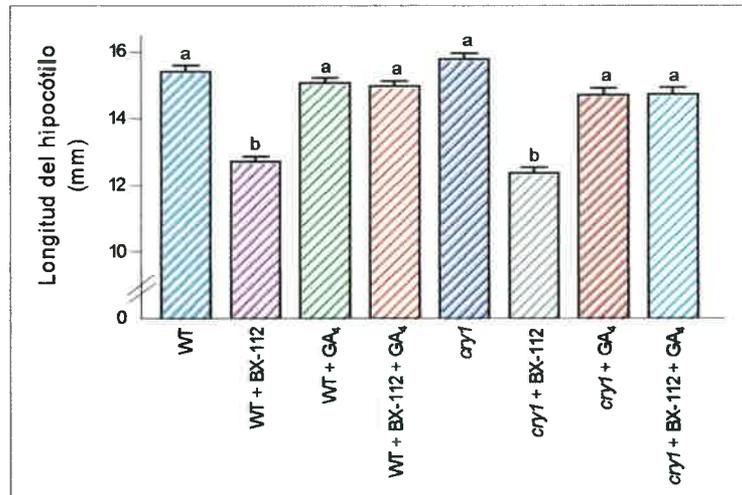


Figura 25. Efecto de Prohexadiona-Ca (BX-112) y de GA₄ + BX-112 sobre la longitud del hipocótilo de plántulas silvestres (WT) y mutantes *cry1* crecidas 3 d en oscuridad. Semillas germinadas, silvestres y del mutante *cry1*, se transfirieron a cajas de Petri con 220 μ M BX-112, 150 μ M GA₄ y 220 μ M BX-112 + 150 μ M GA₄. Cada barra representa la longitud promedio \pm SE de 40 plántulas por cada tratamiento. Las barras acompañadas por letras iguales no difieren estadísticamente a un $P=0.05$.

En plántulas silvestres, ninguna de las concentraciones de GA₄ testeadas (**Figuras 23a y b**) fue capaz de revertir completamente el efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hipocótilo mediado por *cry1*, indicando que el nivel de GAs activas no sería el único factor regulado por este receptor para controlar el crecimiento. Trabajos previos (Behringer y Davies 1992, Bridgers *et al.* 1998, Imaizumi *et al.* 2002, Jensen *et al.* 1998, Jones *et al.* 1991, Stowe-Evans *et al.* 2001, Volmaro *et al.* 1998), han sugerido que los niveles de auxinas, así como también el transporte y sensibilidad de los tejidos a dichas hormonas, podrían disminuir en respuesta a LA, resultando así en un reducido crecimiento. En efecto, en *Prunus cerasus* Baraldi *et al.* (1995) encontraron que la LA, a la vez que redujo el largo de entrenudos disminuyó los niveles de IAA endógenos, aún cuando aumentaba el de GAs. El efecto de *cry1* sobre los niveles de auxinas en plántulas silvestres fue evaluado mediante una combinación de ensayos de crecimiento con el agregado exógeno de IAA y la combinación IAA + GA₄ (**Figura 26**). Los resultados en la **Figura 26** muestran que el tratamiento de plántulas silvestres con 0,5 μ M de IAA no tuvo efecto alguno sobre la tasa de crecimiento del hipocótilo. Por el contrario, cuando se utilizaron concentraciones mayores de IAA (5 μ M IAA, datos no mostrados), se observó un claro efecto inhibitorio del crecimiento posiblemente como consecuencia del efecto de alta dosis de IAA descrito en *Arabidopsis* (Rashotte *et al.* 2003),

y que no es más que la clásica respuesta “dual” a las auxinas que se conoce desde hace mucho tiempo. Resultados similares se observaron durante el crecimiento de las plántulas silvestres en condiciones de oscuridad (2 h previas al inicio del tratamiento con LA), en las cuales ambas concentraciones de IAA testeadas provocaron una disminución de la tasa de crecimiento del hipocótilo (**Figura 26**). Los datos presentados en la **Figura 26** concuerdan con aquellos obtenidos por Rashotte *et al.* (2003), quienes mostraron que la elongación del hipocótilo de plántulas silvestres de *Arabidopsis* es sensible a la inhibición por IAA tanto en luz como en oscuridad, aunque se requieren concentraciones más altas de IAA para inhibir el crecimiento del hipocótilo en luz (de alta intensidad) comparado a oscuridad.

Si bien las plántulas silvestres mostraron un efecto inhibitorio del crecimiento a las más alta concentración de IAA utilizada (5 μM , datos no mostrados), la combinación de 5 μM IAA + GA_4 (**Figura 26**), produjo un incremento en la tasa de crecimiento del hipocótilo para luego disminuir dicho efecto durante las horas siguientes de exposición a LA. Aparentemente, la respuesta inhibitoria del crecimiento del hipocótilo mediada por el receptor *cry1*, sería independiente del nivel endógeno de IAA en los tejidos.

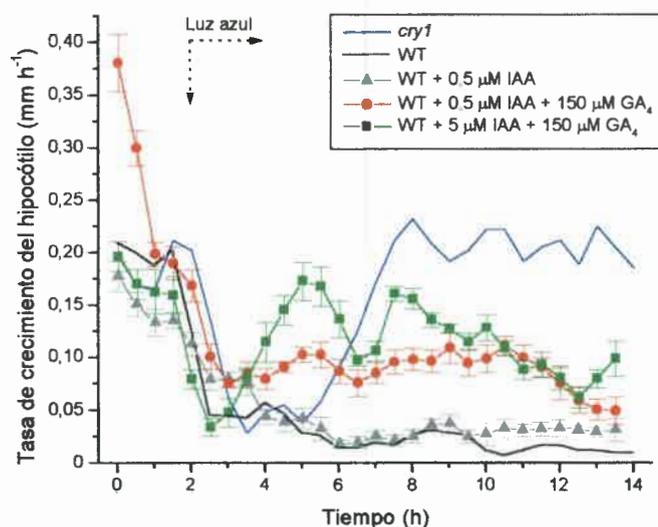
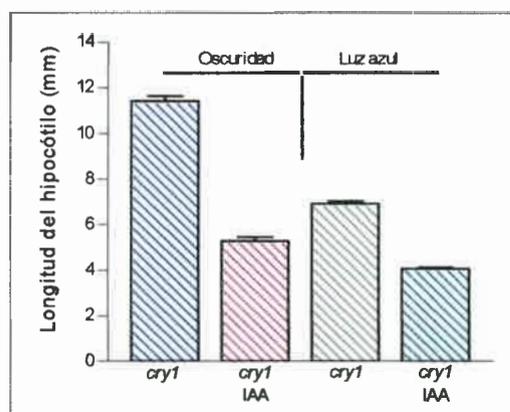


Figura 26. Efecto de IAA y IAA + GA_4 y sobre la tasa de crecimiento de plántulas silvestres (WT) crecidas en luz azul (450 nm, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Plántulas etioladas silvestres (2 d de edad) se transfirieron a cajas de Petri con 0,5 μM IAA y IAA (0,5, 5 μM) + 150 μM GA_4 , y crecieron por 2 h en oscuridad antes del inicio del tratamiento lumínico (representado por una flecha). Cada punto representa la media \pm SE de 8 mediciones para cada tratamiento.

La **Figura 27** muestra el efecto de la aplicación exógena de IAA sobre la longitud del hipocótilo de plántulas mutantes *cry1* crecidas durante 3 d en LA o bajo condiciones de oscuridad. Como puede observarse, el tratamiento de dichas plántulas con IAA redujo significativamente el crecimiento del hipocótilo independientemente al tratamiento lumínico. Estos resultados son semejantes a aquellos observados durante el estudio de la cinética del crecimiento de plántulas silvestres con el agregado de IAA (**Figura 26**). Al igual que en plántulas silvestres, la elongación del hipocótilo de mutantes *cry1* es sensible a la inhibición por IAA tanto en luz como en oscuridad; y dado que la misma concentración de IAA aplicada ($5 \mu\text{M}$) redujo un 53% (valor relativo al control en oscuridad) la longitud del hipocótilo de mutantes *cry1* crecidos en oscuridad y un 41% (valor relativo al control en LA) del crecimiento en plántulas crecidas en LA, al parecer serían requeridas concentraciones más altas de IAA para inhibir el crecimiento del hipocótilo en luz comparado con oscuridad.

Figura 27. Efecto de IAA ($5 \mu\text{M}$) sobre la longitud del hipocótilo de mutantes *cry1* crecidos 3 d en luz azul ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) u oscuridad. Cada barra representa la longitud promedio \pm SE de 40 plántulas por cada tratamiento.



Como señalara anteriormente, el transporte de auxinas y la sensibilidad de los tejidos a dichas hormonas, tendrían un rol importante durante el crecimiento del tallo (Imaizumi *et al.* 2002, Jensen *et al.* 1998, Shinkle *et al.* 1998, Stowe-Evans *et al.* 2001). En base a la hipótesis que el transporte de auxinas juega un papel mediador en la fotoinhibición del crecimiento del hipocótilo de *Arabidopsis* (Jensen *et al.* 1998), se esperaría entonces que una disminución en la percepción lumínica debería afectar la sensibilidad del hipocótilo a los inhibidores del transporte de auxinas, tales como NPA y TIBA. La **Figura 28** muestra el efecto del inhibidor del transporte de auxinas TIBA sobre el crecimiento del hipocótilo de mutantes *cry1* crecidos 3 d bajo LA o en condiciones de oscuridad. Como puede observarse, el tratamiento de plántulas *cry1* con TIBA redujo significativamente la longitud de los hipocótilos tanto en LA

como oscuridad. Kraepiel *et al.* (2001), trabajando con plántulas de tomate, propusieron que la regulación de la elongación del hipocótilo supone al menos dos “procesos” distintos; uno dependiente de la sensibilidad a las auxinas y del transporte de las mismas durante el crecimiento en oscuridad; el otro independiente de la respuesta a auxinas (excepto bajo LR) y del transporte de estos reguladores durante el crecimiento en luz (bajo LA y LRL). Estos resultados sugieren además la participación de los receptores fitocromo y *cry1* en el cambio de “procesos” durante la transición oscuridad-luz. Este concepto fue ampliamente desarrollado a partir de la caracterización del mutante *prc1* de *Arabidopsis*, con el cual se identificaron dos vías génicas distintas en el control de la elongación de células del hipocótilo, una durante el crecimiento en luz y otra en condiciones de oscuridad (Desnos *et al.* 1996). Es posible que la similitud de la respuesta a TIBA en las plántulas mutantes *cry1* crecidas tanto en LA como en oscuridad (Figura 28) sea consecuencia de la incapacidad de *cry1* de ejercer un control sobre el crecimiento del hipocótilo independiente del transporte de auxinas.

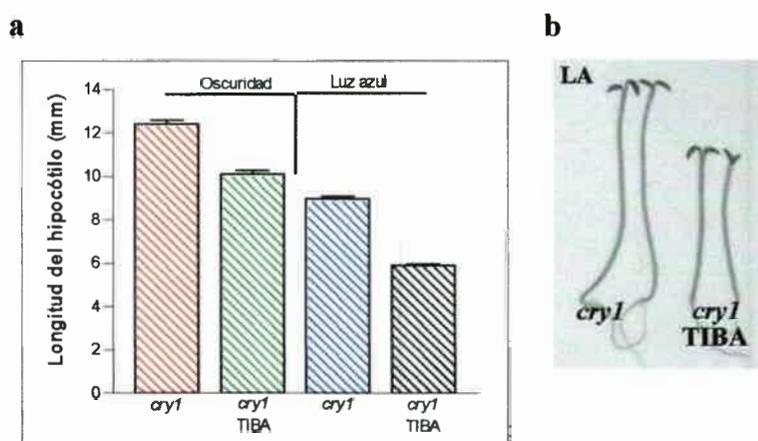


Figura 28. Efecto del inhibidor del transporte de auxinas TIBA sobre la longitud del hipocótilo de mutantes *cry1* crecidos 3 d en luz azul (LA, $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) u oscuridad. Semillas germinadas del mutante *cry1*, se transfirieron a cajas de Petri con $5 \mu\text{M}$ TIBA. En la figura a, cada barra representa la longitud promedio \pm SE de 40 plántulas por cada tratamiento. Las barras acompañadas por letras iguales no difieren estadísticamente a un $P=0.05$. Figura b, Plántulas mutantes *cry1* crecidas en cajas de Petri con $5 \mu\text{M}$ TIBA, durante 3 d en LA.

Frecuentemente se ha propuesto que el ABA regularía el crecimiento del tallo en forma antagónica a las GAs (Hoffmann-Benning y Kende 1992, Shi *et al.* 1992, Shi y Olszewski 1998), y que los niveles de esta hormona pueden ser regulados por luz (Baraldi *et al.* 1995,

Kraepiel *et al.* 1994, Volmaro *et al.* 1998). Con el objeto de analizar si la diferencia entre las tasas de crecimiento del hipocótilo de plántulas silvestres y mutantes *cry1* se debe a un mayor contenido de ABA en las plántulas silvestres, se determinó la cinética de crecimiento de plántulas silvestres tratadas con distintas concentraciones de Fluridona, un inhibidor de la síntesis de ABA (Bartels y Watson 1978, Johson-Flanagan 1991, Sandmann 2001, **Figura 29**). Como muestra la **Figura 29**, la disminución del contenido de ABA en los tejidos no tuvo ningún efecto diferencial sobre la tasa de crecimiento bajo LA, sugiriendo que *cry1* media la respuesta de inhibición del crecimiento en plántulas silvestres sin afectar los niveles de ABA.

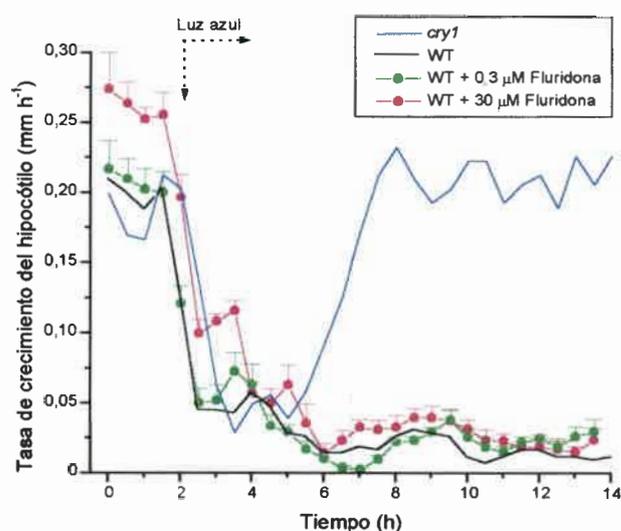


Figura 29. Efecto del inhibidor de la síntesis de ABA, Fluridona, sobre la tasa de crecimiento de plántulas silvestres (WT) crecidas en luz azul (450 nm, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Plántulas etioladas silvestres (2 d de edad) se transfirieron a cajas de Petri con 0,3 y 30 μM Fluridona, y crecieron por 2 h en oscuridad antes del inicio del tratamiento lumínico (representado por una flecha). Cada punto representa la media \pm SE de 8 mediciones para cada tratamiento.

Algunos estudios indican que los sistemas fitocromo y criptocromo regulan la elongación del tallo, al menos en parte, modulando los niveles hormonales y/o sensibilidad de los tejidos a distintos reguladores del crecimiento (Baraldi *et al.* 1995, Behringer y Davies 1992, Jones 1992, Jones *et al.* 1991, Kraepiel *et al.* 1994, O'Neill *et al.* 2000, Reid 1988, Reid *et al.* 2000, Symons y Reid 2003, Volmaro *et al.* 1998, Weatherwax *et al.* 1996). Sobre la base de los datos de cinética del crecimiento obtenidos a partir de los distintos ensayos farmacológicos realizados con el objeto de evaluar la participación hormonal en la respuesta

inhibitoria del crecimiento mediada por *cry1*, se seleccionó el período de 6 h de LA y oscuridad como el tiempo más adecuado para un análisis comparativo de los niveles de GAs, IAA y ABA en plántulas silvestres y mutantes *cry1*. Debido al pequeño tamaño de las plántulas etioladas (2 d de edad) utilizadas en todos los experimentos de crecimiento realizados, fue imposible separar hipocótilo de cotiledones; por lo que la cuantificación hormonal se realizó utilizando la parte aérea (hipocótilo + cotiledones) de plántulas silvestres y mutantes *cry1*.

Dado que la concentración de GA_4 en tallos de plantas adultas de *Arabidopsis* es una orden de magnitud mayor a la de GA_1 , y que los mutantes deficientes en GAs presentan una mayor respuesta a la aplicación de GA_4 , se ha propuesto que GA_4 sería la principal GA activa en esta especie (Talon *et al.* 1990). Sin embargo se ha demostrado que la GA_4 aplicada exógenamente puede ser convertida a GA_1 a través de la actividad de 13α -hidroxilasas en tallos de *Arabidopsis* (Kobayashi *et al.* 1993). Consecuentemente, se midieron en este trabajo los niveles de las GAs bioactivas, GA_4 y GA_1 , así como también, sus productos de inactivación por 2β -hidroxilación, GA_{34} y GA_8 , respectivamente, mediante GC-MS-SIM. Los resultados (**Tabla I**) muestran claramente que el nivel de GA_4 en la parte aérea de plántulas silvestres crecidas 6 h en LA, fue 3 veces mayor al medido en los otros tratamientos. Ni la concentración de GA_4 en plántulas silvestres y mutantes *cry1* crecidas en oscuridad, ni aquella medida en mutantes *cry1* crecidos en LA, fue afectada. Similares resultados se obtuvieron al cuantificar los niveles de GA_1 en las plántulas correspondientes a los diferentes tratamientos. El crecimiento de plántulas silvestres durante 6 h de LA, incrementó 4 veces el nivel de GA_1 en la parte aérea; sin embargo, no se observaron variaciones de la concentración de GA_1 en los otros tratamientos. Este modelo de activación de la formación de GAs activas por LA ha sido encontrado en organismos tan diferentes como plantas del género *Prunus* (Baraldi *et al.* 1995) o bacterias del género *Azospirillum* (Piccoli y Bottini 1996).

Un patrón similar al observado para el contenido de las GAs bioactivas GA_4 y GA_1 , se encontró para los precursores inmediatos de estas GAs (**Tabla I**). El nivel de GA_9 , el precursor que da como producto de 3β -hidroxilación a GA_4 , fue mayor en plántulas silvestres crecidas 6 h en LA, coincidente con la más alta concentración de GA_4 medida. También, altos niveles del precursor de GA_1 , GA_{20} , fueron cuantificados en plántulas silvestres crecidas en

LA; sin embargo, el más alto contenido de GA₂₀ se registró en mutantes *cry1* crecidos 6 h en LA. Esto sugiere que la baja concentración de GA₁ en este mutante pueda deberse o bien a una represión de la actividad 3β-hidroxilativa que convierte a formas inactivas (GA₂₀) en formas biológicamente activas (GA₁), o a una alta tasa de desactivación de GAs, como la 2β-hidroxilación o conjugación. En este sentido, trabajos realizados en el género *Prunus*, reportaron que la iluminación con LA aumenta las formas conjugadas de GAs (Baraldi *et al.* 1990 y 1995).

El más alto contenido endógeno de las GAs bioactivas (GA₄ y GA₁) en plántulas silvestres en relación al de los otros tratamientos, sugeriría que la baja tasa de crecimiento y el fenotipo “hipocótilo corto” observado durante las 6 h de LA (y por las próximas 6 h de irradiación, **Figura 20**) es el resultado de una disminución temprana, mediada por *cry1*, de la sensibilidad de los tejidos de plántulas silvestres a GAs activas. En *P. sativum* O'Neill *et al.* (2000) demostraron que el nivel de la principal GA bioactiva sobre alargamiento caulinar, GA₁, disminuye rápidamente durante las primeras 24 h de exposición a luz blanca, para luego aumentar dicho nivel en los tallos en elongación y alcanzar niveles similares a aquellos encontrados en plantas de arveja crecidas en oscuridad. De este modo la inhibición de la elongación del tallo que continúa aún cuando los niveles de GA₁ vuelven a valores suficientes u “homeostáticos”, sería atribuible a una reducción de la sensibilidad de los tejidos en crecimiento del tallo a GA₁ (Reid 1988). Estudios posteriores en plantas de arveja mostraron que el *phyA* y un receptor específico de LA reducen el nivel de GA₁ de tallo reprimiendo la expresión del gen *PsGA3ox1*, el cual codifica una GA 3-oxidasa que cataliza la conversión de GA₂₀ a GA₁, y activando el gen *PsGA2ox2* que codifica una GA 2-oxidasa que inactiva a GA₁ convirtiéndola en su producto catabólico GA₈ (Reid *et al.* 2002).

La discordancia entre el alto contenido de GAs activas y la baja tasa de crecimiento registrada en plántulas silvestres crecidas en LA, hace pensar que el receptor *cry1* podría actuar sobre diferentes reguladores transcripcionales (positivos y/o negativos) para inhibir la expresión de genes inducidos por GAs (**Figura 19**), y así prevenir la respuesta en aquellos tejidos con altos niveles de GAs bioactivas.

La remoción de GAs activas tiene lugar principalmente por 2β-hidroxilación, un paso catabólico que desactiva las GAs bioactivas en la elongación del tallo, y secundariamente a través del proceso de conjugación. Con el objeto de analizar el posible efecto del receptor *cry1*

sobre la actividad 2 β -hidroxilativa, se cuantificaron los niveles endógenos de los productos de inactivación de GA₁ y GA₄ (**Tabla I**). La concentración de GA₃₄, el producto inactivo de la 2 β -hidroxilación de GA₄, no pudo ser calculado debido a la carencia del estándar [²H₂]GA₃₄. Los resultados en la **Tabla I** muestran que el crecimiento de plántulas mutantes *cry1* durante 6 h de LA, resultó en un incremento significativo de los niveles de GA₈ (producto de inactivación de GA₁), mientras que no se observaron cambios en la concentración de este metabolito 2 β -hidroxilado en los otros tratamientos. Estos datos sugieren que el receptor *cry1*, regularía los niveles de GAs activas, no sólo activando el paso de 3 β -hidroxilación, sino también, tendría un efecto inhibitor sobre la actividad 2 β -hidroxilasa.

Las mediciones de los niveles de IAA (**Tabla I**), mostraron que en plántulas silvestres la concentración de dicha hormona fue 5 a 10 veces mayor que en plántulas mutantes *cry1*, independientemente del tratamiento lumínico. De este modo, el fenotipo “hipocótilo corto” característico de las plántulas silvestres crecidas en LA (**Figura 20**), no sería consecuencia de un efecto de *cry1* sobre la concentración de IAA de los tejidos.

Las cuantificaciones de ABA en la parte aérea de plántulas silvestres y mutantes *cry1* crecidas tanto en LA como en condiciones de oscuridad, no mostraron diferencias significativas; sugiriendo que el ABA no formaría parte de las señales desencadenadas por *cry1* para controlar el crecimiento del hipocótilo.

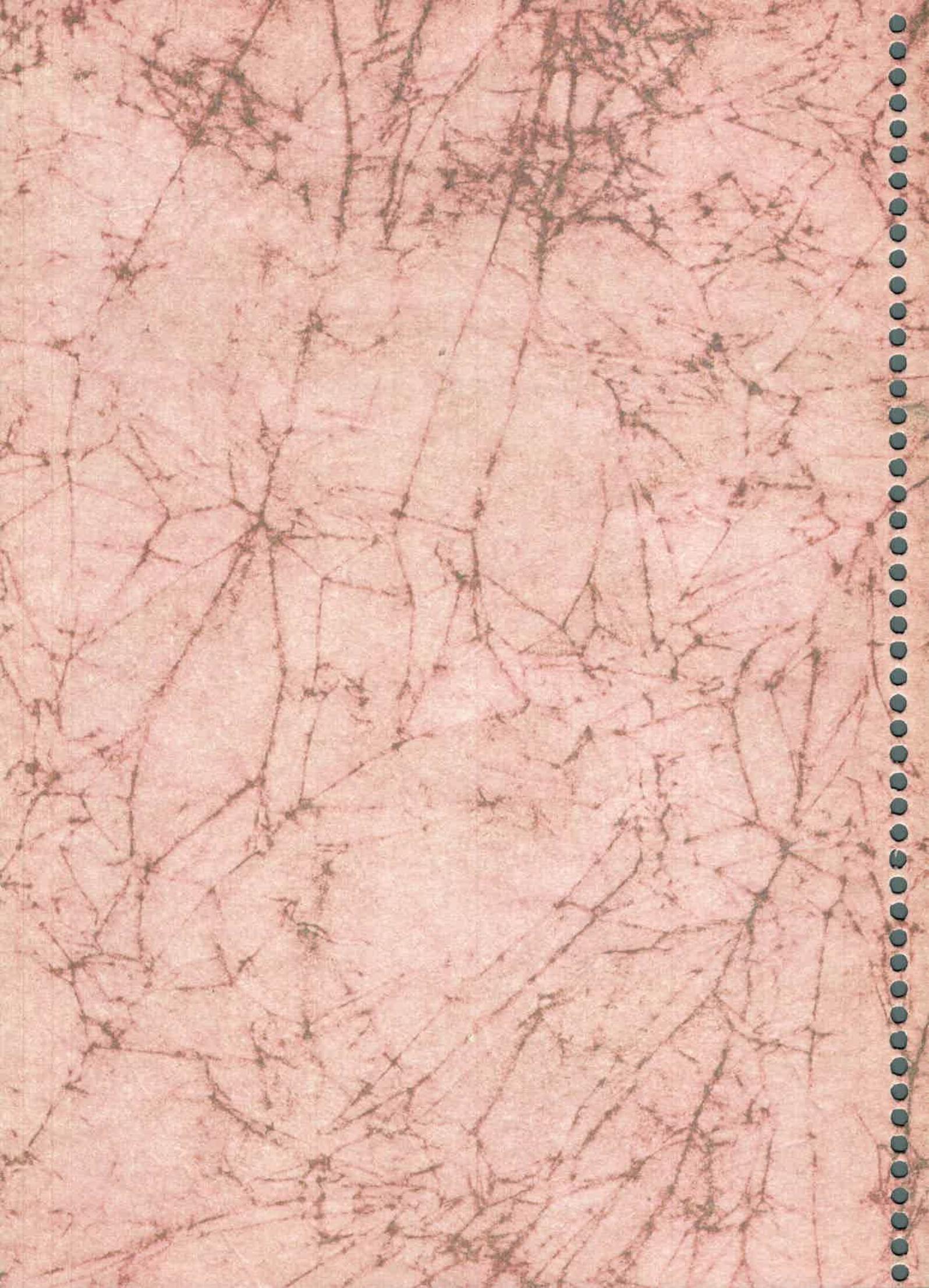
Tabla I. Niveles endógenos de GAs, IAA y ABA (ng g^{-1} PF) en parte aérea de plántulas silvestres (WT) y mutantes *cry1* de *Arabidopsis thaliana* crecidas 6 h en luz azul (LA), o 6 h en oscuridad (D).

Plántulas silvestres y del mutante *cry1* crecieron 2 d en oscuridad a 24°C, luego permanecieron bajo estas mismas condiciones (D) o fueron transferidas a luz azul (450 nm, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por un período de 6 h. La parte aérea (hipocótilo + cotiledones) fue cosechada y se midieron las concentraciones de GA₄, GA₁, GA₃₄, GA₈, IAA y ABA mediante GC-MS-SIM. Los resultados representan la media \pm SE de dos mediciones para cada tratamiento.

	GAs					IAA	ABA
	GA ₉	GA ₄	GA ₂₀	GA ₁	GA ₈		
WT-D	103 \pm 68	58 \pm 7	128 \pm 36	31 \pm 9	9 \pm 2	2104 \pm 557	140 \pm 25
WT-LA	330 \pm 216	145 \pm 38	304 \pm 81	144 \pm 44	9 \pm 3	3126 \pm 653	153 \pm 5
<i>cry1</i> -D	*	47 \pm 6	22 \pm 17	28 \pm 9	8 \pm 1	492 \pm 91	115 \pm 90
<i>cry1</i> -LA	50 \pm 23	41 \pm 6	537 \pm 121	45 \pm 9	252 \pm 44	223 \pm 96	178 \pm 56

*, muestra perdida

CAPÍTULO III
ACCIÓN TEMPRANA DEL RECEPTOR CRY1
SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA



CAPITULO III

ACCIÓN TEMPRANA DEL RECEPTOR CRY1 SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA

III.1. INTRODUCCIÓN

La LA de alta intensidad inhibe marcadamente la rápida elongación de hipocótilos etiolados (Cosgrove 1994), y esta inhibición, al menos en hipocótilos de lechuga, esta directamente relacionada a la fluencia de fotones de LA (Volmaro *et al.* 1998). En plántulas de *Arabidopsis* la inhibición del crecimiento comienza luego de tan sólo 30 s del inicio de la irradiación (Parks *et al.* 1998), y es mediada por el receptor del fototropismo, phot1 (Folta y Spalding 2001a). Posteriormente, la influencia de phot1 sobre la primera fase de inhibición del crecimiento se pierde y un mecanismo dependiente de cry1, o fase criptocromo, controla el crecimiento luego de 30 min de irradiación con LA (Folta y Spalding 2001a, Parks *et al.* 1998). Se ha comprobado que sería necesaria la participación de cry2, phyA y la activación de canales aniónicos de la membrana plasmática para el desarrollo de la fase criptocromo (Folta y Spalding 2001a y b, Parks *et al.* 2001, Spalding 2000). La activación de canales aniónicos y la depolarización de la membrana plasmática en la cadena de transducción de señales desencadenada por los receptores cry1, cry2 y phot1, pocos segundos después del comienzo de la irradiación con LA (Folta y Spalding 2001a, Spalding 2000), parece ser importante para el comienzo pero no para mantener la inhibición del crecimiento dependiente de cry1. Al parecer, algunas acciones de cry1 serían citoplásmicas, concordando con el hecho que cry1 es exportado al citosol en respuesta a luz, tales como la activación de canales aniónicos; mientras otras involucrarían cambios en la expresión de genes fotomorfogénicos, quizá a través de la interacción directa con reguladores nucleares (Jiao *et al.* 2003, Lin 2002a, Wang *et al.* 2001, Yang *et al.* 2000).

Para tener una visión más clara de cómo cry1 controla el crecimiento del tallo, sería necesario conocer los genes cuyos niveles de expresión son regulados por este receptor. Afortunadamente se cuenta con métodos de análisis de los perfiles de expresión génica, tales como el análisis transcriptómico comparativo usando microarreglos de ADN, que permiten medir los niveles de expresión relativos de cientos de genes simultáneamente (Schena *et al.* 1995). Recientemente esta técnica se ha utilizado para el estudio de aquellos genes regulados



por el phyA y B y los cambios en su nivel de expresión durante los tratamientos con LRL y LR, respectivamente (Tepperman *et al.* 2001 y 2004). Además, la técnica ha permitido determinar los efectos de las mutaciones en los genes participantes “corriente abajo” en la cascada de señales desencadenadas por el phyA bajo LRL (Wang *et al.* 2002). Este análisis comparativo permitió identificar un cierto grado de solapamiento en grupos de genes cuyos niveles de expresión son controlados tanto por el fitocromo como por el criptocromo bajo LA (Ma *et al.* 2001). El crecimiento bajo LA de plántulas doble mutantes *cry1cry2* y líneas transgénicas que sobreexpresan *cry1*, permitió identificar aquellos genes presentes en el microarreglo que son regulados por los receptores criptocromo, los cuales incluyen tanto aquellos que participan en el control del crecimiento, como así también los responsables de la producción de antocianinas (Ahmad *et al.* 1995, Noh y Spalding 1998), del control del ritmo circadiano (Devlin y Kay 2000), y otros aspectos de la fotomorfogénesis controlados por el receptor *cry1*.

Los estudios de cinética de crecimiento en plántulas de *Arabidopsis* han permitido identificar el comienzo de la fase criptocromo dependiente de *cry1*, y así utilizar esta información para diseñar un experimento con microarreglos de ADN para identificar, en plántulas silvestres y mutantes *cry1*, genes con expresión diferencial que participan en la respuesta de crecimiento dependiente de *cry1*. De esta forma es posible minimizar la inclusión de genes no relacionados con la inhibición del crecimiento, o aquellos cuyos cambios en los niveles de expresión son una consecuencia de esta respuesta del crecimiento. Si bien en este estudio se identificaron varios genes que participarían en la cascada de transducción de señales inducida por *cry1*, la discusión se centrará principalmente en la expresión diferencial de genes involucrados en el control celular del crecimiento del hipocótilo y del metabolismo hormonal.



III.2. MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.a. Material vegetal y condiciones de crecimiento

En los ensayos de microarreglos se utilizó ARN de plántulas de *Arabidopsis thaliana* expuestas 45 min a LA continua o crecidas en completa oscuridad por el mismo período de tiempo. Se realizaron dos repeticiones utilizando plántulas silvestres y mutantes *cry1-304* (alelo nulo, Ahmad y Cashmore 1997) del ecotipo Columbia (Col), y una repetición usando plántulas silvestres y mutantes *hy4-101* (alelo nulo, Ahmad y Cashmore 1993) del ecotipo Landsberg (Ler). Dado que la mutación *cry1* es suficiente para limitar la inhibición del crecimiento luego de 45 min de LA (Folta y Spalding 2001a), los ensayos se realizaron utilizando sólo mutantes *cry1* en lugar de plántulas doble mutantes *cry1cry2*. Semillas correspondientes a los distintos genotipos fueron desinfectadas con etanol 75% + Tritón X-100 0,1% durante 30 s. Luego fueron enjuagadas 3 veces con agua destilada estéril y, una vez secas, se sembró aproximadamente 0,1 ml de semillas en cajas de Petri con agar 1% (Difco Laboratories, Detroit, MI), 1 mM CaCl₂, 1 mM KCl (medio agar buffer). Se estratificaron por 48 h a 4°C en oscuridad y posteriormente se irradiaron con luz blanca (20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 15 min para sincronizar la germinación. Las plántulas crecieron en oscuridad durante 32-36 h a 23°C (hasta alcanzar una longitud promedio del hipocótilo de 2-3 mm), y luego fueron expuestas a 45 min de LA (450 nm, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) emitida por un arreglo de luces azules LED (Quantum Devices, Barneveld, WI, USA), o mantenidas en completa oscuridad por el mismo período. El tejido vegetal (parte aérea: hipocótilo + cotiledones) se cosechó inmediatamente en N₂ líquido y almacenó a -70°C hasta su utilización para la extracción de ARN total.

La recolección del material vegetal se realizó bajo luz de seguridad verde (0,002 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).



III.2.b. Preparación de la sonda e hibridación

El método de extracción de ARN total de plántulas de *Arabidopsis* se corresponde con el descrito por Anderson *et al.* (1999). El ARN se preparó utilizando el método de extracción con fenol/ácido triisopropilnaftalen sulfónico (TNS) con sucesivas precipitaciones con LiCl. Para la preparación de la sonda de ARN utilizada en la hibridación del microarreglo se incubaron 5 µg de ARN total con 100 pmol de un cebador oligo(dT) conteniendo una secuencia promotora 5' T7 ARN polimerasa. En la mayoría de los casos los reactivos utilizados se adquirieron en Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). La primera cadena de cADN se sintetizó adicionando al ARN 200 unidades (U/µl) de la transcriptasa reversa SuperScript II, y un buffer comercial "First Strand" (50 mM Tris-HCl [pH 8,3], 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 10 mM ditioteitrol (DDT) y 0,5 mM dNTPs. Se incubó a 16°C por 2 h. La segunda cadena se sintetizó utilizando 40 unidades (U/µl) de ADN polimerasa de *Escherichia coli*, 10 unidades (U/µl) de *E. coli* ligasa, y 2 unidades (U/µl) de RNasa H con un buffer comercial "Second Strand" (25 mM Tris-HCl [pH 7,5]), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM (NH₄)SO₄, 0,15 mM beta-NAD⁺), 1 mM dNTPs y 1,2 mM DTT. La reacción de síntesis de la doble cadena se realizó a 16°C durante 2 h, utilizando EDTA para terminar la reacción. Los productos de reacción de doble cadena, cADN, se purificaron utilizando fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) como solventes de extracción y etanol para la precipitación. El cADN se usó para la síntesis de las sondas de cARN biotiniladas vía transcripción in vitro (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY, USA). Los cARNs biotinilados se purificaron usando el kit Rneasy Plant Mini Prep (Qiagen, Valencia, CA, USA). El cARN se fragmentó a 95°C por 30 min con buffer de fragmentación (40 mM Tris-acetato [pH 8,1], 100 mM acetato de K y 30 mM acetato de Mg) para producir ARN oligómeros de una longitud promedio de aproximadamente 50 bp.

Para detectar diferencias en la expresión génica entre plántulas silvestres y mutantes *cry1-304* y *hy4-101* crecidas en LA, se utilizó arreglos de oligonucleótidos Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) GeneChip®. Para la hibridación de los arreglos, los cARNs fragmentados se añadieron a un cocktail de hibridación conteniendo 0,1 mg ml⁻¹ de ADN de espermatozoos de salmón, 100 mM ácido 2-N-morfolin-etano-sulfónico (MES), 1 M CaCl₂, 20 mM EDTA y



0,01% Tween 20. La mezcla de hibridación se calentó a 99°C por 5 min, se centrifugó a 13,000 g por 5 min y el sobrenadante se equilibró durante 5 min a 45°C. La sonda marcada se aplicó al microarreglo prehibridado, el cual se cubrió con un cubreobjetos, se colocó en la cámara de hibridación y se incubó durante 16 h a 45°C y en rotación a 60 rpm. Posteriormente, el arreglo fue lavado y teñido usando "standard Affymetrix fluidics station protocols"; los cuales consistieron en enjuagar el arreglo con el buffer de lavado A (6X SSPE [0,9 M CaCl₂, 0,06 M NaH₂PO₄, 0,006 M EDTA], 0,01% Tween 20) por 10 min a 25°C, y posteriormente la incubación en el buffer de lavado B (100 mM MES, 0,1 M NaCl, 0,01% Tween 20) durante 20 min a 50°C. El arreglo hibridado fue teñido con Streptavidin Ficoeritrina (SAPE, Molecular Probes, Eugene, OR, USA; 100 mM MES, 1 M NaCl, 0,05% Tween 20, 10 µg ml⁻¹ SAPE, 2 mg ml⁻¹ BSA) por 10 min a 25°C, y posteriormente escaneado utilizando un Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) GeneArray Scanner. Con el propósito de amplificar la señal de hibridación, el arreglo se incubó nuevamente en el buffer de lavado A por 20 min y a 25°C, y posteriormente se tiñó utilizando un anticuerpo anti-streptavidin biotinilado (10 min, 25°C). Finalmente el arreglo fue nuevamente teñido utilizando SAPE por 10 min y a 25°C; y luego lavado con buffer A por 30 min a 30°C. El arreglo se escaneó nuevamente para detectar las señales amplificadas.

III.2.c. Análisis estadístico

El análisis inicial de los microarreglo se realizó utilizando el software Genechip Suite 3.2 (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA). Los datos obtenidos se analizaron posteriormente usando los softwares Microsoft Excel 2000 y Access 2000. Para cada elemento presente en el microarreglo se determinó la relación entre la señal del transcripto presente en mutantes *cry1/hy4* y la de plántulas silvestres. Para determinar la significancia de las diferencias en la abundancia de transcriptos entre plántulas silvestres y mutantes, se aplicó a cada grupo de datos una serie de criterios cualitativos. Si uno de los transcriptos, por alguna razón, no fue reconocido "presente" en una de las repeticiones, se promediaron los cocientes obtenidos a partir de los otros dos ensayos. Si un transcripto estuvo "presente" en las tres repeticiones, entonces se determinó la relación señal mutante/señal silvestre para cada ensayo



y luego dichos valores fueron promediados, a no ser que un cociente fuera tres veces mayor al valor de SD (desvío estándar) del promedio de los tres ensayos. En este caso el dato se excluyó del promedio, limitando de ese modo la contribución de datos que llevan a una sobreestimación del nivel promedio de expresión, para no considerar genes cuyo efecto no fuera significativo sobre el control del crecimiento.

III.2.d. Análisis de ARN por Northern blot

Con el objeto de verificar los resultados obtenidos a partir de la técnica de microarreglos, se analizaron mediante "RNA gel blot" (técnica descrita por Anderson *et al.* 1999) los niveles de transcritos de algunos genes cuya expresión mostraron diferencias entre plántulas silvestres y mutantes *cry1* crecidos 45 min en LA. La sonda de hibridación utilizada para el análisis de una isoforma de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), se generó por PCR a partir del ADN genómico de plántulas silvestres, utilizando los primers 5'-AAAAAGCAAGCTGGTCCCCAAC-3' y 5'-GTTGTTGTTGTTGTAACCGG-3', que amplifican específicamente una región del gen HMGR1L, que es específica para esa transcripción.

III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.3.a. Perfil de transcritos de plántulas silvestres y mutantes *cry1*

Estudios previos sobre la cinética del crecimiento de *Arabidopsis* bajo LA mostraron que el receptor *cry1* comienza a ejercer un control sobre el crecimiento aproximadamente 30 min luego del inicio del tratamiento lumínico (Folta y Spalding 2001a, Parks *et al.* 1998). Es por esto que se seleccionó un tiempo de exposición de 45 min de LA como el más adecuado para realizar el análisis comparativo, basado en microarreglos, de los perfiles de transcritos entre plántulas silvestres y mutantes del receptor *cry1*. De este modo se pudo identificar aquellos genes (presentes en el microarreglo) cuyos niveles de expresión son regulados por *cry1* y participan tempranamente en la respuesta de inhibición de la elongación del hipocótilo. Para cada elemento presente en el microarreglo, se determinó la relación entre la señal del



transcripto en mutantes *cry1* y plántulas silvestres. Los datos presentados corresponden al promedio de tres ensayos independientes realizados con dos alelos *cry1* (*cry1-304* y *hy4-101*) y dos ecotipos silvestres (Columbia y Lansberg).

De los 8297 transcritos y controles representados en el microarreglo, aproximadamente 420 mostraron diferencias de expresión en mutantes *cry1* respecto de plántulas silvestres. De la totalidad de genes dependientes de *cry1* (resultados disponibles en <http://www.arabidopsisthaliana.com/microarrays>, Folta *et al.* 2003), un grupo de ellos fue seleccionado para su análisis teniendo en cuenta su posible participación en el control del crecimiento del hipocótilo (**Tabla II**). Es de notar que la posición de cada gen específico en la **Tabla II** es indicado por un número, con el cual luego es citado dicho gen en el texto. Por ejemplo, un gen que codifica una isoforma específica de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa (14), tuvo un nivel de expresión 3,5 veces mayor (valor promedio de tres ensayos) en mutantes *cry1* comparados con plántulas silvestres. La **Figura 30a**, muestra los resultados de un Northern blot hibridado con la sonda del gen *S80135*, cuyos resultados de expresión corroboraron los niveles obtenidos por microarreglos y confirman la solidez de los datos obtenidos a partir del uso de esta técnica.

El análisis comparativo de los perfiles de transcritos luego de 45 min de LA, mostró que el número de genes con altos niveles de expresión en plántulas silvestres fue aproximadamente el mismo que en mutantes *cry1*. Aquellos transcritos cuyos niveles de expresión mostraron diferencias entre mutantes *cry1* y plántulas silvestres, fueron agrupados y representados en un gráfico de distribución de frecuencias (**Figura 30**), en el cual la diferencia promedio en el nivel de transcritos se expresa en número de veces. Como puede observarse, los niveles de expresión de la mayoría de los transcritos analizados por microarreglos fueron 2 a 4 veces mayores o menores, según el gen, en plántulas del mutante *cry1* (**Figura 30**). Entre los transcritos analizados por microarreglos se observó que los niveles comparativos de expresión de algunos genes fueron del orden de 10 veces mayores o de 2 veces menores. Los mismos fueron excluidos de la **Figura 30** por claridad. Entre los genes sobreexpresados está el *psaA* (U30821) que codifica un componente del fotosistema I. En plántulas silvestres, 45 min de exposición a LA incrementó los niveles del transcripto *psaA* 17,3 veces, mientras que en el mutante *cry1* los niveles de dicho transcripto disminuyeron 7,1 veces luego de la irradiación. Una posible explicación para estos resultados sería que *cry1* no sólo afecta la transcripción

activada por LA del gen *psaA*, sino también la estabilidad de sus transcritos. El gen cuyo nivel de transcritos mostró las mayores diferencias de expresión entre plántulas silvestres y mutantes *cry1*, fue justamente aquel que codifica el receptor *cry1* (*CRY1*), cuyos valores correspondientes a dos ensayos independientes, fueron de 37 y 61 veces mayores en plántulas silvestres comparados a los del mutante *cry1*. Los resultados obtenidos a partir de la técnica de microarreglos coinciden con el hecho de que los dos alelos utilizados en este estudio son nulos para el gen *CRY1* (Ahmad y Cashmore 1997).

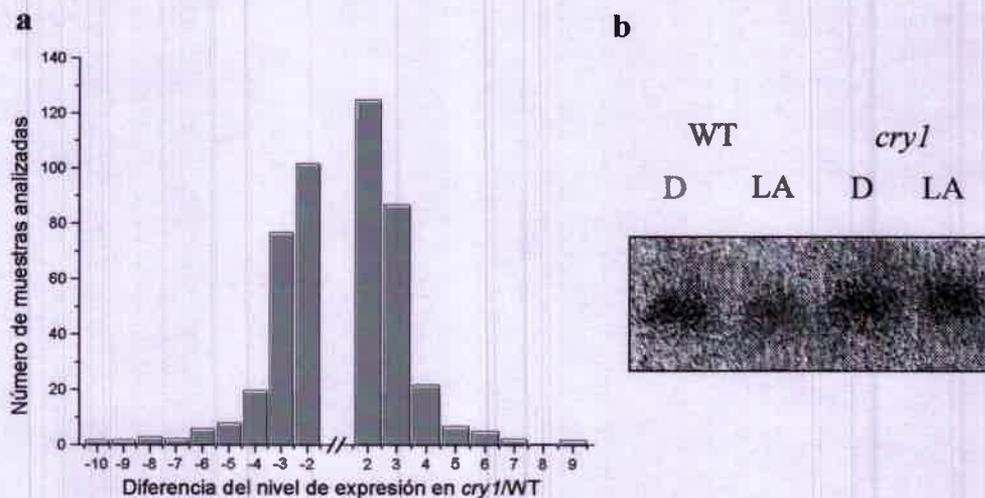


Figura 30. Distribución de frecuencias de genes cuya expresión fue estimulada (+) o reducida (-) en plántulas mutantes *cry1* crecidas 45 min en luz azul (LA, 450 nm, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), y confirmación de la expresión de un gen presente en el microarreglo por Northern blot. **a**, Distribución de frecuencias de transcritos cuyos niveles de expresión (> de 2 veces) fueron afectados por la mutación *cry1*, luego de 45 min de exposición a LA. Los valores representan el promedio de tres ensayos independientes, realizados utilizando dos alelos mutantes y dos ecotipos diferentes (ver Materiales y Métodos). **b**, Los resultados de sobreexpresión en mutantes *cry1* obtenidos por microarreglo para una isoforma de la HMG-CoA reductasa se confirmaron por Northern blot.

Los genes que mostraron expresión diferencial fueron clasificados y agrupados en distintas categorías según lo descrito por Tepperman *et al.* (2001), exceptuando las categorías de “pared celular” y “ciclo celular” que fueron incorporadas como dos nuevos grupos y la de “crecimiento y desarrollo” que fue excluida del análisis (**Figuras 31a y b**). Mientras que la **Figura 31a** muestra la distribución entre las distintas categorías de aquellos genes subexpresados en plántulas mutantes *cry1*, la **Figura 31b** presenta la distribución de genes sobreexpresados en este mutante. Como puede observarse a través del análisis comparativo de las **Figuras 31a y b**, la distribución de genes (sobreexpresados y subexpresados) entre las

distintas categorías fue bastante similar en el mutante *cry1*. Dos conspicuas excepciones fueron las categorías “hormona” y “ciclo celular”.

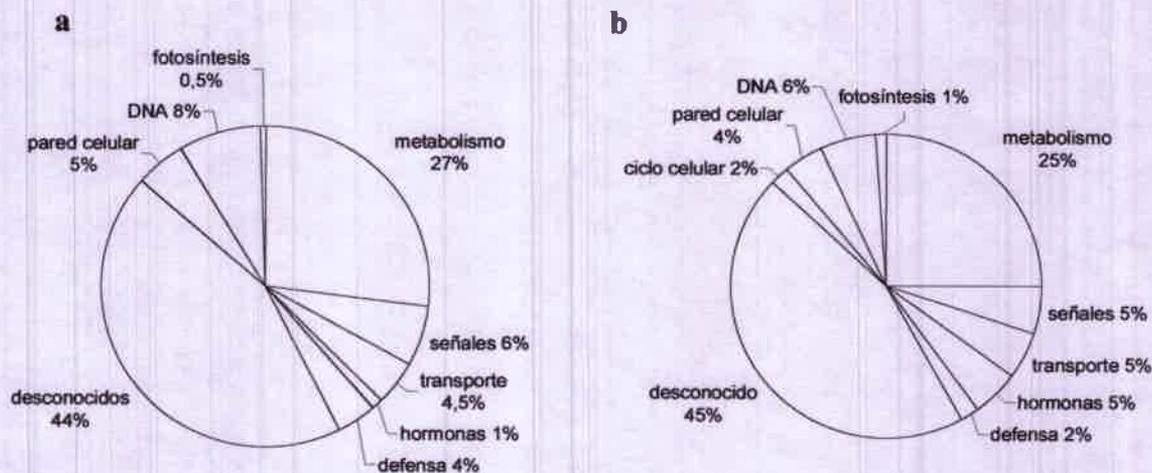


Figura 31. Categorización funcional de los transcritos: **a**, subexpresados y **b**, sobreexpresados en mutantes *cry1*, comparados a los de plántulas silvestres, luego de 45 min de luz azul (LA, 450 nm, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

III.3.b. Ciclo Celular

El análisis de microarreglos mostró que diferentes transcritos que codifican 5 ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas, fueron más abundantes en mutantes *cry1* que en plántulas silvestres crecidas en LA (**Tabla II**). Por ejemplo, el gen que codifica una ciclina tipo D (4), la cual se sabe está involucrada en la transición de fase G1 a fase S (Vandepoele *et al.* 2002), tuvo un nivel de expresión 2,4 veces mayor en mutantes *cry1* comparado con plántulas silvestres (**Tabla II**). Aparentemente, el receptor de LA, *cry1*, suprime el ciclo celular en algún punto durante la de-etiolación de plántulas de *Arabidopsis*. En esta especie se ha observado que el grado de endoreduplicación en las células de hipocótilos etiolados es mayor que aquél de plántulas crecidas en luz (Gendreau *et al.* 1998). Teniendo esto en cuenta y de acuerdo a los datos obtenidos a partir de los experimentos con microarreglos, podría sugerirse que *cry1* participa en la reducción inducida por luz del grado de endoreduplicaciones en las células del hipocótilo de *Arabidopsis*. Sin embargo, en estudios previos se ha demostrado que la cantidad neta de endoreduplicación en hipocótilos del mutante *cry1* sólo es ligeramente



diferente al número observado en plántulas silvestres (Gendreau *et al.* 1998). Cabe destacar que la tasa de fluencia de LA utilizada durante el período de exposición (45 min), fue 5 veces mayor a aquella utilizada en los experimentos de Gendreau *et al.* (1998) y que esta podría ser una explicación a las diferencias observadas. Al igual que lo encontrado en lechuga, donde la respuesta de inhibición de la elongación del hipocótilo bajo LA es dependiente de la intensidad lumínica (Volmaro *et al.* 1998), es posible que en *Arabidopsis* ciertas respuestas inducidas por LA sean también dependientes de la irradiancia. El hecho de que las diferencias en la expresión de genes del ciclo celular (dependientes de *cry1*) estén o no relacionadas a la supresión de la endoreduplicación en el hipocótilo, probablemente no sería relevante para el desarrollo de la inhibición del crecimiento del tallo tras 45 min de LA. Esto es así ya que el proceso involucrado en esta respuesta es la expansión y no la división celular (Cosgrove, 1988). Además, no parece haber correlación entre el grado de endoreduplicación y el tamaño celular o tasa de crecimiento de hipocótilos de *Arabidopsis* (Gendreau *et al.* 1997).

III.3.c. Pared Celular

La elongación de las células del hipocótilo requiere de la relajación y expansión de la pared celular en respuesta a cambios en la presión de turgencia impuestos por la absorción de agua dentro de los compartimentos vacuolares (McCann y Roberts 1994). En este sentido, estudios previos mostraron que la LA reduce la extensibilidad de la pared celular, inhibiendo así el crecimiento del hipocótilo (Cosgrove 1994). Podría esperarse entonces que dentro del complejo de genes dependientes de *cry1* identificados a través de experimentos con microarreglos, se incluyan reguladores de la extensibilidad de la pared celular (Caderas *et al.* 2000, Fry *et al.* 1992, Hayashi *et al.* 1984, McQueen-Mason y Cosgrove 1994). En efecto, dos genes (Tabla II, 18 y 25) representados en el microarreglo, que codifican enzimas que hidrolizan componentes de la pared celular, se sobreexpresaron en el mutante *cry1*. Resultados similares se encontraron en un estudio de microarreglos con plántulas doble mutantes *cry1cry2* crecidas durante 6 d bajo LA (Ma *et al.* 2001).

Los xiloglucanos son componentes de la pared celular, que mantienen unidas a las fibrillas de celulosa y juntos soportan algunos de los estreses mecánicos de la pared celular. Diferentes enzimas, entre ellas las xiloglucan endotransglucosilasas (XETs), clivan los

polímeros de xiloglucano y facilitan nuevas uniones entre polímeros, lo cual libera a éstos de las tensiones y permite el reordenamiento de las microfibrillas de celulosa con la subsecuente expansión de la pared celular (Cosgrove 1999). La disminución, mediada por *cry1*, del nivel de dos transcritos XET (18 y 25), podría contribuir a la inhibición del crecimiento del hipocótilo bajo LA, reduciendo la extensibilidad de la pared celular. De forma similar, la expresión de un gen que codifica para una poligalacturonasa (**Tabla II**, 23), o peptinasa, fue reducida por el receptor *cry1* en plántulas silvestres crecidas en LA. Esto sugiere que una disminución en la tasa de hidrólisis de pectina podría ser una de las modificaciones dependientes de *cry1* que altera la extensibilidad de la pared celular en LA. Entre las enzimas con actividad sobre la relajación de la pared celular, se encuentran la endo-1,4- β -D-gluconasa (Nicol *et al.* 1998), cuyo gen (**Tabla II**, 21) mostró altos niveles de expresión en mutantes *cry1*. Aparentemente, el receptor de LA, *cry1*, controlaría la elongación de las células del hipocótilo regulando (disminuyendo) la expresión de genes participantes en la hidrólisis de la matriz de polisacaridos de la pared celular.

Durante el crecimiento, la expansión celular es acompañada por la deposición de nuevas microfibrillas de celulosa en la pared celular. Al respecto se observó que, los niveles de dos transcritos que codifican a celulosa sintasas (**Tabla II**, 20 y 22), fueron 3,0 y 2,3 veces mayores, respectivamente, en plántulas mutantes *cry1*. Lo que resulta consistente con las mayores demandas en la síntesis de componentes de la pared. Como puede observarse en la **Tabla II**, ninguno de los genes (representados en el microarreglo) que codifican XETs, pectinasas, o celulosa sintasas, fueron subexpresadas en los mutantes *cry1*. Sí se encontró una reducción en los niveles de expresión de algunos genes relacionados a pared celular, como aquellos que codifican quitinasas (**Tabla II**, 19, 27, 29, 30, 32 y 35), calosa hidrolasas (**Tabla II**, 26, 28 y 31), y posibles proteínas de unión de membrana y pared celular (**Tabla II**, 33 y 34).

III.3.d. Hormonas

Sólo el 1% de los genes subexpresados en el mutante *cry1* fueron genes relacionados con hormonas. Por el contrario, el 5% de los genes sobreexpresados se incluyeron dentro de esta categoría. Los transcritos cuyos niveles de expresión fueron significativamente mayores

en mutantes *cry1* correspondieron a genes asociados con la síntesis de GAs, respuesta a auxinas y conjugación de estas hormonas (**Tabla II**, 6-17). Es de notar que los niveles de expresión de otros genes asociados con otras hormonas (por ejemplo, genes involucrados en la síntesis de ABA presentes en el microarreglo), no fueron afectados por la mutación *cry1* bajo LA (datos no mostrados). Teniendo en cuenta los antecedentes que apoyan una participación tanto de GAs como de auxinas en el fotocontrol del crecimiento del tallo (Baraldi *et al.* 1995, Barker-Bridgers *et al.* 1998, Jensen *et al.* 1998, Reid *et al.* 2002, Ross *et al.* 2000, Symons y Reid 2003, Volmaro *et al.* 1998), se realizó un análisis detallado de los genes incluidos dentro de la categoría "hormona".

Los genes *Aux/IAA* son reguladores nucleares inducibles por auxinas que, probablemente en interacción con las proteínas ARF (Auxin Response Factors), regulan la expresión de genes asociados con el crecimiento y desarrollo vegetal (Reed 2001). El nivel de transcritos correspondientes a los genes *IAA5* (6) y *IAA1* (7) fue mayor en mutantes *cry1* comparado con los niveles de plántulas silvestres crecidas 45 min en LA (**Tabla II**). Como puede observarse en la **Figura 32**, esta diferencia en la abundancia relativa de transcritos *IAA5* y *IAA1* se debió a una disminución significativa (2 a 3 veces) en los niveles de ambos transcritos en plántulas silvestres crecidas 45 min en LA, y no fue debido a un cambio en los niveles de dichos genes en plántulas del mutante *cry1*. Aparentemente la LA, actuando a través del receptor *cry1*, inhibió la transcripción de dichos genes y/o desestabilizó sus transcritos. Otro integrante de esta amplia familia génica, cuya expresión fue mayor en mutantes *cry1* comparado a los niveles observados en plántulas silvestres, fue el gen *IAA28* (**Figura 32**). Sin embargo, a diferencia de lo observado para los genes *IAA5* y *IAA1*, la LA estimuló la expresión de *IAA28* tanto en plántulas silvestres como mutantes *cry1*. Los cambios observados en los niveles de expresión de este gen *Aux/IAA* podrían ser el resultado de un mecanismo de inducción que no depende directamente de *cry1* pero que está asociado a un mecanismo de desestabilización de transcritos dependiente de este receptor. En este sentido, se ha observado que la LA de alta intensidad afecta tanto la transcripción como la estabilidad de transcritos específicos (Anderson *et al.* 1999).

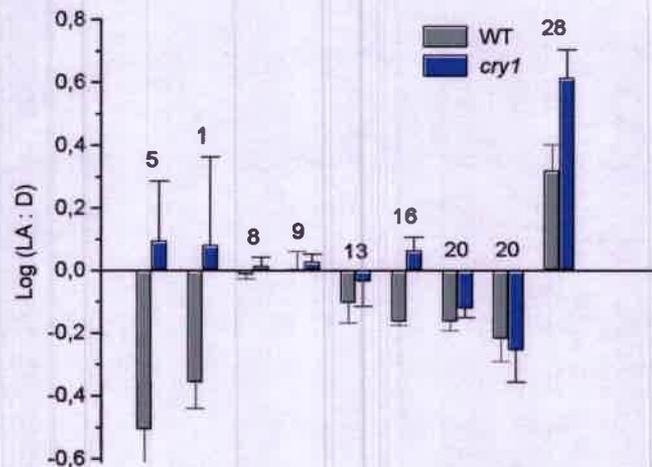


Figura 32. Variación en el nivel de transcritos de genes *Aux/IAA* en plántulas mutantes *cry1* luego de 45 min de exposición a luz azul (LA, 450 nm, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los valores representan el logaritmo de la abundancia relativa del nivel de transcritos de plántulas silvestres (WT) y *cry1* crecidas 45 min en LA, comparado a sus valores en condiciones de oscuridad (D). Las barras representan el promedio \pm SE de tres ensayos independientes. Las dos representaciones del gen *IAA20* en el microarreglo dieron resultados similares, mostrando la alta reproducibilidad de las mediciones.

Otros dos miembros de la familia de genes *Aux/IAA* representados en el microarreglo fueron *IAA8* y *IAA9*. En ambos casos, no se observó efecto alguno como consecuencia de la irradiación con LA o por efecto de la mutación *cry1* (Figura 32). Por el contrario, la irradiación con LA tuvo como efecto una leve disminución en el nivel de transcritos de los genes *IAA13* y *IAA20* (el valor log de $-0,2$ corresponde a una reducción de 1,6 veces en los niveles de expresión), aunque ésta fue independiente de la mutación *cry1* (Figura 32). En términos generales, el hecho que plántulas silvestres presenten menores niveles de expresión de genes *Aux/IAA* comparado a mutantes *cry1*, hace pensar que 45 min de exposición a LA (y no períodos de exposición posteriores a éste) producen una disminución de los niveles de auxinas o de la sensibilidad de los tejidos a esta hormona. Es importante destacar que el patrón de expresión de los genes *Aux/IAA* es específico al tejido vegetal, y que las auxinas inducen la expresión de estos genes en distintos grados y con cinéticas diferentes. Estas diferencias en la cinética de inducción por auxinas sugeriría que algunos genes *Aux/IAA* son parte de la respuesta temprana, mientras que otros podrían formar parte de una respuesta secundaria a auxinas (Reed 2001). Sin embargo, se ha visto que la expresión de los genes *Aux/IAA* puede ser regulada directamente por luz e independiente de los niveles de auxinas; por lo que el análisis de la participación de las auxinas en el crecimiento del hipocótilo dependiente de *cry1*



debe considerar, además de los resultados del microarreglo, aquellos obtenidos en los ensayos de crecimiento y cuantificación hormonal (Capítulo II).

Poco se conoce acerca de los mecanismos que regulan la biosíntesis de IAA en plantas. Se ha demostrado que un mecanismo de tipo retroalimentación negativa controlaría los niveles de IAA (Reed 2001, Tatematsu *et al.* 2004). En este sentido, la sobreexpresión de genes IAA-glucosil transferasa (**Tabla II**, 19) en plántulas del mutante *cryI*, puede ser parte de un mecanismo de retroalimentación que regula los niveles de auxina libre a través de la conjugación. Una parte de las formas conjugadas de IAA se caracterizan por ser reversibles y cumplen en la planta funciones de transporte, almacenaje y fuente de IAA libre mediante hidrólisis. Otras en cambio que no pueden ser hidrolizadas, sirven principalmente como intermediarios para el catabolismo de IAA, removiendo permanentemente dicho compuesto del pool de auxina libre de un tejido en una determinada etapa ontogénica de la planta (Bandurski *et al.* 1995, Bartel *et al.* 1997).

Otros genes incluidos dentro de la categoría “hormonas” que estuvieron representados en el microarreglo y cuyos niveles de expresión mostraron diferencias entre plántulas silvestres y mutantes *cryI*, fueron aquellos involucrados en la ruta biosintética de GAs. Las GA 20-oxidasas catalizan sucesivas reacciones de oxidación formando precursores de GAs, los cuales por 3β -hidroxilación son convertidos a formas “activas” en el crecimiento (Hedden *et al.* 2002, Phillips 1998, Yamaguchi y Kamiya 2000). La exposición a 45 min de LA indujo en plántulas *cryI* la sobreexpresión de un gen *GA 20-oxidasa* (15) y de un gen codificando una posible GA β -hidroxilasa (17). Estas diferencias en el nivel de transcriptos involucrados en la síntesis de GAs, sugerirían que los mutantes *cryI* crecidos en LA tendrían una mayor capacidad de síntesis de estas hormonas, comparada a la de plántulas silvestres. Sin embargo, las mediciones de los niveles endógenos de las giberelinas, GA₄ y GA₁ (**Tabla I**), mostraron que la concentración de estas formas activas es mayor en plántulas silvestres crecidas en LA, comparada a la de mutantes *cryI* bajo las mismas condiciones de crecimiento. Esto se ve corroborado por mediciones hechas en otras especies, donde la LA incrementó la síntesis de GAs (Baraldi *et al.* 1995). Al parecer, un mecanismo de desactivación de GAs estaría regulando los niveles de formas activas para el crecimiento. En este sentido, los mutantes *cryI* crecidos 45 min en LA, mostraron los mayores niveles de expresión de una GA 2-oxidasa



(16), enzimas responsables de la desactivación de GAs por 2 β -hidroxilación (Hedden y Phillips 2000, Olszewski *et al.* 2002).

III.3.e. Quinasas

De los aproximadamente 400 genes que codifican para quinasas representados en el microarreglo, sólo la expresión de unos pocos fue dependiente del receptor *cry1* activado por LA (**Tabla II**, 36-49). Luego de 45 min de exposición, los mutantes *cry1* presentaron niveles bajos de expresión tanto de transcritos homólogos a la subunidad catalítica de una quinasa de levadura que sensa azúcares, SNF1 (40), como de la subunidad regulatoria SNF4 (48) requerida para la activación de SNF1 (Kleinow *et al.* 2000). La co-regulación de esta quinasa SNF1 y de la subunidad regulatoria SNF4 constituye un dato interesante que lleva a pensar sobre la posibilidad de que este complejo regule positivamente un paso temprano de fosforilación en el mecanismo de acción de *cry1* que conduce a la inhibición del crecimiento. Cabe destacar que de las 12 quinasas tipo SNF1 representadas en el microarreglo, sólo la anteriormente citada y su subunidad regulatoria mostraron expresión diferencial durante el análisis.

Las quinasas de plantas tipo SNF1 fosforilan proteínas que contienen motivos SAMS. La HMG-COA reductasa, enzima clave involucrada en los primeros pasos de la ruta del ácido mevalónico que produce esteroides e isoprenoides (**Figura 9**), es una de estas proteínas SAMS (Dale *et al.* 1995) cuya expresión es regulada por luz (Learned 1996). La fosforilación inducida por SNF1 inhibe la acción de la proteína HMG-COA reductasa, con lo cual esta regulación podría afectar el fotocontrol del crecimiento del tallo al variar el metabolismo de hormonas tales como los BR (**Figura 9**, Salchert *et al.* 1998). Por consiguiente, es posible que la enzima HMG-COA reductasa, la quinasa tipo SNF1 y su subunidad regulatoria SNF4, sean reguladas por *cry1* para controlar la biosíntesis hormonal bajo LA. En este sentido, ensayos de crecimiento de plántulas silvestres y mutantes *cry1* tratadas con distintas concentraciones de Brasinólido (BL, **Figura 33**), mostraron que mientras la aplicación exógena de esta hormona no produce efecto alguno sobre el crecimiento del hipocótilo de mutantes *cry1* crecidos en LA, las concentraciones más altas de BL utilizadas fueron capaces de producir un significativo efecto estimulador sobre el crecimiento de plántulas silvestres. Esto nos estaría sugiriendo que



la fotoinhibición del crecimiento del hipocótilo mediada por cry1 no parece involucrar una disminución de la respuesta de los tejidos del tallo a BR, y que posiblemente cry1 regule el crecimiento variando los niveles endógenos de BR activos. Sin embargo, es necesario destacar que tanto las plántulas silvestres como la de mutantes *cry1* crecidas en LA con la aplicación de BL exhibieron un hipocótilo significativamente "ondulado" y acompañado en algunos casos por un color amarillento pálido, hecho que hace pensar en un posible efecto del etileno sobre el crecimiento. En efecto, existen algunos estudios que indican una interacción entre la síntesis de etileno y BR. En este sentido se ha visto que BL promueve la expresión de genes que codifican para una ACC sintasa (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa), lo que resulta en un aumento endógeno de etileno (Nemhauser y Chory 2002). Además, la aplicación exógena de BL estimularía la producción de etileno en epicótilos de arveja crecidos en oscuridad (Brosa 1999, Symons y Reid 2003). Estos antecedentes nos llevan a pensar que posiblemente la elongación del hipocótilo observada en plántulas silvestres de *Arabidopsis* tratadas con BL (**Figura 33**) pueda ser en parte la consecuencia de una producción de etileno inducida por este regulador, y no exclusivamente el efecto directo de la aplicación de este BR activo sobre el crecimiento. Por lo que sería interesante en un futuro cuantificar los niveles endógenos tanto de BR como de etileno en plántulas silvestres y mutantes *cry1* de *Arabidopsis* crecidas en LA y oscuridad, y así analizar la participación de estos reguladores del crecimiento en la casacada de señales desencadenada por el receptor cry1. En este estudio no ha sido posible llevar a cabo estas mediciones por carecer de isótopos estables de BL para su cuantificación por GC-MS.

Miembros de otra clase de quinasas de proteínas y posibles quinasas representadas en el microarreglo, mostraron también diferencias en los niveles de expresión entre plántulas silvestres y mutantes *cry1*. Por ejemplo, la proteína codificada por el gen At2g42630 (**Tabla II**, 36), semejante a una MAP quinasa tuvo una expresión 3,9 veces mayor en mutantes *cry1*, y transcriptos del fitocromo E (**Tabla II**, 38), se sobreexpresados 2,4 veces en plántulas *cry1* expuestas 45 min a LA.

La quinasa tipo receptor RLK3 (**Tabla II**, 37), la cual se sabe es inducida por estrés oxidativo y tratamiento con ácido salicílico (Czernic *et al.* 1999), fue una de las pocas proteínas de esta amplia familia génica cuyos niveles de expresión presentaron variación entre plántulas silvestres y mutantes (2,7 veces mayor en *cry1* comparado a los valores registrados

en plántulas silvestres). Los transcritos correspondientes a otras cuatro quinasas tipo receptor (Tabla II, 39, 41, 42 y 49) mostraron también variaciones en los niveles de expresión entre mutantes *cry1* y plántulas silvestres, siendo, en todos los casos, mayores los niveles de expresión en plántulas silvestres (entre 2,0 y 6,2 veces).

El fotorreceptor *cry2*, el cual se sabe participa junto con *cry1* en el control de la fase temprana de inhibición del crecimiento (Folta y Spalding 2001a), es fosforilado en respuesta a LA (Shalitin *et al.* 2002). También, los canales aniónicos que intervienen en la depolarización temprana de la membrana plasmática inducida por LA y mediada por *cry1* (Spalding 2000), son controlados por fosforilación (Frachisse *et al.* 2000, Li *et al.* 2000). Ejemplos como éstos nos llevarían a pensar que existe un número considerable de genes de quinasas con niveles de expresión diferencial entre plántulas silvestres y mutantes *cry1*. Sin embargo, vimos que sólo pocos miembros de esta amplia familia génica estén diferencialmente expresados, por lo que sería interesante en futuros experimentos estudiar mediante técnicas de silenciamiento génico aquellos genes quinasa identificados y analizar su participación en la señalización del receptor *cry1*.



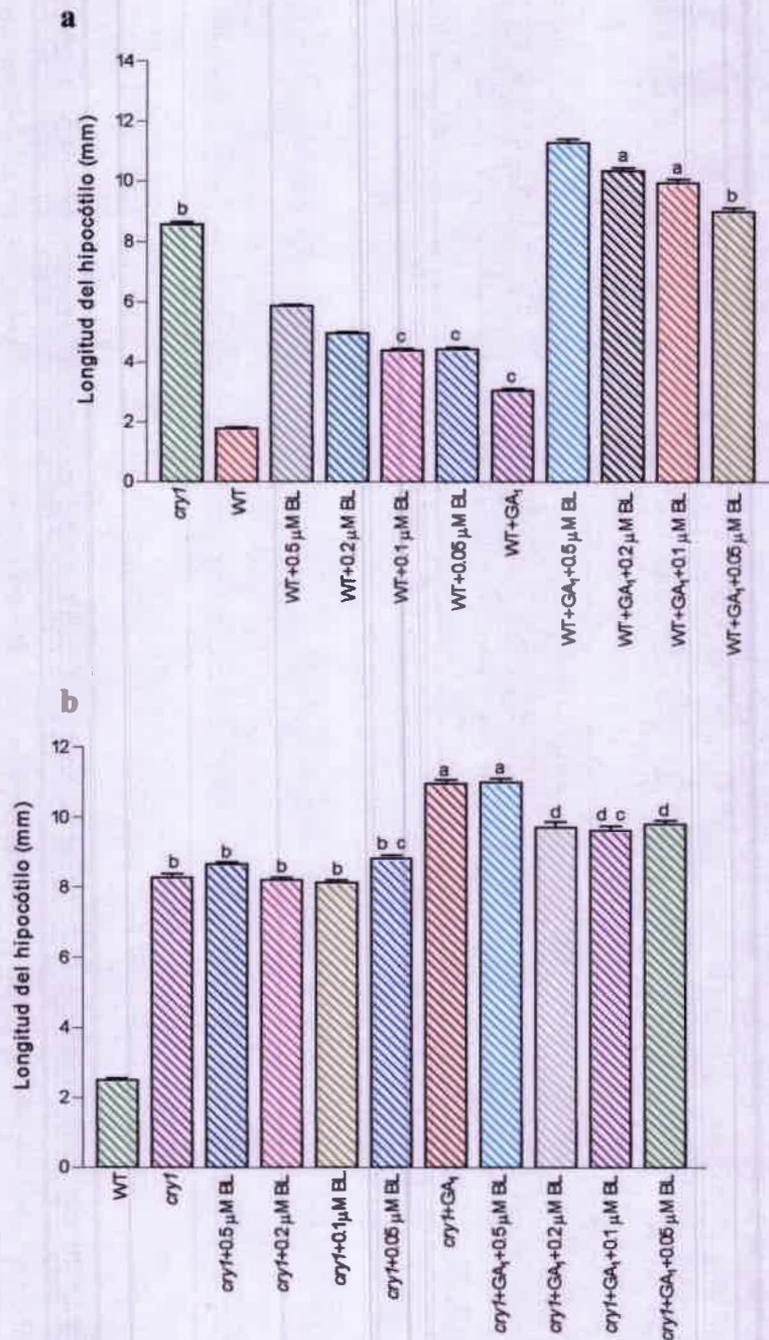


Figura 33. Efecto de Brasinólido (BL), GA₁ y de GA₁ + BL sobre la longitud del hipocótilo de: **a**, plántulas silvestres (WT) y **b**, mutantes *cry1* crecidas 3 d en luz azul (LA, 20 μ mol m⁻² s⁻¹). Semillas germinadas, silvestres y del mutante *cry1*, se transfirieron a cajas de Petri con 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 μ M BL, 150 μ M GA₁ y BL + 150 μ M GA₁, y crecieron durante 3 d en LA. Cada barra representa la longitud promedio \pm SE de 40 plántulas por cada tratamiento. Donde las barras de SE no son visibles, los valores de SE quedaron incluidos dentro de las dimensiones de la barra del promedio. Las barras acompañadas por letras iguales no difieren estadísticamente a un P=0,05.

III.3.e. Factores de transcripción

Las señales lumínicas captadas por distintos fotorreceptores son capaces de regular tempranamente la expresión de un amplio número de genes que codifican múltiples factores de transcripción. En este sentido, es importante destacar que estudios con microarreglos mostraron que el 44% del pequeño grupo de genes regulados tempranamente por LRL (1 h de exposición) codifican para múltiples factores de transcripción (Tepperman *et al.* 2001).

La mayoría de los factores de transcripción representados en el microarreglo se expresaron en niveles similares en plántulas silvestres y mutantes. De los aproximadamente 100 factores de transcripción codificados por genes tipo MYB presentes en el microarreglo, sólo 5 mostraron una expresión dependiente de *cry1* (Tabla II, 53, 55, 58, 66, 70 y 77). Uno de estos factores de transcripción dependiente de *cry1*, MYB34/ATR1 (Tabla II, 58) estaría implicado en la biosíntesis de triptofano en células del hipocótilo (Bender y Fink 1998). Dado que las auxinas se sintetizan principalmente a partir de triptofano, podría pensarse luego que la falta de regulación de este factor de transcripción alteraría la síntesis de auxinas. Se afectaría así la expresión de genes *AUX/IAA* (Figura 31b) y en consecuencia se promovería el crecimiento del hipocótilo de mutantes *cry1*. Trabajos previos (Kranz *et al.* 1998) han mostrado que *ATR1* es inducido por auxinas, GAs y ABA (pero no por etileno o citocininas), con lo que un efecto de la mutación *cry1* sobre algunos de estos reguladores del crecimiento podría explicar las diferencias a nivel regulatorio encontradas en estos ensayos. Otro grupo de factores de transcripción tipo MYB, cuya expresión fue dependiente de *cry1*, está integrado por AtMYB28 (Tabla II, 77) y AtMYB47 (Tabla II, 66). Si bien estos dos factores de transcripción están estrechamente relacionados entre sí y al factor MYB34/ATR1, correspondiente al "subgrupo 12" de proteínas MYB (Kranz *et al.* 1998, Stracke *et al.* 2001), éstos son diferencialmente regulados por *cry1*. Mientras que los niveles de transcritos AtMYB34 (Tabla II, 58) y AtMYB47 fueron 2,2 y 2,0 veces mayores, respectivamente, en mutantes *cry1* comparados con plántulas silvestres, el de AtMYB28 fue 3,1 veces menor bajo idénticas condiciones experimentales. El hecho que de un amplio complejo de factores de transcripción relacionados entre sí, sólo cuatro factores participen en la regulación temprana del crecimiento del hipocótilo mediado por luz, puede ser evidencia de que estas moléculas tienen un papel particularmente importante en el mecanismo por el cual el receptor *cry1* ajusta



el programa de desarrollo en oscuridad (escotomorfogénesis) a uno fotomorfogénico. Cabe destacar que en experimentos en los cuales se analizó específicamente la cinética de expresión de genes que codifican factores de transcripción, se vio que de un total de 269 genes tipo MYB, sólo un pequeño número de ellos (15 genes) fue regulado tempranamente por LA (1 h de exposición, Jiao *et al.* 2003).

El factor AtMYB66/WEREWOLF (**Tabla II**, 55), no relacionado a los factores descritos anteriormente, se sobreexpresó en mutantes *cry1*. Se ha demostrado que este factor de transcripción, interviene en el proceso de diferenciación de células epidérmicas de la raíz y puede tener un papel en la diferenciación de estas células en el tallo (Lee y Schiefelbein 1999). Sin embargo, no se ha establecido hasta el momento ninguna relación entre éste y la fotomorfogénesis, por lo que sería interesante en futuros experimentos analizar su rol en el desarrollo dependiente de *cry1*, mediante el uso de mutantes *wer-1* (WEREWOLF 1).

De forma similar a lo observado para factores de transcripción tipo MYB, de los 22 factores tipo NAM/NAC/CUC2 representados en el microarreglo, sólo tres se expresaron diferencialmente luego de 45 min de exposición a LA. Mientras que los niveles de los factores At2g24430 (**Tabla II**, 50) y At2g46770 (**Tabla II**, 60) fueron mayores en plántulas del mutante *cry1*, los de At4g27410 (**Tabla II**, 73) fueron superiores en plántulas silvestres. Por otra parte, 12 de los 16 miembros de la familia de proteínas de unión al DNA, SPB (Squamosa-Promoter-Binding) estuvieron representadas también en el microarreglo. Los transcritos At2g47070 (**Tabla II**, 81: 6,1 veces) y At1g02065 (**Tabla II**, 80: 3,7 veces), se sobreexpresaron en plántulas silvestres, mientras que los niveles de At2g33810 (**Tabla II**, 54: 3,0 veces) fueron superiores en mutantes *cry1*. Dos miembros de otra familia de factores de transcripción representados en el microarreglo, caracterizados por poseer dominios AP2, se expresaron diferencialmente en mutantes *cry1*. Mientras el nivel de uno de ellos (51) fue 3,8 veces mayor en mutantes *cry1*, el nivel del gen AF096370 (**Tabla II**, 75) fue superior en plántulas silvestres. Posiblemente la LA, a través del receptor *cry1*, modifique la participación de algunos pocos factores de transcripción en las etapas tempranas del proceso de etiolación, cobrando importancia luego otros factores que podrían regular la expresión de genes participantes en la respuesta de inhibición del crecimiento dependiente de *cry1*, como son los del metabolismo hormonal o aquellos involucrados en la extensibilidad de la pared celular.



Tabla II. Genes expresados diferencialmente en plántulas mutantes *cry1* crecidas 45 min en luz azul (LA, 450 nm, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los valores de expresión génica representan el cociente entre los valores de expresión de transcritos en mutantes *cry1* y plántulas silvestres (WT) crecidos 45 min en LA.

	Locus	Muestra	Descripción/similar a:	<i>cry1</i> / WT
Ciclo celular				
1	At1g15570	18207_at	U17890 cyclin 3c	2.7
2	At1g20930	16883_at	X97317 cdc2MsF (<i>Medicago sativa</i>)	2.6
3	At2g17620	12326_i_at	P24871 G2/mitotic-specific cyclin 4 (<i>S. cerevisiae</i>)	2.5
4	At5g65420	13788_at	AJ131636 D-type cyclin	2.4
5	At5g27570	18823_s_at	P26309 yeast cell division control protein 20 (<i>S. cerevisiae</i>)	2.4
Hormonas				
Auxinas				
6	At1g15580	18181_s_at	U18407 IAA5	6.7
7	At4g14560	13289_s_at	AY133714 Auxin responsive protein IAA1	3.4
8	At4g13790	12593_s_at	S70188 small auxin up RNA	2.9
9	At2g23250	18184_at	AC002391 putative indole-3-acetate/glucosyl transferase	2.8
10	At4g13790	12608_i_at	AB000708 <i>Raphanus sativus</i> SAUR gene	2.2
11	At4g15490	12447_at	Z97339 indole-3-acetate beta-glucosyltransferase	2.0
12	At2g46690	13640_at	AF013294 auxin-induced protein	-2.6
13	At2g43820	14978_at	AC002333 indole-3-acetate beta-glucosyltransferase isolog	-3.0
Giberelinas				
14	At1g76490	20160_at	S80135 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase isoform HMGR1L	3.5
15	At4g25420	17299_s_at	X83379 gibberellin 20-oxidase	3.4
16	At1g78440	16292_at	AJ132435 GA 2-oxidase	2.4
17	At2g44800	19538_s_at	AC003672 putative gibberellin beta-hydroxylase	2.3
Pared celular				
18	At5g57560	16620_s_at	U43488 xyloglucan endotransglycosylase-related protein	7.2
19	At4g19800	19293_at	AL024486 chitinase-like protein	5.7
20	At2g32530	16873_i_at	AC004681 putative cellulose synthase	3.0
21	At4g38990	16828_at	AL035679 putative endo-1,4-beta-glucanase	2.3
22	At4g23990	20316_s_at	AC002343 cellulose synthase isolog	2.3
23	At1g05650	17265_at	T00669 polygalacturonase homolog	2.2
24	At2g32990	14606_at	T01108 probable cellulase	2.1
25	At2g36870	12598_at	X92975 xyloglucan endo-transglycosylase	2.0
26	At2g01630	14042_at	AC006069 putative beta-1,3-glucanase	-2.0
27	At2g01630	13211_s_at	M38240 basic chitinase	-2.0
28	At3g57260	13212_s_at	U01901 1,3-beta-D-glucan glucanohydrolase	-2.1
29	At2g43590	13153_r_at	X61488 chitinase <i>B.napus</i>	-2.2
30	At5g24090	19455_s_at	AB006057 acidic endochitinase	-2.3
31	At4g16260	17485_s_at	Z97340 strong similarity to beta-1,3-glucanase class I precursor	-2.6
32	At4g19810	20420_at	AL024486 putative chitinase	-2.8

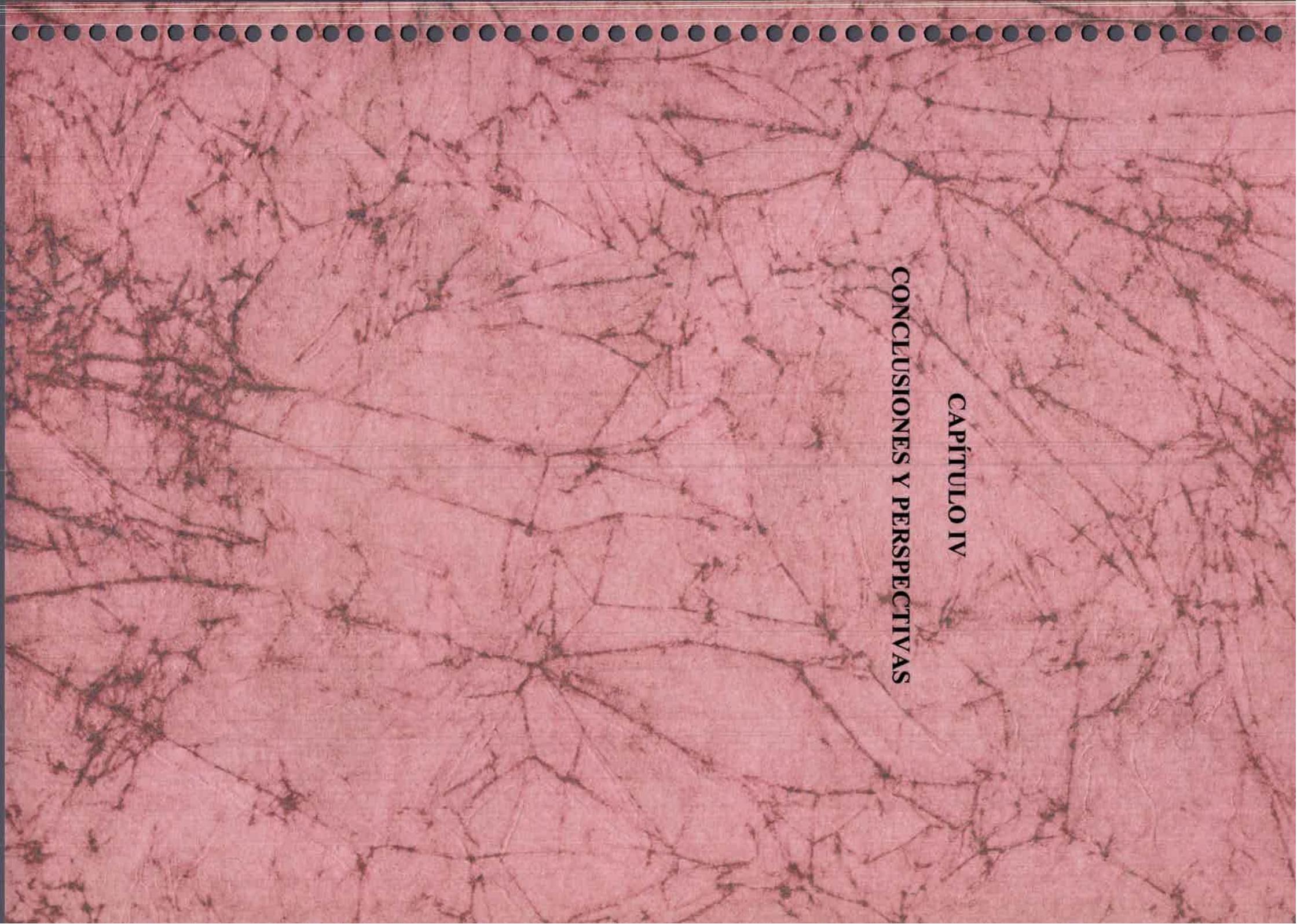


	Locus	Muestra	Descripción/similar a:	<i>cry1/</i> WT
33	N/A	19119_i_at	AF098631 putative cell wall-plasma membrane disconnecting CLCT protein (AIR1B)	-3.0
34	At4g12550	19118_s_at	AF098630 putative cell wall-plasma membrane disconnecting CLCT protein (AIR1A)	-3.5
35	At3g12500	12332_s_at	M38240 basic chitinase	-3.6
Quinasas				
36	At2g42630	15748_at	P80192 human mixed lineage kinase 1	3.9
37	At4g23130	20232_s_at	Receptor-like protein kinase, RLK3 ATH011674	2.7
38	At4g18130	14629_r_at	P42498 phytochrome E	2.4
39	At3g59750	19468_at	U93161 receptor lectin-kinase 3 AthlecRK3	-2.0
40	At4g18700	12394_at	P06782 SNF1, yeast carbon de-repressing protein kinase	-2.1
41	At1g09970	17464_at	Receptor-like kinase RLK 5 AC000132	-2.2
42	At5g25930	16357_at	Receptor-like kinase RLK 5 AL021684	-2.4
43	At2g41920	17203_at	U90439 Ser/Thr kinase isolog	-2.4
44	At1g11050	17323_at	U95973 Ser/Thr protein kinase isolog	-2.4
45	At2g40120	19070_s_at	Yeast protein kinase YAK1	-2.5
46	At1g12580	19057_at	X86964 AK19 protein kinase catalytic domain	-2.7
47	At5g35370	14122_at	T01181 S-receptor kinase homolog	-3.1
48	At1g09020	17666_at	AC000106 rattus AMP-activated protein kinase (SNF4)	-3.9
49	At3g08760	13246_at	D83257 receptor protein kinase	-6.2
Factores de transcripción				
50	At2g24430	12685_at	AC006403 putative NAM protein	4.9
51	At1g43160	19673_g_at	AC005687 RAP2.6	3.8
52	At3g16280	19570_at	AC001645 transcription factor (TINY) isolog	3.7
53	At3g46130	12709_f_at	MYB59 R2R3-MYB transcription factor	3.1
54	At2g33810	19896_s_at	U78721 squamosa-promoter binding protein 1	3.0
55	At5g14750	16295_at	AF034131 putative MYB DNA-binding domain repeat R3	2.9
56	At2g16680	17358_at	T00814 probable zinc-finger protein	2.3
57	At4g11080	13786_s_at	A35072 non-histone chromosomal protein NHP6A (<i>S. cerevisiae</i>)	2.3
58	At5g60890	18789_at	AF062876 putative transcription factor MYB34 (ATR1)	2.2
59	At4g00480	17796_s_at	D83511 Atmyc1	2.2
60	At2g46770	13333_at	T02678 no apical meristem protein NAM homolog	2.1
61	At3g22880	16846_s_at	A38214 DMC1 protein (<i>S. cerevisiae</i>)	2.1
62	At4g01740	17737_at	AF001308 putative CHP-rich zinc finger protein	2.1
63	At1g63650	16616_s_at	MYC146 AAB72192.1 bHLH protein	2.1
64	At1g43160	19672_at	AAC36019.1 RAP2.6	2.1
65	At4g39410	15885_at	AC004165 putative DNA-binding protein	2.1
66	At1g18710	12461_at	AF062885 putative transcription factor MYB47	2.0
67	At1g17020	17484_at	X79052 SRG1	-2.1
68	At1g27730	18216_at	X95573 salt-tolerance zinc finger protein	-2.1
69	At1g27730	18217_g_at	X95573 salt-tolerance zinc finger protein	-2.1
70	At1g71030	20362_at	Z68157 MYB-related transcription factor	-2.1
71	At2g30250	20382_s_at	D30038 Sweet potato mRNA for SPF1 protein	-2.1
72	At2g40950	18386_at	AC002409 similar to tgacg-specific DNA-binding protein	-2.3
73	At4g27410	17860_at	AF123310 NAC domain protein NAM gene	-2.3
74	At2g37650	20534_g_at	AC004684 SCARECROW-like protein	-2.3



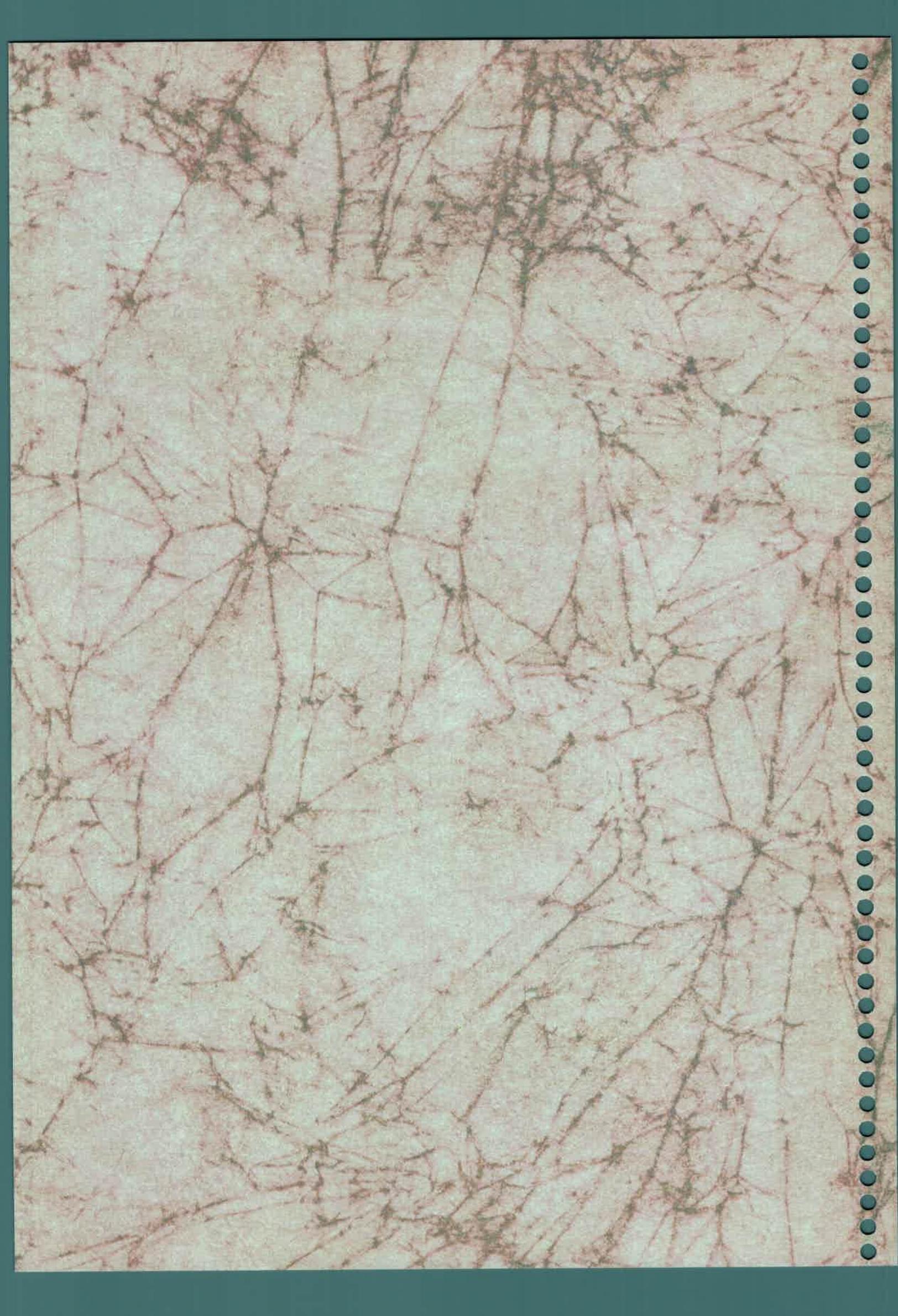
	Locus	Muestra	Descripción/similar a:	<i>cry1/</i> WT
75	At4g01500	15019_at	AF096370 AP2 domain containing protein RAP2.8	-2.4
76	At4g30100	12688_at	M76659 zinc finger protein (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.5
77	At5g61420	18742_f_at	AF175998 putative transcription factor MYB28	-3.1
78	At4g01250	19869_at	AF007269 SPF1 DNA-binding protein	-3.2
79	At2g38470	17303_s_at	T02498 probable DNA binding protein	-3.4
80	At1g02065	18042_at	AJ011642 mRNA for squamosa promoter-binding protein-like 8	-3.7
81	At2g47070	16690_g_at	AC004411 putative squamosa promoter-binding protein	-6.1

* Se excluyeron de la Tabla aquellos genes cuya función es desconocida o hipotética (Figura 27).



CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS



CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

IV.1. CONCLUSIONES

Con el objeto de evaluar la participación de las fitohormonas GAs, IAA y ABA como intermediarios en la cascada de transducción de señales que media entre la señal de luz azul percibida por *cry1* y la respuesta de inhibición de la elongación del hipocótilo en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, se realizó en el presente trabajo una combinación de ensayos de crecimiento del hipocótilo y cuantificaciones de los niveles de dichos reguladores del crecimiento mediante GC-MS-SIM. Además, se realizaron estudios moleculares mediante el uso de microarreglos de ADN, de la expresión diferencial de genes regulados por *cry1* que participan tempranamente en la respuesta de inhibición de la elongación del hipocótilo. A partir de los resultados obtenidos puede concluirse que:

- Las plántulas de *Arabidopsis* crecidas en oscuridad presentan niveles suficientes u "homeostáticos" de GAs que serían los responsables, al menos en parte, del crecimiento "elongado" del hipocótilo bajo esta condición lumínica.
- El receptor *cry1* media la respuesta de inhibición del crecimiento del hipocótilo inducida por LA, en parte, disminuyendo tempranamente la sensibilidad de los tejidos a las GAs activas.
- El más alto contenido endógeno de las GAs bioactivas (GA_4 y GA_1) en plántulas silvestres crecidas en LA y la mayor concentración de GA_{20} (precursor de GA_1) medida en mutantes *cry1* crecidos en idénticas condiciones lumínicas, sugieren que el receptor *cry1* regularía los niveles de GAs activando el paso de 3β -hidroxilación que convierte GAs inactivas en formas biológicamente activas.
- El incremento de los niveles de GA_8 (producto de inactivación de GA_1 por 2β -hidroxilación) en plántulas mutantes *cry1* expuestas a LA, y la falta de un efecto promotor adicional sobre el crecimiento del hipocótilo observado en plántulas silvestres crecidas en

distintas concentraciones de GA₄ y tratadas con Prohexadiona-Ca (inhibidor de la 2β-hidroxilación de GAs), sugieren que el receptor cry1 regularía los niveles de GAs activas disminuyendo la desactivación de GAs por 2β-hidroxilación. En este sentido, en los ensayos con microarreglos los mutantes *cry1* crecidos en LA mostraron los mayores niveles de expresión de una GA 2-oxidasa (enzimas responsables de la desactivación de GAs por 2β-hidroxilación).

➤ La respuesta inhibitoria del crecimiento del hipocótilo inducida por LA y mediada por el receptor cry1, sería independiente del nivel de IAA de los tejidos y del transporte de auxinas.

➤ La LA a través del receptor cry1 inhibe la elongación de hipocótilos de *Arabidopsis* sin afectar los niveles endógenos de ABA.

➤ De los 8297 transcriptos y controles representados en el microarreglo, aproximadamente 400 genes que codifican quinasas, factores de transcripción, reguladores del ciclo celular, enzimas del metabolismo de la pared celular y del metabolismo hormonal, y factores de respuesta a hormonas, participarían en la respuesta de inhibición del crecimiento mediada por cry1.

➤ La LA a través del receptor cry1 inhibe el crecimiento del hipocótilo regulando la expresión de genes relacionados al metabolismo de las GAs, respuesta a las auxinas y conjugación de estas hormonas. Cabe destacar que los niveles de expresión de genes involucrados en la síntesis de ABA (presentes en el microarreglo) no fueron afectados por la mutación *cry1* bajo LA.

IV.2. PERSPECTIVAS DE TRABAJO

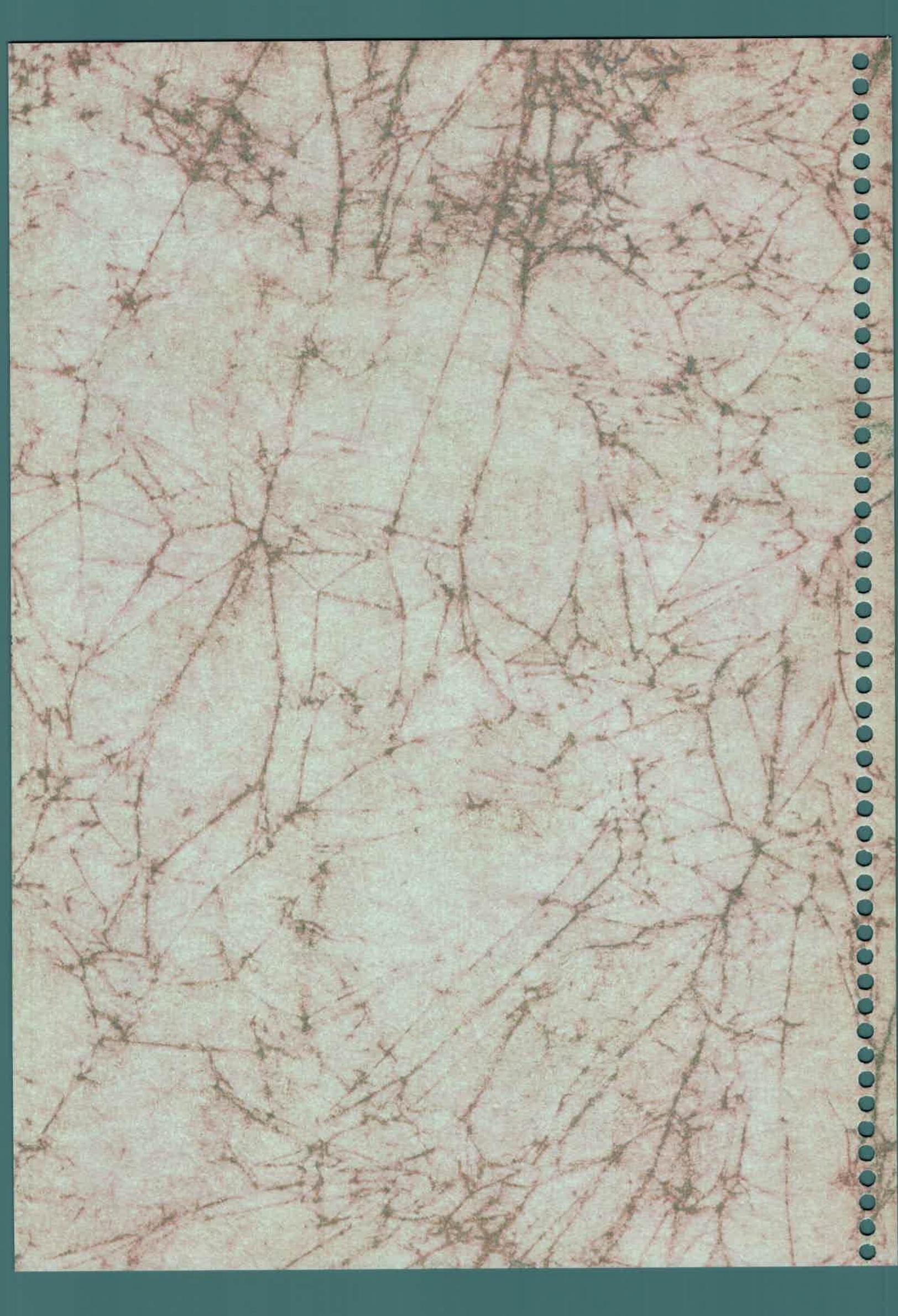
Poco se conoce en *Arabidopsis* acerca del papel de las fitohormonas en el fotocontrol del crecimiento del hipocótilo, y menos aún sobre la participación de éstas específicamente en la vía de transducción de señales de los fotorreceptores de LA. Teniendo en cuenta que los resultados del presente trabajo dan evidencias fisiológicas y/o moleculares de una interacción

entre las fitohormonas (específicamente GAs e IAA) y el crecimiento del hipocótilo regulado por el receptor de LA, *cry1*, sería interesante realizar en un futuro nuevos ensayos que permitan profundizar nuestro conocimiento sobre el posible rol de otros reguladores en el fotocontrol del crecimiento mediado por LA. En este sentido, los ensayos utilizando microarreglos de ADN mostraron que de las 12 quinasas tipo SNF1 representadas, sólo la subunidad catalítica de una quinasa de levadura SNF1 que sensa azúcares, así como también de la subunidad regulatoria SNF4 requerida para la activación de SNF1, presentaron niveles bajos de expresión en mutantes *cry1* crecidos en LA. Las quinasas de plantas tipo SNF1 fosforilan proteínas que contienen motivos SAMS. La HMG-COA reductasa, enzima clave involucrada en los primeros pasos de la ruta del ácido mevalónico que produce esteroides e isoprenoides, es una de estas proteínas SAMS cuya expresión es regulada por luz. La fosforilación inducida por SNF1 inhibe la acción de la proteína HMG-COA reductasa, con lo cual esta regulación podría afectar el fotocontrol del crecimiento del tallo al variar el metabolismo de hormonas tales como los Brasinoesteroides (BR). Por su parte, los resultados obtenidos en esta tesis en los ensayos de crecimiento con la aplicación de Brasinólido (BL, BR bioactivo) sugirieron un posible efecto de *cry1* sobre los niveles de estas fitohormonas. Por lo que una futura línea de trabajo podría ser el estudio del efecto de *cry1* sobre los niveles de BR y, dada la interacción conocida entre éstos y el etileno, analizar además la participación de este regulador en el control del crecimiento del hipocótilo mediado por LA.





BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad M y Cashmore A.R. 1993. *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with the characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366: 162-166.
- Ahmad M y Cashmore A.R. 1997. The blue-light receptor cryptochrome 1 shows functional dependence on phytochrome A or phytochrome B in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 11: 421-427.
- Ahmad M, Grancher N, Heil M, Black R.C, Giovani B, Galland P y Lardemer D. 2002. Action spectrum for cryptochrome-dependent hypocotyls growth inhibition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129: 774-785.
- Ahmad M, Jarillo J.A y Cashmore A.R. 1998b. Chimeric proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell* 10: 197-207.
- Ahmad M, Jarillo J.A, Smirnova O y Cashmore A.R. 1998a. The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A in vitro. *Molecular Cell* 1: 939-948.
- Ahmad M, Lin C y Cashmore A.R. 1995. Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyls elongation. *Plant Journal* 8: 653-658.
- Ait-Ali T, Frances S, Weller J.L, Reid J.B, Kendrick R.E y Kamiya Y. 1999. Regulation of gibberellin 20-oxidase and gibberellin 3-hydroxylase transcript accumulation during de-etiolation of pea seedlings. *Plant Physiology* 121: 783-791.
- Anderson M.B, Folta K.M, Warpeha K.M, Gibbons J, Gao J y Kaufman L.S. 1999. Blue light directed destabilization of the pea *Lhcb1*⁴ transcript depends on sequences within the 5' untranslated region. *Plant Cell* 11: 1579-1590.
- Asami T, Min Y.K, Nagata N, Yamagishi K, Takatsuto S, Fujioka S, Murofushi N, Yamaguchi I y Yoshida S. 2000. Characterisation of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiology* 123: 93-99.
- Atzorn R, Crozier A, Wheeler C y Sandberg G. 1988. Production of gibberellins and indole 3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta* 175: 532-538.
- Bak S, Tax F.E, Feldmann K.A, Galbraith D.W y Feyereisen R. 2001. CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 13: 101-111.



- Ballario P, Talora C, Galli D, Linden H, Macino G. 1998. Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins. *Molecular Microbiology* 29:719-729.
- Baluska F, Wojtaszek P, Volkmann D y Barlow P. 2003. The architecture of polarized cell growth: the unique status of elongating plant cells. *Bioessays* 25: 569-576.
- Bandursky R.S, Cohen J.D, Slovin J.P y Reinecke D.M. 1995. Auxin biosynthesis and metabolism. En: *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Davies P.J (Ed.). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands: 39-65.
- Baraldi R, Bertazza G, Bogino J, Luna M.V y Bottini R. 1995. The effect of light quality on *Prunus cerasus* II. Changes in hormone levels in plants grown under different light conditions. *Photochemistry and Photobiology* 62: 800-803.
- Baraldi R, Cristoferi G y Bottini R. 1990. Effect of light quality on growth of *Prunus avium*: role of gibberellins. XXXIII International Horticultural Congress 4152. Italy.
- Barker-Bridgers M, Ribnicky D.M, Cohen J.D y Jones A.M. 1998. Red-light-regulated growth. Changes in the abundance of indoleacetic acid in the maize (*Zea mays* L.) mesocotyl. *Planta* 204: 207-211.
- Bartel B. 1997. Auxin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 51-66.
- Bartels P.G y Watson C.W. 1978. Inhibition of carotenoid synthesis by fluridone and norflurazon. *Weed Science* 26: 198-203.
- Bastián F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R y Bottini R. 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ and A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropediceae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation* 24: 7-11.
- Beaudoin N, Serizet C, Gosti F y Gaudat J. 2000. Interaction between abscisic acid and ethylene signalling cascades. *Plant Cell* 12: 1103-1115.
- Behringer F.J y Davies P.J. 1992. Indole-3-acetic acid levels after phytochrome-mediated changes in the stem elongation rate of dark- and light-grown *Pisum* seedlings. *Planta* 188: 85-92.
- Bender J y Fink G.R. 1998. A Myb homologue, ATR1, activates tryptophan gene expression in *Arabidopsis*. *Proceeding National Academy of Science. USA* 95: 5655-5660.
- Bennett M.J, Marchant A, Green H.G, May S.T, Ward S.P, Millner P.A, Walker A.R, Schultz B y Feldman K.A. 1996. *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273: 948-950.

- Bialek L, Michalczyk L y Cohen J.D. 1992. Auxin biosynthesis during seed germination in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* 100: 509-517.
- Bishop G.J, Nomura T, Yokota T, Harrison K, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Jones J.D.G y Kamiya Y. 1999. The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proceeding National Academic of Science. USA* 96: 1761-1766.
- Bottini G, Bottini R, Koshioka M, Pharis R.D y Coombe B. 1987. Metabolism of [³H]gibberellin A₅ by immature seeds of apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Plant Physiology* 83: 137-142.
- Bottini R, Cassán F y Piccoli P. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 497-503.
- Bottini R, Fulchieri M, Pearce D y Pharis R.P. 1989. Identification of gibberellins A₁, A₃, and iso-A₃ in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant physiology* 90: 45-47.
- Bouquin T, Meier C, Foster R, Nielsen M.E y Mundy J. 2001. Control of specific gene expression by gibberellin and brassinosteroid. *Plant Physiology* 127: 450-458.
- Bowler C, Yamagata H, Neuhaus G y Chua N.H. 1994. Phytochrome signal transduction pathways are regulated by reciprocal control mechanisms. *Genes and Development* 8: 2188-2202.
- Briggs W.R, Beck C.F, Cashmore A.R, Christie J.M, Hughes J, Jarillo J.A, Kagawa T, Kanegae H, Liscum E, Nagatani A, Okada K, Salomon M, Rudiger W, Sakai T, Takano M, Wada M y Watson J.C. 2001. The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* 13: 993-997.
- Briggs W.R y Christie J.M. 2002. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* 7: 204-210.
- Brosa C. 1999. Biological effects of brassinosteroids. *Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology* 34: 339-358.
- Brown R.G.S, Kawaide H, Yang Y-Y, Rademacher W y Kamiya Y. 1997. Daminozide and prohexadione have similar modes of action as inhibitors of the late stages of gibberellin metabolism. *Physiologia Plantarum* 101: 309-313.
- Brudler R, Hitomi K, Daiyasu H, Toh H, Kucho K, Ishiura M, Kanehisa M, Roberts V.A, Todo T, Tainer J.A y Getzoff E.D. 2003. Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *Molecules and Cell* 11:59-67.

- Caderas D, Muster M, Vogler H, Mandel T, Rose J.K.C, McQueen-Manson S y Kuhlemeier C. 2000. Limited correlation between expansin gene expression and elongation growth rate. *Plant Physiology* 123: 1399-1414.
- Carrera E, Jackson S.D y Prat S. 1999. Feedback control and diurnal regulation of gibberellin 20-oxidase transcript levels in potato. *Plant Physiology* 119: 765-773.
- Casal J.J. 2000. Phytochromes, cryptochromes, phototropin: Photoreceptor interactions in plants. *Photochemistry and Photobiology* 71: 1-11.
- Casal J.J. 2002. Environmental cues affecting development. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 37-42.
- Cassán F, Bottini R, Schneider G, Piccoli P. 2001. *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA₂₀ and metabolize the resultant aglycones to GA₁ in seedlings of rice dwarf mutants. *Plant Physiology* 125: 2053-2058.
- Cashmore A.R, Jarillo J.A, Wu Y-J y Liu D. 1999. Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science* 284: 760-765.
- Chen K.H, Miller A.N, Patterson G.W y Cohen J.D. 1998. A rapid and simple procedure for purification of indole-3-acetic acid prior to GC-MS-SIM analysis. *Plant Physiology* 86: 822-825.
- Chernys J.T y Zeevaart J.A.D. 2000. Characterization of the 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. *Plant Physiology* 124: 343-353.
- Chevolleau S, Gasc N, Rollin P y Tulliez J. 1997. Enzymatic, chemical, and thermal breakdown of ³H-labeled glucobrassicin, the parent indole glucosinolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 4290-4296.
- Cho H.T y Kende H. 1997. Expansins and Internodal Growth of Deepwater Rice. *Plant Physiology* 113:1145-1151.
- Cho M.H y Spalding E.P. 1996. An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proceeding National Academy of Science. USA* 93: 8134-8138.
- Chory J, Chatterjee M, Cook R.K, Elich T, Frankhauser C, Li J, Nagpal P, Neff M, Pepper A, Poole D, Reed J y Vitart V. 1996. From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proceeding National Academic of Science. USA* 93: 12066-12071
- Chory J y Li J. 1997. Gibberellins, brassinosteroids and light-regulated development. *Plant Cell and Environment* 20: 801-806.

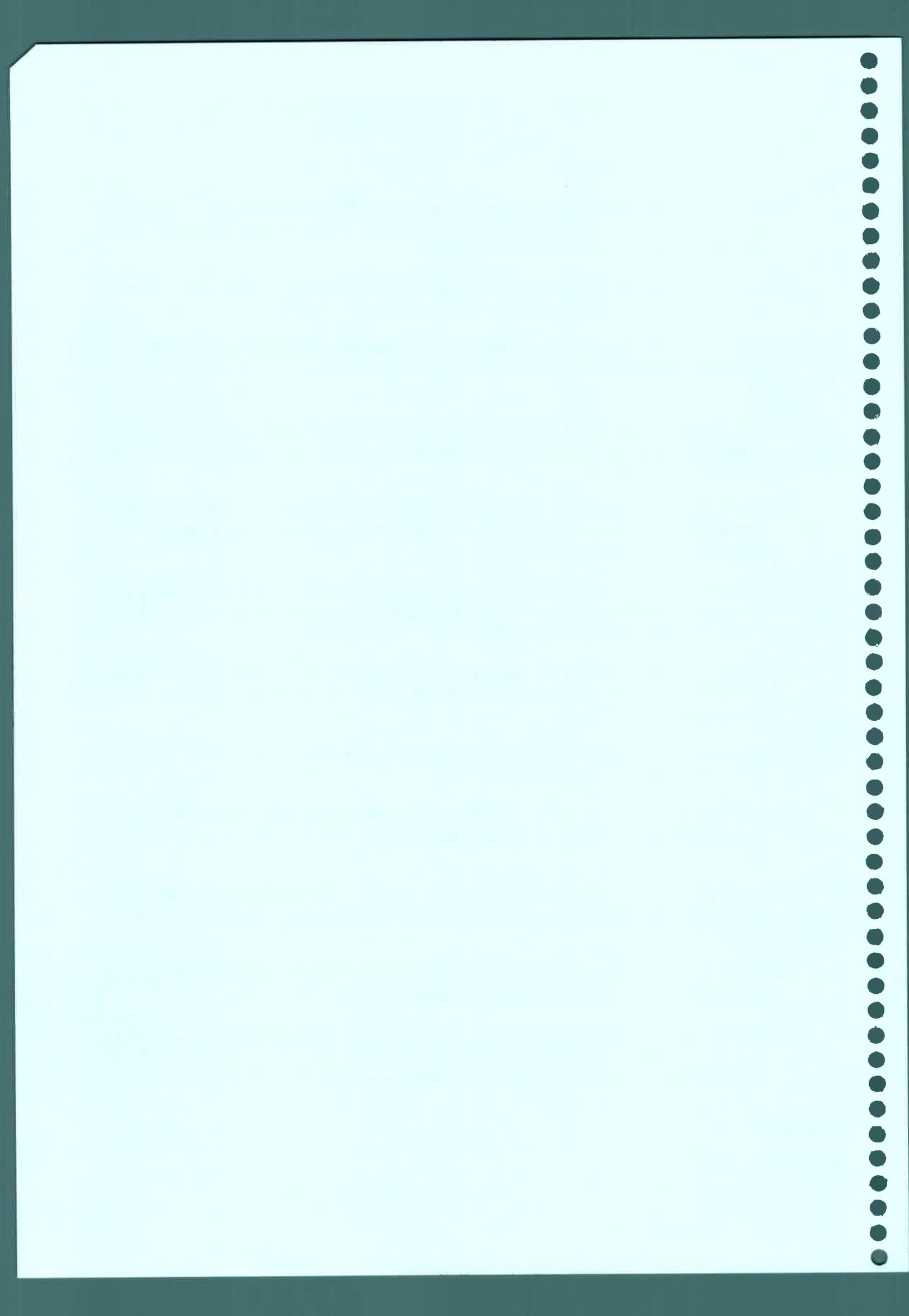
- Chory J, Nagpal P y Peto C.A. 1991. Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 3: 445-459.
- Christie J.M, Reymond P, Powell G.K, Bernasconi P, Raibekas A.A, Liscum E y Briggs W.R. 1998. *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* 282: 1698-1701.
- Christie J.M, Salomon M, Nozue K, Wada M y Briggs W.R. 1999. LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (*nph1*): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proceeding National Academy of Science, USA* 96: 779-783.
- Clouse S.D y Sasse J.M. 1998. Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 427-451.
- Cluis C.P, Mouchel C.F, Hardtke C.S. 2004. The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. *Plant Journal* 38:332-347.
- Clúa A, Bottini R, Brocchi G.N, Bogino J, Luna V y Montaldi E. 1996. Growth habit of *Lotus tenuis* shoots and the influence of photosynthetic photon flux density, sucrose and endogenous levels of gibberellins A₁ and A₃. *Physiologia Plantarum* 98: 381-388.
- Cohen J.D. 1984 Convenient apparatus for the generation of small amounts of diazomethane. *Journal of Chromatography* 303: 193-196.
- Cohen J.D, Slovin J.P y Hendrickson A.M. 2003. Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends in Plant Science* 8: 197-199.
- Colon-Carmona A, Chen D.L, Yeh K.C y Abel S. 2000. Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome *in vitro*. *Plant Physiology* 124: 1728-1738.
- Cosgrove D.J. 1988. Mechanism of rapid suppression of cell expansion in cucumber hypocotyls after blue-light irradiation. *Planta* 176: 109-116.
- Cosgrove D.J. 1994. Photomodulation of growth. En R.E Kendrick, G.H.M Kronenberg (Eds.) *Photomorphogenesis in Plants*, 2da Edición. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 631-658.
- Cosgrove D.J. 1997. Relaxation in a high stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* 9: 1031-1041.
- Cosgrove D.J. 1999. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 391-417.

- Cosgrove D.J. 2000. New genes and new biological roles for expansins. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 73-78.
- Cowling R.J, Kamiya Y, Seto H y Harberd N.P. 1998. Gibberellin dose-response regulation of *GA4* gene transcript levels in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 117: 1195-1203.
- Creelman R.A y Mullet J.E. 1997a. Oligosaccharins, Brassinolides and Jasmonates: Nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell* 9: 1211-1223.
- Creelman R.A y Mullet J.E. 1997b. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 355-381.
- Creelman R.A y Zeevaart J.A.D. 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 439-473.
- Crozier A, Kamiya Y, Bishop G y Yokota T. 2000. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland: 850-895.
- Cutler S.R, Ehrhardt D.W, Griffitts J.S y Somerville C.R. 2000. Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proceeding National Academy of Science. USA* 97: 3718-3723.
- Cutler A.J y Krochko J.E. 1999. Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science* 4: 472-478.
- Czernic P, Visser B, Sun W, Savoure A, Deslandes L, Marco Y, Van Montagu M y Verbruggen N. 1999. Characterization of a *Arabidopsis thaliana* receptor-like protein kinase gene activated by oxidative stress and pathogen attack. *Plant Journal* 18: 321-327.
- Dale S, Arro M, Becerra B, Morrice N, Boronoat A, Hardie D.G y Ferrer A. 1995. Bacterial expression of the catalytic domain of (isoform HMGR1) from *Arabidopsis thaliana*, and its inactivation by phosphorylation at Ser577 by *Brassica oleraceae* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *European Journal of Biochemistry* 233: 506-513.
- Davies P.J. 1995. Plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. En P.J. Davies (Ed.). *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 1-12.
- Debeaujon I y Koornneef M. 2000. Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiology* 122: 415-424.
- Deshaies R.J. 1999. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15: 435-467.



- Desnos T, Orbovic V, Bellini C, Kronenberger J, Caboche M, Traas J y Hofte H. 1996. Procuste1 mutants identify two distinct genetic pathways controlling hypocotyl cell elongation, respectively in dark- and light-grown *Arabidopsis* seedlings. *Development* 122: 683-693.
- Devlin P.F y Kay S.A. 2000. Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* 12: 2499-2510.
- Devlin R.M, Kisiel M.J y Kostusiak A.S. 1980. Enhancement of gibberellic acid sensitivity in corn (*Zea mays*) by fluridone and R-40244. *Weed Science* 28: 11-12.
- Elliott R.C, Smith J.L, Lester D.R y Reid J.B. 2001. Feedforward regulation of gibberellin deactivation in pea. *Plant Growth Regulation* 20: 87-94.
- Evans L.T, King R.W, Mander L.N, Pharis R.P y Duncan K.A. 1994. The differential-effects of C-16,17-dihydro gibberellins and related-compounds on stem elongation and flowering in *Lolium temulentum*. *Planta* 193: 107-114.
- Fairchild C.D, Schumaker M.A y Quail P.H. 2000. HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes and Development* 14: 2377-2391.
- Finkelstein R.R, Gampala S.S y Rock C.D. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14: S15-S45.
- Finkelstein R.R y Rock C.D. 2002. Abscisic acid biosynthesis and response. En: CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pgs. 1-52. <http://www.aspb.org/publications/Arabidopsis>.
- Fluridone (Sonar®). March 2000. Washington State Department of Health. Website: www.doh.wa.gov/ehp/ts/fs.htm.
- Folta K.M, Pontin M.A, Karlin-Neumann G, Bottini R y Spalding E.P. 2003. Genomic and physiological studies of early cryptochrome 1 action demonstrate roles for auxin and gibberellin in the control of hypocotyl growth by blue light. *Plant Journal* 36: 203-215.
- Folta K.M Y Spalding E.P. 2001a. Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution hypocotyl growth analysis. *Plant Journal* 26: 471-478.
- Folta K.M y Spalding E.P. 2001b. Opposing roles for phyA and phyB in cryptochrome-mediated suppression of hypocotyls elongation. *Plant Journal* 28: 333-340.
- Foster K.R y Morgan P.W. 1995. Genetic regulation of development in *Sorghum bicolor*. IX. The *ma₃^R* allele disrupts diurnal control of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology* 108: 337-343.

- Frachisse J.M, Colcombet J, Guern J y Barbier-Brygoo H. 2000. Characterization of a nitrate-permeable channel able to mediate sustained anion efflux in hypocotyl cells from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 21: 361-371.
- Frechilla S, Talbott L.D, Bogomolni R.A y Zeiger E. 2000. Reversal of blue light-stimulated stomatal opening by green light. *Plant Cell Physiology* 41: 171-176.
- Frechilla S, Zhu J, Talbott L.D y Zeiger E. 1999. Stomata from *npq1*, a zeaxanthin-less *Arabidopsis* mutant, lack a specific response to blue light. *Plant Cell Physiology* 40: 949-954.
- Fry S.C, Smith R.C, Renwick K.F, Martin D.J, Hodge S.K y Matthews K.J. 1992. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochemistry Journal* 15:821-828.
- Fujioka S, Yamane H, Spary C.R, Phinney B.O, Gaskin P, MacMillan J y Takahashi N. 1990. Gibberellin A₁ is biosynthesized from gibberellin A₂₀ via gibberellin A₅ in shoot of *Zea mays* L. *Plant Physiology* 94: 127-131.
- Gallagher S, Short T.W, Pratt L.H, Ray P.M y Briggs W.R. 1988. Light-induced changes in two proteins found associated with plasma membrane fractions from pea stem sections. *Proceeding National Academy of Science. USA* 85: 8003-8007.
- Gälweiler L, Guan L, Müller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A y Palme K. 1998. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282: 2226-2230.
- García-Martínez J.L y Gil J. 2002. Light regulation of gibberellin biosynthesis and mode of action. *Plant Growth Regulation* 20: 354-368.
- Gaskin P y MacMillan J. 1991. GC-MS of the gibberellins and related compounds: Methodology and a library of spectra. University of Bristol (Cantock' s Enterprises), Bristol.
- Gendreau E, Hofte H, Grandjean O, Brown S y Traas J. 1998. Phytochrome controls the number of endoreduplication cycles in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyl. *Plant Journal* 13: 221-230.
- Gendreau E, Traas J, Desnos T, Grandjean O, Caboche M y Höfte H. 1997. Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 114: 295-305.
- Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A y Jürgens G. 2003. The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *The Cell* 112: 219-230.



- Geldner N, Friml J, Stierhof Y-D, Jürgens G y Palme K. 2001. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413: 425-428.
- Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y y McCourt P. 2000. Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 1117-2000.
- Gil J y García-Martínez J.L. 2000. Light regulation of gibberellin A₁ content and expression of genes coding for GA 20-oxidase and GA 3 beta-hydroxylase in etiolated pea seedlings. *Physiologia Plantarum* 180: 223-229.
- Gilmour S.J, Zeevaart J.A.D, Schwenen L y Graebe J.E. 1986. Gibberellin metabolism in cell-free extracts from spinach leaves in relation to photoperiod. *Plant Physiology* 82: 190-195.
- Goda H, Sawa S, Asami T, Fujioka S, Shimada Y y Yoshida S. 2004. Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134: 1555-1573.
- Goda H, Shimada Y, Asami T, Fujioka S y Yoshida S. 2002. Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 130: 1319-1334.
- Gómez-Cadenas A, Zentella R, Walker-Simmons M.K y Ho T-H.D. 2001. Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell* 13: 667-679.
- Granier C y Tardieu F. 1998. Spatial and temporal analyses of expression and cell cycle in sunflower leaves. *Plant Physiology* 116: 991-1001.
- Green P.B. 1980. Organogenesis-a biophysical view. *Annual Review of Plant Physiology* 31: 51-81.
- Gressel J. 1977. Blue light photoreception. *Photochemistry and Photobiology* 30: 749-754.
- Griggs D.L, Hedden P, Temple-Smith K.E y Rademacher W. 1991. Inhibition of gibberellin 2β-hydroxylases by acylcyclohexanedione derivatives. *Phytochemistry* 30: 2513-2517.
- Grossmann K y Hansen H. 2001. Ethylene-triggered abscisic acid: a principle in plant growth regulation. *Physiologia Plantarum* 113: 9-14.
- Guo H.W, Mockler T.C, Duong H y Lin C.T. 1999. The *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism. *Plant Journal* 19: 279-287.
- Guo H.W, Mockler T.C, Duong H y Lin C.T. 2001. SUB1, an *Arabidopsis* Ca²⁺-binding protein involved in cryptochrome and phytochrome coaction. *Science* 291: 487-490.



- Gutiérrez-Manero F, Ramos-Solano B, Probanza A, Mehouchi J, Tadeo F.R y Talon M. 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum* 111: 206-211.
- Gyula P, Schäfer E y Nagy F. 2003. Light perception and signalling in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 446-452.
- Hayashi T, Wong Y.S y MacLachlan G. 1984. Pea xyloglucan and cellulose. 2. Hydrolysis by pea endo-1,4- β -glucanases. *Plant Physiology* 75: 605-610.
- Hedden P. 1999. Recent advances in gibberellin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 50: 553-563.
- Hedden P y Phillips A.L. 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science* 5: 523-530.
- Hedden P, Phillips A.L, Rojas M.C, Carrera E y Tudzynski B. 2002. Gibberellin biosynthesis in plants and Fungi. A case of convergent evolution?. *Plant Growth Regulation* 20: 319-331.
- Hill R.D, Liu J.H, Durnin D, Lamb N, Shaw A y Abrams S.R. 1995. Abscisic acid structure-activity relationships in barley aleurone layers and protoplasts. *Plant Physiology* 108: 573-579.
- Hoffman P.D, Batschauer A y Hays J.B. 1996. *PHH1*, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases. *Molecular and General Genetics* 253: 259-265.
- Hoffmann-Benning S y Kende H. 1992. On the role of abscisic acid and the gibberellin on the regulation of growth in rice. *Plant Physiology* 99: 1156-1161.
- Hsieh H-L, Okamoto H, Wang M, Ang L.H, Matsui M, Goodman H y Deng X.W. 2000. FIN219, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of *Arabidopsis* development. *Genes and Development* 14: 1958-1970.
- Huala E, Oeller P.W, Liscum E, Han I.S, Larsen E y Briggs W.R. 1997. *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278: 2120-2123.
- Hull A.K, Vij R y Celenza J.L. 2000. *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proceeding National Academy of Science. USA* 97: 2379-2384.
- Iino M, Ogawa T y Zeiger E. 1985. Kinetic properties of the blue-light response of stomata. *Proceeding National Academy of Science. USA* 82: 8019-8023.



- Imaizumi T, Kadota A, Hasebe M y Wada M. 2002. Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 14: 373-386.
- Inada S, Ohgishi M, Mayama T, Okada K y Sakai T. 2004. RPT2 is a signal transducer involved in phototropic response and stomatal opening by association with phototropin 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: 887-896.
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K y Shinozaki K. 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 27: 325-333.
- Iuchi S, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K y Shinozaki K. 2000. A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiology* 123: 553-562.
- Jackson S.D. 1999. Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiology* 119: 1-8.
- Jackson S.D, Heyer A, Dietze J y Prat S. 1996. Phytochrome B mediates the photoperiodic control of tuber formation in potato. *Plant Journal* 9: 159-166.
- Jackson S.D, James P.E, Carrera E, Prat S y Thomas B. 2000. Regulation of transcript levels of a potato gibberellin 20-oxidase gene by light and phytochrome B. *Plant Physiology* 124: 423-430.
- Jackson S.D, James P.E, Prat S y Thomas B. 1998. Phytochrome B affects the levels of a graft-transmissible signal involved in tuberization. *Plant Physiology* 117: 29-32.
- Jansen R, Rood S, Dormar J y McGill W. 1992. *Azospirillum brasilense* produces gibberellins in pure culture and chemically-medium and in co-culture on straw. *Soil Biology and Biochemistry* 24: 1061-1064.
- Jarillo J.A, Capel J, Tang R, Yang H.Q, Alonso J.M, Ecker J.R y Cashmore A.R. 2001. An *Arabidopsis* circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature* 410: 487-490.
- Jensen P.J, Hangarter R.P y Estelle M. 1998. Auxin transport is required for hypocotyl elongation in light-grown but not dark-grown *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 116: 455-462.
- Jiao Y, Yang H, Ma L, Sun N, Yu H, Liu T, Gao Y, Gu H, Chen Z, Wada M, Gerstein M, Zhao H, Qu L.J y Deng X.W. 2003. A genome-wide analysis of blue-light regulation of *Arabidopsis* transcription factor gene expression during seedling development. *Plant Physiology* 133:1480-1493.

- Johson-Flanagan A.M, Huiwen Z, Thiagarajah M.R y Saini H.S. 1991. Role of abscisic acid in the induction of freezing tolerance in *Brassica napus* suspension-cultured cells. *Plant Physiology* 95: 1044-1048.
- Jones A.M. 1992. What remains of the Cholodney-Went theory? Asymmetric redistribution of auxin need only occur over the distance of one cell width. *Plant Cell and Environment* 15: 775-776.
- Jones A.M. 1998. Auxin transport: down and out and up again. *Science* 282: 2201-2202.
- Jones A.M, Cochram D.S, Lamerson P.M, Evans M.L y Cohen J.D. 1991. Red light-regulated growth. I. Change in the abundance of indoleacetic acid and a 22-kilodalton auxin-binding protein in the maize mesocotyl. *Plant Physiology* 97: 352-358.
- Junttila O, King R.W, Poole A, Kretschmer G, Pharis R.P y Evans L.T. 1997. Regulation in *Lolium temulentum* of the metabolism of gibberellin A₂₀ and gibberellin A₁ by 16,17-dihydro GA₅ and by the growth retardant, LAB 198 999. *Australian Journal of Plant Physiology* 24: 359-369.
- Kamiya Y y García-Martínez J.L. 1999. Regulation of gibberellin biosynthesis by light. *Current Opinion of Plant Biology* 2: 398-403.
- Kanegae T y Wada M. 1998. Isolation and characterization of homologues of plant blue-light photoreceptor (cryptochrome) genes from the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Molecular General Genetics* 259: 345-353.
- Kang J.G, Yun J, Kim D.H, Chung K.S, Fujioka S, Kim J.I, Dae H.W, Yoshida S, Takatsuto S, Song P.S y Park C.M. 2001. Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark-induced small G protein in etiolated seedling growth. *The Cell* 105: 625-636.
- Kende H y Zeevart A.D. 1997. The five "classical" plant hormones. *Plant Cell* 9: 1197-1210.
- Kerstens S y Verbelen J-P. 2003. Cellulose orientation at the surface of the *Arabidopsis* seedlings. Implications for the biomechanics in plant development. *Journal of Structural Biology* 144: 262-270.
- King R.W, Blundell C, Evans L.T, Mander L.N y Wood J.T. 1997. Modified gibberellins retard growth of cool-season turf-grasses. *Crop Science* 37: 1878-1883.
- Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M y Shimazaki K. 2001. phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414: 656- 660.
- Kircher S, Gil P, Kozma-Bognár L, Fejes E, Speth V, Husselstein-Muller T, Bauer D, Ádám É, Schäfer E and 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. *Plant Cell* 14: 1541-1555.



- Kleinow T, Bhalerao R, Breuer F, Umeda M, Salchert K y Koncz C. 2000. Functional identification of an *Arabidopsis* *snf4* ortholog by screening for heterologous multicopy suppressors of *snf4* deficiency in yeast. *Plant Journal* 23: 115-122.
- Kobayashi M, Gaskin P, Spray C.R, Suzuki Y, Phinney B.O y MacMillan J. 1993. Metabolism and biological-activity of gibberellin A₄ in vegetative shoots of *Zea mays*, *Oryza sativa*, and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 102: 379-386.
- Kraepiel Y, Agnès C, Thiery L, Maldiney R, Miginiac E y Delarue M. 2001. The growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) hypocotyls in the light and in darkness differentially involves auxin. *Plant Science* 161: 1067-1074.
- Kraepiel Y y Miginiac Y. 1997. Photomorphogenesis and phytohormones. *Plant Cell and Environment* 20: 807-812.
- Kraepiel Y, Rousselin P, Sotta B, Kerhoas L, Einhorn J, Caboche M y Miginiac E. 1994. Analysis of phytochrome- and ABA-deficient mutants suggests that ABA degradation is controlled by light in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Journal* 6: 665-672.
- Kranz H.D, Denekamp M, Greco R, Jin H, Leyva A, Meissner R.C, Petroni K, Urzainqui A, Bevan M, Martin C, Smeekens S, Tonelli C, Paz-Ares J y Weisshaar B. 1998. Towards functional characterization of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16: 263-276.
- Kutschera U y Schopfer P. 1986. Effect of auxin and abscisic acid on cell wall extensibility in maize coleoptiles. *Planta* 167: 527-535.
- Laskowski M.J y Briggs W.R. 1989. Regulation of pea epicotyl elongation by blue light. Fluence-response relationships and growth distribution. *Plant Physiology* 89: 293-298.
- Learned R.M. 1996. Light suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 110: 645-655.
- Lee M.M y Schiefelbein J. 1999. WEREWOLF, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *The Cell* 99: 473-483.
- Lehmann H, Preiss A y Schmidl J. 1983. A novel abscisic acid metabolite from cell suspension cultures of *Nigella damascena*. *Phytochemistry* 22: 1277-1278.
- Li Y, Darley C.P, Ongaro V, Fleming A, Schipper O, Baldauf S.L y MacQueen-Mason S.J. 2002. Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. *Plant Physiology* 128: 854-864.
- Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris T.C y Chory J. 1996. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* 272: 398-401.



- Li J.X, Wang X.Q, Watson M.B y Assmann S.M. 2000. Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* 287: 300-303.
- Lichtenthaler H.K. 1999. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 47-65.
- Lin C. 2002a. Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* 14: S207-S225.
- Lin C. 2002b. Plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* 5: 337-342.
- Lin C, Ahmad M y Cashmore A.R. 1996a. Arabidopsis cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. *Plant Journal* 10: 893-902.
- Lin C, Ahmad M, Chan J y Cashmore A.R. 1996b. CRY2: A second member of the Arabidopsis cryptochrome gene family (Accession No.U43397) (PGR96-001). *Plant Physiology* 110: 1047.
- Lin C, Ahmad M, Gordon D y Cashmore A.R. 1995a. Expression of an Arabidopsis cryptochrome gene in transgenic tobacco results in hypersensitivity to blue, UV-A, and green light. *Proceeding National Academy of Science. USA* 92: 8423-8427.
- Lin C, Robertson D.E, Ahmad M, Raibekas A.A, Jorns M.S, Dutton P.L y Cashmore A.R. 1995b. Association of flavin adenine dinucleotide with the *Arabidopsis* blue light receptor CRY1. *Science* 269: 968-970.
- Lin C y Shalitin D. 2003. Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 54: 469-496.
- Lin C, Yang H, Guo H, Mockler T, Chen J y Cashmore A.R. 1998. Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proceeding National Academy of Science. USA* 95: 2686-2690.
- Liscum E y Briggs W.R. 1995. Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* 7: 473-485.
- Liu Y, Bergervoet J.H.W, Ric De Vos C.H, Hilhorst H.W.M, Kraak H.L, Karssen C.M y Bino R.J. 1994. Nuclear replication activities during inhibition of abscisic acid- and gibberellin-deficient tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. *Planta* 194: 368-373.
- Ljung K, Bhalerao R.P y Sandberg G. 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant Journal* 28: 465-474.



- Ljung K, Hull A.K, Kowalczyk M, Marchant A, Celenza J, Cohen J.D y Sandberg G. 2002. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 50: 309-332.
- Long J.C y Jenkins G.I. 1998. Involvement of plasma membrane redox activity and calcium homeostasis in the UV-B and UV-A/blue light induction of gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 2077-2086.
- Lovegrove A y Hooley R. 2000. Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends in Plant Science* 5: 102-110.
- Ludwing-Muller J, Sass S, Sutter E, Wodner M y Epstein E. 1993. Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* 13: 179-187.
- Lützelshwab M, Asard H, Ingold U y Hertel R. 1989. Heterogeneity of auxin-accumulating membrane vesicles from *Cucurbita* and *Zea*: a possible reflection of cell polarity. *Planta* 177: 304-311.
- Ma L, Li J, Qu L, Hager J, Chen Z, Zhao, H y Deng X.W. 2001. Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* 13: 2589-2607.
- McCann M.C y Roberts K. 1994. Changes in cell wall architecture during cell elongation. *Journal of Experimental Botany* 45: 1683-1691.
- MacMillan J. 2002. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *Plant Growth regulation* 20: 387-442.
- MacMillan J, Ward D.A, Phillips A.L, Sánchez-Beltrán M.J, Gaskin P, Lange T y Hedden P. 1997. Gibberellin biosynthesis from gibberellin A₁₂-aldehyde in endosperm and embryos of *Marah macrocarpus*. *Plant Physiology* 113: 1369-1377.
- MacMillan J, Pryce R.J, Eglington G y McCormick A. 1967. *Tetrahedron Letters* 2241.
- Malhotra K, Kim S-T, Batschauer A, Dawut L y Sancar A. 1995. Putative blue-light photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with a high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity. *Biochemistry* 34: 6892-6899.
- Mancinelli A.L. 1994. The physiology of phytochrome action. En *Photomorphogenesis in plants*. Kendrick R.E and Kronenberg G.H.M (Ed.). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands: 211-269.
- Mander L.N, Adamson G, Bhaskar V.K, Twitchin B, Camp D, King R.W y Evans L.T. 1998. Effects of 17-alkyl-16,17-dihydrogibberellin A₅ derivatives on growth y flowering in *Lolium temulentum*. *Phytochemistry* 49: 1509-1515.



- Martin D.N, Proebsting W.M, Parks T.D, Dougherty W.G, Lange T, Lewis MJ, Gaskin P y Hedden P. 1996. Feedback regulation of gibberellin biosynthesis and gene expression in *Pisum sativum* L. *Planta* 200: 159-166.
- Martínez-García J.F, García-Martínez J.L, Bou J y Prat S. 2002. The interaction of gibberellins and photoperiod in the control of potato tuberization. *Plant Growth Regulation* 20: 377-386.
- Martínez-García J.F, Huq E and Quail P.H. 2000. Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288: 859-863.
- Mas P, Devlin P.F, Panda S y Kay S.A. 2000. Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* 408: 207-211.
- Mathews S y Sharrock R.A. 1997. Phytochrome gene diversity. *Plant Cell and Environment* 20: 666-671.
- McQueen -Mason S, Durachko D.M y Cosgrove D.J. 1992. 2 Endogenous proteins that induce cell-wall extension in plants. *Plant Cell* 4: 1425-1433.
- McQueen -Mason S y Cosgrove D.J. 1994. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proceedings of the National Academy of Science. USA* 91: 6574-6578.
- Milborrow B.V. 2001. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52: 1145-1164.
- Milborrow B.V, Burden R.S y Taylor H.F. 1997. Xantoxal: a revision of the nomenclature of the ABA precursor xanthoxin. *Phytochemistry* 44: 977-978.
- Mitsunori S y Koshiba K. 2002. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 17: 41-48.
- Motchoulski A y Liscum E. 1999. *Arabidopsis* NPH3: a NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism. *Science* 286: 961-964.
- Muday G.K y DeLong A. 2001. Polar auxin transport: controlling where and how much. *Trends in Plant Science* 6: 535-542.
- Müller A, Hillebrand H y Weiler E.W. 1998. Indole-3-acetic acid is synthesized from L-tryptophan in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 206: 362-369.
- Mussing C, Fischer S y Altmann T. 2002. Brassinosteroid-regulated gene expression. *Plant Physiology* 129: 1241-1251.



- Nagatani A, Reed J.W y Chory J. 1993. Isolation and initial characterization of *Arabidopsis* mutants that are deficient in phytochrome A. *Plant Physiology* 102: 269-277.
- Nagy F y Schäfer. 2002. En: Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 53: 329-355.
- Nakayama I, Miyazawa T, Kobayashi M, Kamiya Y, Abe H y Sakurai A. 1991. Studies on the action of the plant growth regulators BX-112, DOCHC, and DOCHC-Et. En: N. Takahashi, B.O. Phinney and J. MacMillan (Eds.). *Gibberellins*. Springer-Verlag, New York, USA: 311-319.
- Napier R. 2004. Plant hormone binding sites. *Annals of Botany* 93:227-233.
- Nemhauser J y Chory J. 2002. Photomorphogenesis. En: *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists. <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- Nemhauser J.L y Chory J. 2004. BRing it on: new insights into the mechanism of brassinosteroid action. *Journal of Experimental Botany* 55: 265-270.
- Nicol F, His I, Jauneau A, Vernhettes S, Canut H y Hofte H. 1998. A plasma membrane-bound putative endo-1,4- β -D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* 17: 5563-5576.
- Niyogi K.K, Grossman A.R y Björkman O. 1998. *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10: 1121-1134.
- Noh B y Spalding E.P 1998. Anion channels and the stimulation of the anthocyanin accumulation by blue light in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology* 116: 503-509.
- Normanly J y Bartel B. 1999. Redundancy as a way of life –IAA metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 207-213.
- Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y y Yamaguchi S. 2003. Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* 15: 1591-1604.
- Okamoto A, Katsumi M, Nojiri H, Murofushi N y Okamoto H. 1995. The relationship between levels of endogenous gibberellins and the response of *Vigna* hypocotyl to exogenous indole-3-acetic acid. *Plant and Cell Physiology* 36: 165-171.
- Okamoto A y Okamoto H. 1995. 2 Proteins regulate the cell-wall extensibility and the yield threshold in glycerinated hollow cylinders of cowpea hypocotyl. *Plant Cell and Environment* 18: 827-830.



- Olszewski N, Sun T-p y Gubler F. 2002. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* S61-S80.
- O'Neill D.P y Ross J.J. 2002. Auxin regulation of the gibberellin pathway in pea. *Plant Physiology* 130: 1974-1982.
- O'Neill D.P, Ross J.J y Reid J.B .2000. Changes in gibberellin A₁ levels and response during de-etiolation of pea seedlings. *Plant Physiology* 124: 805-812.
- Östin A, Kowalezyk M, Bhalerao R.P y Sandberg G. 1998. Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 118: 285-296.
- Östin A, Llié N y Cohen J.D. 1999. An *in vitro* system from maize seedlings for tryptophan-independent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Plant Physiology* 119: 173-178.
- Ouyang J, Shao X y Li J. 2000. Indole-3-glicerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 24: 327-333.
- Parks B.M, Cho M.H y Spalding E.P. 1998. Two genetically separable phases of growth inhibition induced by blue light in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology* 118: 609-615.
- Parks B.M, Folta K.M y Spalding E.P. 2001. Photocontrol of stem growth. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 436-440.
- Parks B.M y Spalding E.P. 1999. Sequential and coordinated action of phytochrome A and B during *Arabidopsis* stem growth revealed by kinetic analysis. *Proceeding National Academy of Science*. USA 96: 14142-14146.
- Pearce D.W, Koshioka M y Pharis R.P. 1994. Chromatography of gibberellins. *Journal of Chromatography A* 658: 91-122.
- Perez-Flores L, Carrari F, Osuna-Fernandez R, Rodriguez M.V, Enciso S, Stanelloni R, Sánchez R.A, Bottini R, Iusem N.D y Benech-Arnold R.L. 2003. Expression analysis of a GA 20-oxidase in embryos from two sorghum lines with contrasting dormancy: possible participation of this gene in the hormonal control of germination. *Journal of Experimental Botany* 54:2071-2079.
- Perrotta G, Ninu L, Flamma F, Weller J.L, Kendrick R.E, Nebuloso E y Giuliano G. 2000. Tomato contains homologues of *Arabidopsis* cryptochromes 1 and 2. *Plant Molecular Biology* 42: 765-773.
- Pharis R.P y King R.W. 1985. Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Annual Review of Plant Physiology* 36: 517-568.



- Phillips A.L. 1998. Gibberellins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 36: 115-124.
- Phillips J, Artsaenko O, Fiedler U, Horstmann C, Mock H-P, Muntz K y Conrad U. 1997. Seed-specific immunomodulation of abscisic acid activity induces a developmental switch. *The EMBO Journal* 16: 4489-4496.
- Piccoli P y Bottini R. 1994a. Metabolism of 17,17- $^{2}\text{H}_2$ gibberellin A_{20} to 17,17- $^{2}\text{H}_2$ gibberellin A_1 by *Azospirillum lipoferum* cultures. *AgriScientia* XI: 13-15.
- Piccoli P y Bottini R. 1994b. Effects of C/N relationships, N content, pH, and time of culture on growth and gibberellin production of by *Azospirillum lipoferum* cultures. *Symbiosis* 17: 229-236.
- Piccoli P y Bottini R. 1996. Light enhancement of gibberellin production by *Azospirillum lipoferum* cultures. *Biocell* 20: 200-207.
- Piccoli P.N, Lucangeli C.D, Schneider G y Bottini R. 1997. Hydrolysis of [17,17- $^{2}\text{H}_2$]gibberellin A_{20} -glucoside and [17,17- $^{2}\text{H}_2$]gibberellin A_{20} -glucosyl ester by *Azospirillum lipoferum* cultured in a nitrogen-free biotin-based chemically-defined medium. *Plant Growth Regulation* 23: 179-182.
- Piccoli R, Masciarelli O y Bottini R. 1996. Metabolism of 17,17- $^{2}\text{H}_2$ gibberellin A_4 , A_9 , and A_{20} by *Azospirillum lipoferum* in chemically-defined culture medium. *Symbiosis* 21: 167-178.
- Popova L.P y Riddle K.A. 1996. Development and accumulation of ABA in fluridone-treated and drought-stressed *Vicia faba* plants under different light conditions. *Physiologia Plantarum* 98: 791-797.
- Qin X y Zeevaart J.A.D. 1999. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proceeding National Academic of Science USA* 96: 15354-15361.
- Quail P.H. 1991. Phytochrome: a light-activated molecular switch that regulates plant gene expression. *Annual Review of Genetics* 25: 389-409.
- Quail P.H. 2002. Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature Reviews* 3: 85-93.
- Quail P.H, Briggs W.R, Chory J, Hangarter R.P, Harberd N.P, Kendrick R.E, Koornneef M, Parks B, Sharrock R.A, Schäfer E, Thompson W.F y Whitelam G.C. 1994. Spotlight on phytochrome nomenclature. *Plant Cell* 6: 468-471.
- Quiñones M.A, Lu Z y Zeiger E. 1996. Close correspondence between the action spectra for the blue light responses of the guard cell and coleoptile chloroplasts, and the spectra for



- blue light-dependent stomatal opening and coleoptile phototropism. *Proceeding National Academic of Science USA* 93: 2224-2228.
- Rademacher W. 1991. Inhibitors of gibberellin biosynthesis: applications in agriculture and horticulture. En: N. Takahashi, B.O. Phinney and J. MacMillan (Eds.). *Gibberellins*. Springer-Verlag, New York, USA: 296-310.
- Rademacher W. 2000. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 501-531.
- Rademacher W, Pharis R.P y Mander L.N. 1999. Agricultural use of new GA derivatives. *Japan. Journal of Crop Science* 68 : 362-367.
- Rashotte A.M, Poupart J, Waddell C.S y Muday G.K. 2003. Transport of the two natural auxins, indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid, in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133: 761-772.
- Raz V, Bergervoet J y Koornneef M. 2001. Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development* 128: 243-252.
- Raz V y Ecker J.R. 1999. Regulation of differential growth in the apical hook of *Arabidopsis*. *Development* 126: 3661-3668.
- Reed J.W. 2001. Roles and activities of AUX/IAA proteins in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 6: 420-425.
- Reed J.W, Nagpal P, Poole D.S, Furuya M y Chory J. 1993. Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 5: 147-157.
- Refrégier G, Pelletier S, Jaillard D y Hofte H. 2004. Interaction between wall deposition and cell elongation in dark-grown hypocotyl cells in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 135: 959-68.
- Reid J.B. 1988. Internode length in *Pisum*: comparison of genotypes in the light and dark. *Physiologia Plantarum* 74 83-88.
- Reid J.B, Botwright N.A, Smith J.J, O'Neill D.P y Kerckhoffs L.H.J. 2002. Control of gibberellin levels and gene expression during de-etolation in pea. *Plant Physiology* 128: 734-741.
- Ribnicky D.M, Llié N, Cohen J.D y Cooke T.J. 1996. The effect of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism: implications for somatic embryogenesis in carrot. *Plant Physiology* 112: 549-558.



- Rock C. 2000. Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytologist* 148: 357-396.
- Rojas M.C, Hedden P, Gaskin P y Tudzynski B. 2001. The *P450-1* gene of *Gibberella fujikuroi* encodes a multifunctional enzyme in gibberellin biosynthesis. *Proceeding National Academy of Science. USA* 98: 5838-5843.
- Romano C.P, Robson P.R.H, Smith H, Estelle M y Klee H. 1995. Transgene-mediated auxin overproduction in *Arabidopsis*: hypocotyl elongation phenotype and interactions with the *hy6-1* hypocotyl elongation and *axr1* auxin-resistant mutants. *Plant Molecular Biology* 27: 1071-1083.
- Ross J.J, Mackenzie-Hose A.K, Davies P.J, Lester D.R, Twitchin B y Reid J.B. 1999. Further evidence for feedback regulation of gibberellin biosynthesis in pea. *Physiologia Plantarum* 105: 532-538.
- Ross J.J, O'Neill D.P y Rathbone D.A. 2003. Auxin-gibberellin interactions in pea: Integrating the old with the new. *Plant Growth Regulation* 22: 99-108.
- Ross J.J, O'Neill D.P, Smith J.J, Kerckhoffs L.H.J y Elliot R.C. 2000. Evidence that auxin promotes gibberellin A₁ biosynthesis in pea. *Plant Journal* 21: 547-552.
- Ross J.J, O'Neill D.P, Wolbang C.M, Symons G.M y Reid J.B. 2002. Auxin-gibberellin interactions and their role in plant growth. *Plant Growth Regulation* 20: 346-353.
- Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, Swartz T.E, Christie J.M, Briggs W.R, Wada M y Okada K. 2001. *Arabidopsis* *nph1* and *npl1*: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proceeding National Academic of Science USA* 98: 6969-6974.
- Sakai T, Wada T, Ishiguro S y Okada K. 2000. RPT2: a signal transducer of the phototropic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 225-236.
- Salchert K, Bhalerao R, Koncz-Kalman Z y Koncz C. 1998. Control of cell elongation and stress responses by steroid hormones and carbon catabolic repression in plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London-Biological Sciences* 353: 1517-1520.
- Sandmann G. 2001. Manipulation of carotenoid biosynthesis and implications on gibberellin and abscisic acid formation. Website: www.riken.go.jp/lab-www/library/publication/review/html/No21/21-06/21-06.htm
- Sancar A. 2003. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chemical Review* 103: 2203-2237.
- Sansberro P, Mroginski L y Bottini R. 2004. Foliar sprays with ABA promote growth of *Ilex paraguariensis* by alleviating diurnal water stress. *Plant Growth Regulation* 42: 105-111.



- Sansberro P.A, Mroginski L.A, Masciarelli O.A y Bottini R. 2002. Shoot growth in *Ilex paraguariensis* plants grown under varying photosynthetically active radiation is affected through gibberellin levels. *Plant Growth Regulation* 38: 231 - 236.
- Sauter M y Kende H. 1992. Gibberellin-induced growth and regulation of the cell division cycle in deepwater rice. *Planta* 188: 362-368.
- Sauter M, Seagull R.W y Kende H. 1993. Internodal elongation and orientation of cellulose microfibrils and microtubules in deepwater rice. *Planta* 190: 354-362.
- Schena M, Shalon D, Davis R.W y Brown P.O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-70.
- Schwartz S.H, Tan B.C, Gage D.A, Zeevaart J.A.D y McCarty D.R. 1997. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276: 1872-1874.
- Schwartz S.H, Qin X y Zeevaart J.A.D. 2003. Elucidation of the indirect pathways of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiology* 131: 1591-1601.
- Sembdner G, Atzorn R y Schneider G. 1994. Plant hormone conjugation. *Plant Molecular Biology* 26: 1459-1481.
- Sembdner G, Groß D, Liebisch H-W y Schneider G. 1980. Biosynthesis and metabolism of plant hormones. En: MacMillan J (ed) *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, vol 9, pp. 281-444. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York.
- Serebryakov E.P, Epstein N.A, Yasinskaya N.P y Kaplum A.B. 1984. A mathematical additive model of the structure-activity relationships of gibberellins. *Phytochemistry* 23: 1855-1863.
- Shalitin D, Yang H, Mockler T.C, Maymon M, Guo H, Whitelam G.C y Lin C. 2002. Regulation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature* 417: 763-767.
- Shalitin D, Yu X, Maymon M, Mockler T y Lin C. 2003. Blue light-dependent in vivo and in vitro phosphorylation of *Arabidopsis* cryptochrome 1. *Plant Cell* 15: 2421-2429.
- Sherriff L.J, McKay M.J, Ross J.J, Reid J.B y Willis C.L. 1994. Decapitation reduces the metabolism of gibberellin A₂₀ to A₁ in *Pisum sativum* L. decreasing the *Le/le* difference. *Plant Physiology* 104: 277-280.
- Shi L, Gast R.T, Gopalraj M y Olszewski N.E. 1992. Characterization of a shoot-specific, GA₃- and ABA-regulated gene from tomato. *Plant Journal* 2: 153-159.
- Shi L y Olszewski N.E. 1998. Gibberellin and abscisic acid regulate GAST1 expression at the level of transcription. *Plant Molecular Biology* 38: 1053-1060.



- Shibaoka H. 1994. Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules: alterations in the cross-linking between microtubules and the plasma membrane. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 527-544.
- Shinkle J.R, Kadakia R y Jones A.M. 1998. Dim-red-light-induced increase in polar auxin transport in cucumber seedlings. I. Development of altered capacity, velocity, and response to inhibitors. *Plant Physiology* 116: 1505-1513.
- Short T.W y Briggs W.R. 1994. The transduction of blue light signals in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 143-171.
- Small D.G, Min B y Lefebvre P.A. 1995. Characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* gene encoding a protein of the DNA photolyase/blue light photoreceptor family. *Plant Molecular Biology* 28: 443-454.
- Smalle J, Haegman M, Kurepa J, Van Montagu M y Straeten D.V. 1997. Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. *Proceeding National Academic of Science. USA* 94: 2756-2761.
- Smith T.A. 1990. Plant polyamines-Metabolism and functions. En: H.E. Flores, R.N. Arteca, J.C. Shannon (Eds.). *Current Topics in Plant Physiology*, vol 5, Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology, and Interactions. American Society of Plant Physiology, USA: 1-23.
- Somers D.E, Kim W.Y, Geng R. 2004. The F-box protein ZEITLUPE confers dosage-dependent control on the circadian clock, photomorphogenesis, and flowering time. *Plant Cell* 16:769-782.
- Somers D.E, Schultz T.F, Milnamow M y Kay S.A. 2000. ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *The Cell* 101: 319-329.
- Spalding E.P. 2000. Ion channels and the transduction of light signals. *Plant Cell and Environment* 23: 665-674.
- Spalding E.P y Cosgrove D.J. 1989. Large plasma-membrane depolarization precedes rapid blue-light-induced growth inhibition in cucumber. *Planta* 178: 407-410.
- Sponsel V.M. 2002. The deoxyxylulose phosphate pathway for the biosynthesis of plastidic isoprenoids: Early days in our understanding of the early stages of gibberellin biosynthesis. *Plant Growth Regulation* 20: 332-345.
- Srivastava A y Zeiger E. 1995. The inhibitor of zeaxanthin formation, dethiothreitol, inhibits blue light-stimulated stomatal opening in *Vicia faba*. *Planta* 196: 445-449.
- Steber C.M, Cooney S.E y McCourt P. 1998. Isolation of the GA-response mutant *sly1* as a suppressor of *Abi1-1* in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 149: 509-521.



- Steber C.M y McCourt P. 2001. A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 125: 763-769.
- Stowe-Evans E.L, Luesse D.R y Liscum E. 2001. The enhancement of phototropin-induced phototropic curvature in *Arabidopsis* occurs via a photoreversible phytochrome A-dependent modulation of auxin responsiveness. *Plant Physiology* 26: 826-834.
- Stracke R, Werber M y Weisshaar B. 2001. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 447-456.
- Sun T-p y Gubler F. 2004. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 55: 197-223.
- Swarup R, Friml J, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, Palme K y Bennett M. 2001. Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes and Development* 15:2648-2653.
- Symons G.M y Reid J.B. 2003. Hormone levels and response during de-etiolation in pea. *Planta* 216: 422-431.
- Symons G.M, Schultz L, Kerckhoffs L.H.J, Davies N.W, Gregory D y Reid J.B. 2002. Uncoupling brassinosteroid levels and de-etiolation in pea. *Physiologia Plantarum* 115: 311-319.
- Szekeres M, Nemeth K, Koncz-Kalman A, Mathur J, Kauschmann A, Altman T, Redei G.P, Nagy F, Schell J y Koncz C. 1996. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *The Cell* 85: 171-182.
- Talon M, Koornneef M y Zeevaart J.A.D. 1990. Endogenous gibberellins in *Arabidopsis thaliana* and possible steps blocked in the biosynthetic pathways of the semidwarf *ga4* and *ga5* mutants. *Proceeding National Academic of Science. USA* 87: 7983-7987.
- Tan B.C, Schwartz S.H, Zeevaart J.A.D y McCarty D.R. 1997. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proceeding National Academic of Science. USA* 94: 12235-12240.
- Tatematsu K, Kumagai S, Muto H, Sato A, Watahiki M.K, Harper R.M, Liscum E y Yamamoto K.T. 2004. MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 379-393.
- Taylor B.L y Zhulin I.B. 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential and light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 479-506.



- Tepperman J.M, Hudson M.E, Khanna R, Zhu T, Chang H.S, Wang X y Quail P.H. 2004. Expression profiling of *phyB* mutant demonstrates substantial contribution of other phytochromes to red light-regulated gene expression during seedling de-etiolation. *Plant Journal* 38: 725-739.
- Tepperman J.M, Zhu T, Chang H.S, Wang X y Quail P.H. 2001. Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proceeding National Academic of Science USA* 98: 9437-9442.
- Thind S.K, Chanpreet y Mridula. 1997. Effect of fluridone on free sugar level in heat stressed mungbean seedlings. *Plant Growth Regulation* 22: 19-22.
- Thomas S.G, Phillips A.L y Hedden P. 1999. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proceeding National Academic of Science USA* 96: 4698-4703.
- Toyomasu T, Kawaide H, Mitsuhashi W, Inoue Y y Kamiya Y. 1998. Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiology* 118: 1517-1523.
- Toyomasu T, Yamane H, Yamaguchi Y, Murofushi N, Takahashi N y Inoue Y. 1992. Control by light of hypocotyl elongation and levels of endogenous gibberellins in seedlings of *Lactuca sativa* L. *Plant and Cell Physiology* 33: 695-701.
- Tudzynski B, Mihlan M, Rojas M.C, Linnemannstons P, Gaskin P y Hedden P. 2003. Characterization of the final two genes of the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi*. *des* and *P450-3* encode GA₄ desaturase and the 13-hydroxylase, respectively. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 28635-28643.
- Tudzynski B, Rojas M.C, Gaskin P y Hedden P. 2002. The gibberellin 20-oxidase of *Gibberella fujikuroi* is a multifunctional monooxygenase. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 21246-21253.
- Vandepoele K, Raes J, DeVeylder L, Rouze P, Rombausts S y Inzé D. 2002. Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *Plant Cell*. 14: 903-916.
- Verbelen J-P, Vissenberg K, Kerstens S y Le J. 2001. Cell expansion in the epidermis: microtubules, cellulose orientation and wall loosening enzymes. *Plant Physiology* 158: 537-543.
- Vierstra R.D. 2003. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends in Plant Science* 8: 135-142.
- Volmaro C, Pontin M.A, Luna M.V, Baraldi R y Bottini R. 1998. Blue light control of hypocotyl elongation in etiolated seedlings of *Lactuca sativa* (L.) cv. Grand rapids related



- to exogenous growth regulators and endogenous IAA, GA and ABA. *Plant Growth Regulation* 26: 165-173.
- Voesenek L.A.C.J, Benschop J.J, Bou J, Cox M.C.H, Groeneveld H.W, Millenaar F.F, Vreeburg R.A.M y Peeters A.J.M. 2003. Interactions between plant hormones regulate submergence-induced shoot elongation in the flooding-tolerant dicot *Rumex palustris*. *Annals of Botany* 91: 205-211.
- Vriezen W.H, Zhou Z y Van Der Straeten D. 2003. Regulation of submergence-induced enhanced shoot elongation in *Oryza sativa* L. *Annals of Botany* 91: 263-270.
- Waller F, Riemann M y Nick P. 2002. A role for actin-driven secretion in auxin-induced growth. *Protoplasma* 219: 72-81.
- Wang H, Ma L.G, Li J.M, Zhao H.Y y Deng X.W. 2001. Direct interaction of Arabidopsis cryptochromes with COP1 in light control development. *Science* 294: 154-158.
- Wang H, Ma L.G, Habashi J, Li J.M, Zhao H.Y y Deng X.W. 2002. Analysis of far-red light-regulated genome expression profiles of phytochrome A pathway mutants in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 32: 723-733.
- Weatherwax S.C, Ong M.S, Degenhardt J, Bray E.A y Tobin E.M. 1996. The interaction of light and abscisic acid in the regulation of plant gene expression. *Plant Physiology* 111: 363-370.
- Wolbang C.M, Chandler P.M, Smith J.J y Ross J.J. 2004. Auxin from the developing inflorescence is required for the biosynthesis of active gibberellin in Barley stems. *Plant Physiology* 134: 769-776.
- Wu K, Li L, Gage D.A y Zeevaart J.A.D. 1996. Molecular cloning and photoperiod-regulated expression of gibberellin 20-oxidase from the long-day plant spinach. *Plant Physiology* 110: 547-554.
- Xu N y Bewley J.D. 1995. The role of abscisic acid in germination, storage protein synthesis and desiccation tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) seeds, as shown by inhibition of its synthesis by fluridone during development. *Journal of Experimental Botany* 46: 687-694.
- Xu Y-L, Gage D.A y Zeevaart J.A.D. 1997. Gibberellins and stem growth in *Arabidopsis thaliana*. Effects of photoperiod on expression of the *GA4* and *GA5* loci. *Plant Physiology* 114: 1471-1476.
- Xu Y-L, Li L, Gage D.A y Zeevaart J.A.D. 1999. Feedback regulation of *GA5* expression and metabolic engineering of gibberellin levels in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11: 927-936.



- Xu X, Van Lammeren A.A.M, Vermeer E y Vreugdenhil D. 1998. The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation in vitro. *Plant Physiology* 117: 575-584.
- Yamaguchi S y Kamiya Y. 2000. Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiology* 41: 251-257.
- Yamaguchi S y Kamiya Y. 2002. Gibberellins and light-stimulated seed germination. *Plant Growth Regulation* 20: 369-376.
- Yamaguchi S, Kamiya Y y Sun T-p. 2001. Distinct cell-specific expression patterns of early and late gibberellin biosynthetic genes during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Journal* 28: 443-453.
- Yamaguchi S, Smith M.W, Brown R.G.S, Kamiya Y and Sun T-p. 1998. Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3 β -hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 10: 2115-2126.
- Yang T, Davies P.J y Reid J.B. 1996. Genetic dissection of the relative roles of auxin and gibberellin in the regulation of stem elongation in intact light-grown peas. *Plant Physiology* 110: 1029-1034.
- Yang H-Q, Wu Y-J, Tang R-H, Liu D, Liu Y y Cashmore A.R. 2000. The C termini of *Arabidopsis* cryptochromes mediate a constitutive light response. *The Cell* 103: 815-827.
- Yokota T. 1997. The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends in Plant Science* 2: 137-143.
- Yokota T. 1999. Brassinosteroids. En: *Biochemistry and molecular biology of plant hormones*. Hooykaas P.J.J, Hall M.A, Libbenga K.R (Ed.). Elsevier, Amsterdam: 277-292.
- Yoshioka T, Endo T y Satoh S. 1998. Restoration of seed germination at supraoptimal temperatures by fluridone, an inhibitor of abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell Physiology* 39: 307-312.
- Zazimalova E y Napier R.M. 2003. Points of regulation for auxin action. *Plant Cell Reports* 21: 625-634.
- Zeevaart J.A.D. 1999. Abscisic acid metabolism and its regulation. En PJJ Hooykaas, MAK Hall, R Libbenga, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. Elsevier Science. Amsterdam, pp 189-207.
- Zeevaart J.A.D y Creelman R.A. 1988. Metabolism and physiology of ABA. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 439-473.



- Zeevaart J.A.D y Gage D.A. 1993. *ent*-kaurene biosynthesis is enhanced by long photoperiods in the long-day plants *Spinacia oleracea* L. and *Agrostemma githago* L. *Plant Physiology* 101: 25-29.
- Zeiger E y Helper P. 1977. Light and stomatal function: blue light stimulates swelling of guard cell protoplasts. *Science* 196: 887-889.
- Zeiger E y Zhu J. 1998. Role of zeaxanthin in blue light photoreception and the modulation of light-CO₂ interactions in guard cells. *Journal of Experimental Botany* 49: 433-442.
- Zhao Y y Chory J. 2001. A link between the light and gibberellin signaling cascades. *Developmental Cell* 1: 315-316.
- Zhao Y, Christensen S.K, Fankhauser C, Cashman J.R, Cohen J.D, Weigel D y Chory J. 2001. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291: 306-309.
- Zhou R, Abrams G.D, Barton D.L, Taylor D.C, Pemerooy M.K y Abrams S.R. 1995. Induction of lipid and oleosin biosynthesis by (+)-abscisic acid and its metabolites in microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. cv Reston. *Plant Physiology* 108: 563-571.
- Zhou R, Cutler A.J, Ambrose S.J, Galka M.M, Nelson K.M, Squires T.M, Loewen M.K, Jadhav A.S, Ross A.R.S, Taylor D.C y Abrams S.R. 2004. A new abscisic acid catabolic pathway. *Plant Physiology* 134: 361-369.

U.N.R.C.
Biblioteca Central



61158

61158