

ConSORCI



IRTA



ConSORCI CSIC-IRTA

Laboratori de Genètica Molecular Vegetal
Departament de Genètica Molecular

Universitat de Barcelona

Facultat de Biologia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

**CONTROL MOLECULAR I FISIOLÒGIC
DE LA SÍNDROME DE FUGIDA DE L'OMBRA
EN *ARABIDOPSIS THALIANA***

Irma Roig i Villanova
Barcelona, Juny de 2007

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOTECNOLOGIA
BIENNI 2001-2003

**CONTROL MOLECULAR I FISIOLÒGIC
DE LA SÍNDROME DE FUGIDA DE L'OMBRA
EN *ARABIDOPSIS THALIANA***

Memoria presentada per Irma Roig i Villanova per optar al títol de
doctor de la Universitat de Barcelona

Aquest treball, realitzat al Laboratori de Genètica Molecular Vegetal
Consorti CSIC-IRTA, ha estat finançat pel Ministeri d'Educació i Ciència amb la
beca predoctoral per a la formació de personal investigador BES-2003-1873

Vist-i-plau de

el director de la tesi

la tutora

l'autora

Dr. Jaime F. Martínez García

Dra. Montserrat Busquets

Irma Roig i Villanova

Barcelona, Juny del 2007

Als meus pares, Joan i Fina.

AGRAÏMENTS

Poder fer una tesi i fer-la al CSIC ha estat per a mi una gran sort, per això vull agrair a tots aquells que han contribuït a que em senti tan afortunada.

Al Jaume Martínez, no només li vull agrair el fet de donar-me l'oportunitat de fer la tesi en el seu grup i haver-me obert les portes del coneixement científic. És molt més que tot això. Jaume, et vull agrair que m'escollissis com la teva primera becària, i que hakis confiat en mi per presentar la nostra feina en congressos i fer estades en altres laboratoris, perquè sempre ha estat enriquidor. Gràcies per l'enorme paciència que has tingut amb mi, fins i tot quan em deies Paquita... i també per l'optimisme i pels festivals de l'humor, que han fet tan amenes les llargues hores passades al lab. Aquest mèrit el comparteixes amb el Jordi súper-pare Bou, una de les millors persones que he conegut mai. Jordi, gràcies per tota l'ajuda, consells i moments passats junts, i per descobrir-me la dieta de les madalenes! I a la persona que acaba d'arrodonir el millor lab del món, l'Anahit, thanks a lot for being so optimistic and nice, and for understanding the Spanish and Catalan cultures so well. I'm sure you will succeed in in anything you'll do in life. Pues eso, good luck in your Ph D! Gracias Luis por el buen rollo que generabas siempre en el laboratorio, y por decirme que le echo arte bailando sevillanas, aunque los dos sepamos que es mentira... I als estudiants de pràctiques, gràcies perquè una mica de la meva tesi és vostra! Especialment agraeixo la Marina i la Chloé per ser tant dolces, treballadores i competents, i al meu preferit, en Sergi Portolés, per voler tripitir amb nosaltres ... sempre seràs mi ninyo de pràctiques però també un científic genial!

Gràcies als que em van introduir en això de la ciència: a la Montse Forns, que em va fer entrar el cuquet de la Biologia, i al Dr. Vendrell, que em va donar l'oportunitat de venir a treballar al CSIC.

Al Dr. Paul Devlin que l'estiu del 2004 em van acollir al seu lab de Londres, on vaig poder fer el cribratge de mutants: Many thanks for making possible part of my Ph D, and also for giving me the oportunitat of living in this marvellous city. A l'Ernest i la Elena que em van oferir la seva amstat i els cafès (en horari espanyol) al King's College. I a la banyolina més famosa, la Marta, per fer-me de guia i convertir l'estada en inoblidable. Nena, vam treballar molt però vam disfrutar més, eh! Una corona???

Al Professor Peter Quail i a tots els Quailies que van convertir l'estiu del 2006 en una de les millors experiències ever. Thanks a lot for making me learn every day and every lab meeting in the best scientific environment. Thanks to Jim, Elise, Yoshito (and Yoriko), the McCormick-girls, Bassem and Héctor for making me enjoy life+science in Berkeley. Gràcies molt especialment al Pau i la Sara que es van desviure per ajudar-me i ensenyar-me SF. I a la Sara P., en Mauricio i la resta de la comunitat catalano-espanyola per fer-me sentir com a casa, fins i tot a la final de la Champions League!!!

Gràcies al Dr. García-Martínez, al Servei de Transcriptòmica del Projecte GEFA i al Servei de Cartografia Gènica per la contribució a aquest treball, així com a tots aquells grups que ens han cedit llavors i construccions desinteressadament, perquè d'això consta la ciència, de petites aportacions i d'ajudar-nos els uns als altres.

Al grup del Dr. Manuel Rodríguez, els vull donar les gràcies per fer-me perdre la por escènica als seminaris i plantejar-me qüestions científiques en el millor ambient possible. Al Manuel li agraeixo que també considerés el meu potencial científic a l'hora

de començar la tesi, i tots els comentaris enriquidors que sempre m'ha fet. Gràcies especialment a la Susanna i la Patricia, perquè l'inici amb elles va ser més fàcil.

I a la gent del departament de GM (que no són les inicials de Genètica Molecular, com molta gent creu, sinó Guai i que Mola), gràcies a tots. Tenir un departament amb laboratoris verds, vermells, grocs, o fins i tot roses! no és gaire seriós, però el poder passar de la falta de serietat dels passadissos al rigor científic dins els laboratoris és el que m'agrada més d'aquest departament. Moltes gràcies als meus companys del vermell per contagiarme tants cops el riure (sovint estant ells al seu lab i jo al lila, perquè sí, se us sent riure!). Marc North Face, ets un crack (a la muntanya i a la ciència! qui ens ho hagués dit a cap dels dos en aquelles biomarxes...). A la Lola, gràcies per la comanda de donuts que ens va "signar" un dia, i la sinceritat que va tenir amb mi quan començava la tesi. A ella, la Margarita, el Pau, la Minu, l'Imma i la Meritxell, gràcies pel bon ambient de treball. I com no a l'Eli Wendy Pollo, per ser la google del departament, l'infermera que em cura els nens de pràctiques ferits..., gràcies per mirar-te la tesi, i pel tour Londres-Madrid-SF! I de Wendy a Wendy... al laboratori verd, on hi ha la Núria Wendy S.E. M'encanta que perdessis la vergonya de petita i encara no l'hagis trobat! Moltes gràcies per donar-nos aquesta lliçó d'optimisme a tots! I a totes dues, moltíssimes gràcies per les missions Wendy (que segur seguiran en el futur): fistros, carnestoltes, aniversaris, claretetes... de les no científiques parariem al *USA road trip*, però també protocols, recuperació de mostres de dins del bidó del nitrogen líquid (argggggg!), assajos de congressos, qui diu que la vida del científic és aborrida? Al Wendíssimo Cristian, galán del departamento, muchas gracias por cuidarme como a una reina! (ahora tú dirías: no Wendísima, gracias a tí... y estaríamos con esto hasta mañana...). Al Sergi "perla" Ferrero, gràcies pels bons moments passats i reflexions vàries... seguiré utilitzant aquesta colònia! Gràcies a la comunitat rosa-groga, pel bon rotllo que despreneu. A vosaltres també us sentim riure (i cantar)! Gràcies especialment a les veteranes Sonia i Bia que han estat amb mi des del principi, i al Jordi i la Laura que m'han ofert sempre la seva ajuda tot i estar fins al capdamunt de feina. Als blaus, especialment la Cristina, que ens els últims temps m'ha guiat en la burocràcia universitària, i l'amigo Lorenzo (hay que ver qué arbolicos más simpáticos nos has llegado a hacer). Als negres (Valeria, gracias por los buenos momentos y los múltiples consejos sobre formatos de tesis! Ci vediamo presto a l'Italia!), verds i taronges de tots els temps, especialment al Carles: t'agraeixo enormement que no em deixessis penjada al Circ de la Solitude de Còrcega, perquè sinó no hauria pogut acabar la tesi! Gràcies per les converses científiques i no científiques aquell viatge i sempre.

Als de la sisena: Soraya y sus niñas, gracias por el buen rollo y el optimismo que desprendéis. Cristina, veniros de postdoc conmigo!!!! A la Paloma y sus niños, i al Juanjo y sus niñas, gràcies per tenir una paraula amable sempre. Nahuel, te agradezco que nunca me mostraras como trabajáis en cueros en Argentina (no sé si lo aguantaría...). Escolta maco, gracias por tu calma y humor que hicieron los momentos delicados mucho más soportables, y el viaje a Italia de lo más divertido. Molta sort per a la tesi i alpostdoc!!! A en Pep i los niños del gris: gràcies per adoptar-me la meva primera setmana de tesi i mantenir la bona relació fins al final. Enric, gràcies per les xerrades científiques i per compartir el patiment dels papers; a la Céline, i al Néstor, gracias por los muchos momentos compartidos y que vamos a seguir compartiendo, por estar de buen humor SIEMPRE, y seguir preocupándote por mí estés donde estés.

Als exfruitis que han seguit al meu costat, "dumés" us puc dir gràcies: al Xevi, per ser-hi abans i durant la tesi, segur que després també hi seràs! per creure en mi

molt més que jo mateixa, i pels búlgaros a la fotocopiadora. També a la Desi, la millor successora que podia tenir. Et desitjo tota la sort del món perquè te la mereixes més que "dingú". Tenim una "missió piscina" pendent... I gràcies a tots aquells becaris que han passat pel departament: Marta Boter, jo sí que de gran vull ser com tu!, Hans, Dani i Pepi Cucaratxos... per la vostra ajuda en diferents moments i per contribuir al bon ambient de la 4a planta.

Gràcies al suport tècnic del departament: Maite, gracias por tener un momento siempre para atenderme y para salir de fiesta también! Dani, gracias por traer al lila aire fresco con acento a jardinero del bricomanía... Mina, gràcies guapíssima per preocupar-te de tots nosaltres sempre com una mare. Un petó molt fort, ja saps que me'n recordaré sempre de tu! Gràcies a la gent d'hivernacles, per fer tanta i tan bona feina amb tan bon humor. Gràcies Alejandro, Eva, César i Leire, i especialment a la jefa Pilaaaar, eres nuestro Pilar!!! La patent del Topate la tindrem a mitges, eh! Gràcies a la Mercè, la Mireia, l'Àngel i la Mònica, ja que amb els seus serveis fan més fàcil la nostra feina dia a dia. I gràcies al Raúl, l'informàtic més eficient de la terra, que ens ho arregla tot, tot i tot, per respondre tan ràpid a les trucades del lila, o venir sense ser cridat!

I per si amb això no fos poc, també he tingut la gran sort de contar amb un suport incondicional fora del lab, que ha fet que desconnectés de la ciència, gaudís de moltes altres coses i de vegades ho barrejés tot una mica.

A les biòlogues que van entrar en la meva vida un dia i de la que ja mai sortiran: moltes gràcies! Us feria un capítol d'agraïments sencer a vosaltres soles!!! Marisa, Carol, Maricarmen, Àngela, Soraya, Esther, Isa, Rosa i Miriam (i truchos consortes): Gràcies per les sevillanes, pels viatges, pels fistros, per haver pogut treballar amb dues de vosaltres, pels findes marujils, pel cacareo, i per recordar-me les propietats de la crioconservació en els moments d'urgència extrema! Gràcies per l'amistat per sobre de tot. I als súpers, Laura, Jordi, Xavi i Marc, per tants bons moments i per mostrar-me que si això de la ciència no surt bé sempre podem gravar pelis o organitzar gales!

Als meus amics de l'institut que sempre m'han fet costat. Núria, si ets tan bona mare com amiga seràs la millor mare del món! Gràcies per fer les penes menys tristes i les alegries més felices, i entendre la meva feina tan bé. Gràcies al Xavi per batejar-me com a científica loca i estar allà, pendent, perquè sé que hi estàs.

A les Eves i la Sandra de la Codonyera, que tot i que això de la ciència els queda una mica lluny, sempre es preocupen per com em va.

I gràcies a la meva família, la millor del món. Als meus tiets Mati i Argi per preocupar-se de les seves nebodes com si es tractés de filles, tot i tenir preocupacions de salut més importants. A les meves germanes, model de treball i superació a seguir. Als meus nebots i nebodes, que em recorden cada dia que hi ha moltes coses importants a la vida a part de la ciència, de les quals no me'n penso perdre ni una. I gràcies als meus pares, que ens ho han donat i continuen donant-ho tot, i que han fet possible que em dediqui al que més m'agrada. Al meu pare, que s'ha preocupat per donar-nos la millor educació possible en el millor ambient de treball, i a la meva mare, que em prepara les carmanyoles més bones i m'aguanta el rollo cada dia, que no és poc. Moltes gràcies!

Gràcies a tots i... sort!!

*Ombra mai fù, di vegetabile cara
ed amabile soave più.*

(mai l'ombra d'un arbre
no fou tan preciosa, amable i suau).

Serse, de G.F. Haendel.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	1
1. La importància de la llum per a les plantes	3
2. La desetiolació	4
3. Els diferents fotoreceptors	5
4. Els fitocroms	6
4.1. Descripció i modes d'acció dels fitocroms	6
4.1.1. Conformació dels fitocroms	6
4.1.2. Tipus de respostes regulades pels fitocroms	7
4.1.3. Classificació dels fitocroms	8
4.1.4. Accions i interaccions dels membres de la família dels fitocroms	8
4.1.5. Interacció dels fitocroms amb altres fotoreceptors i senyals ambientals ...	10
4.1.6. Fitocroms bacterians	10
4.1.7. Estructura i funció dels diferents dominis de la molècula del fitocrom	11
4.2. Localització subcel·lular dels fitocroms	12
4.3. Mecanismes de transducció del senyal lumínic	14
4.4. Mecanismes d'acció dels fitocroms	15
4.4.1. Els fitocroms com a fosfoproteïnes i quinases	16
4.4.2. Els fitocroms com a reguladors de la transcripció	19
4.5. Intermediaris específics de la senyalització per fitocroms	22
4.5.1. Components específics de la senyalització de phyA	22
4.5.2. Components específics de la senyalització de phyB	23
4.5.3. Components comuns de la senyalització de phyA i phyB	24
4.5.4. Components integradors de la transducció de la llum	25
4.6. Desetiolació <i>versus</i> plantes cultivades en llum	26
4.7. Respostes a la qualitat de la llum: la Síndrome de Fugida de l'Ombra (SAS)	26
4.7.1. Fisiologia de la SAS	28
4.7.2. Paper dels fitocroms en la SAS	28
4.7.3. Components moleculars de la SAS	30
4.7.4. Paper d'altres senyals en les respostes de la SAS	31
4.7.5. Relació de les hormones amb les respostes de la SAS	31
4.7.6. Interès biotecnològic de la SAS	33
2. OBJECTIUS	35
3. RESULTATS	39
Capítol I. Estudi dels gens regulats primerencament pels fitocroms en el procés de la síndrome de fugida de l'ombra (SAS)	41
1. Identificació de gens regulats primerencament pels fitocroms en la SAS ..	41

2.	Efecte de la qualitat de la llum sobre l'expressió dels PARs	43
3.	Efecte dels diferents fotoreceptors sobre l'expressió dels PARs	44
4.	Identificació dels gens PAR diana primaris de l'acció dels fitocroms durant la SAS	47
5.	Estudi de la regió promotora dels gens PAR	50
6.	Estudi de l'expressió dels PARs durant el desenvolupament de la plàntula	52
7.	Caracterització de respostes fisiològiques a l'ombra simulada en plantes silvestres	53
8.	Caracterització de les respostes fisiològiques a l'ombra simulada en diferents espècies del gènere Arabidopsis	55
Capítol II. Estudi del paper de factors de la transducció de la llum en la regulació de l'expressió dels gens PAR		58
1.	Paper de COP1 sobre la regulació de l'expressió dels PARs	58
2.	Paper de HY5 sobre la regulació de l'expressió dels PARs	60
3.	Paper de DET1 i DET2 sobre la regulació de l'expressió dels PARs	61
Capítol III. Cerca de nous factors de la transducció de la llum en resposta a l'ombra		63
1.	Plantejament de l'estratègia genètica	63
2.	Mutagènesi, cribratge i confirmació de mutants	65
3.	Caracterització fisiològica de les línies mutants	67
3.1.	Caracterització dels mutants en llum blanca	67
3.2.	Caracterització del mutant I2.164 en resposta a l'ombra simulada	68
3.3.	Caracterització del mutant I2.164 en la desetiolació	68
4.	Anàlisi dels nivells de proteïna PHYB del mutant I2.164	70
5.	Mapatge de baixa resolució del mutant I2.164	70
Capítol IV. Estudi dels gens PAR.....		73
1.	Sobreexpressió d'ATHB2 i ATHB4	73
2.	Mutants simples d'ATHB2 i ATHB4	74
Capítol V. Caracterització del factor PAR1		77
1.	Estudi de la seqüència de PAR1	77
2.	Anàlisi funcional en planta	77
2.1.	Obtenció i caracterització de plantes de sobreexpressió de PAR1	78
2.1.1.	Caracterització molecular	78
2.1.2.	Caracterització fenotípica	79
2.2.	Obtenció i caracterització de línies amb nivells reduïts de PAR1 (i PAR2)	83

2.2.1.	Caracterització molecular	84
2.2.2.	Caracterització fenotípica	84
2.3.	Altres fenotips d'interès	88
3.	Relació de les hormones amb el fenotip de les plantes mutants PAR1	88
3.1.	Estudi de l'efecte de les gibberel·lines (GAs) sobre el fenotip de les plantes de sobreexpressió de <i>PAR1</i>	89
3.2.	Estudi de la sensibilitat de les plantes mutants <i>PAR1</i> a GAs	90
3.3.	Quantificació de GAs en les plantes de sobreexpressió de <i>PAR1</i>	91
3.4.	Estudi de l'efecte dels brassinosteroides (BRs) sobre el fenotip de les plantes de sobreexpressió de <i>PAR1</i>	92
3.5.	Estudi de l'efecte de les citoquinines (CKs) sobre el fenotip de les plantes mutants <i>PAR1</i>	94
3.6.	Estudi de l'efecte de les auxines sobre el fenotip de les plantes mutants <i>PAR1</i>	95
4.	Estudi de la localització subcel·lular de <i>PAR1</i>	95
4.1.	Anàlisi de la funcionalitat de <i>PAR1</i> depenent de la seva localització subcel·lular	96
Capítol VI. Identificació i caracterització de gens regulats per <i>PAR1</i>		98
1.	Efecte de <i>PAR1</i> sobre l'expressió d'altres gens regulats pels fitocroms	98
2.	Identificació de gens regulats per <i>PAR1</i> mitjançant la tècnica de les micromatrius de RNA.....	99
2.1.	Estudi de la expressió dels gens SAUR en les línies mutants <i>PAR1</i> i en resposta a l'ombra simulada.	100
2.2.	Efecte de <i>PAR1</i> sobre la regulació per hormones de SAUR15 i SAUR68	102
3.	Estudi de la relació hormones-SAS	105
3.1	Estudi de la resposta de la línia DR5:GUS a les auxines i a la SAS	105
4.	DISCUSSIÓ	111
	Canvis moleculars associats a la SAS: identificació dels gens <i>PAR</i>	113
	Canvis cel·lulars associats a la SAS	118
	Cerca d'altres components de la SAS	119
	Caracterització d'alguns gens <i>PAR</i>	121
	Caracterització d'ATHB2 i ATHB4	121
	Caracterització de <i>PAR1</i>	123
5.	CONCLUSIONS	131
6.	MATERIALS I MÈTODES	135
1.	Material biològic	137
1.1.	Material bacterià	137

1.1.1.	Soques bacterianes	137
1.1.2.	Obtenció de cèl·lules competents per xoc tèrmic	137
1.1.3.	Obtenció de cèl·lules electrocompetents	138
1.1.4.	Medis de cultiu bacterians	139
1.1.5.	Suplements dels medis de cultiu bacterians	139
1.1.6.	Condicions de cultiu de bacteris	139
1.2.	Material vegetal	140
1.2.1.	Ecotips silvestres	140
1.2.2.	Línies transgèniques	140
1.2.3.	Línies mutants de pèrdua de funció	142
1.2.4.	Condicions de cultiu a l'hivernacle i al fitotró	142
1.2.5.	Medis de cultiu de plantes	143
1.2.6.	Suplements dels medis de cultiu de plantes	143
1.2.7.	Condicions de cultiu in vitro	143
1.3.	Plasmidis	143
1.3.1.	Vectors	143
1.3.2.	Construccions	144
1.4.	Encebadors	148
2.	Metodologies	149
2.1.	Tècniques de biologia molecular dels àcids nucleics	149
2.1.1.	Obtenció de DNA plasmídic	149
2.1.2.	Subclonatge de fragments de DNA en plasmidis	150
2.1.3.	Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	151
2.1.4.	Separació de DNA en gels d'agarosa	154
2.1.5.	Seqüenciació del DNA	154
2.1.6.	Purificació de fragments de DNA	154
2.1.7.	Obtenció de RNA total d'arabidopsis	155
2.1.8.	Quantificació d'àcids nucleics	156
2.1.9.	Anàlisi de l'RNA per northern-blot	156
2.1.10.	Obtenció de sondes de DNA i marcatge radioactiu.....	157
2.1.11.	Hibridació de membranes northern-blot amb sondes de DNA	158
2.1.12.	Deshibridació de membranes	159
2.2.	Tècniques de biologia molecular de proteïnes	159
2.2.1.	Obtenció d'extractes proteics	159
2.2.2.	Quantificació de proteïnes	159
2.2.3.	Separació electroforètica de proteïnes	160
2.2.4.	Anàlisi de proteïnes per transferència i immunodecteció	160
2.2.5.	Anticossos utilitzats	161
2.3.	Tècniques bioquímiques	161
2.3.1.	Anàlisi dels pigments isoprenoides (clorofil·les i carotenoides)	161
2.4.	Mètodes de plantes	161
2.4.1.	Esterilització de llavors	161
2.4.2.	Sembra de llavors	161
2.4.3.	Obtenció de plantes transgèniques	163

2.4.4.	Anàlisi molecular de les plantes mutants	164
2.4.5.	Tractaments i assajos en planta	165
2.4.6.	Tractaments amb reguladors del creixement, cicloheximida i dexametasona	168
2.4.7.	Quantificació de GAs	168
2.4.8.	Tinció histoquímica GUS	168
2.4.9.	Localització subcel·lular	169
2.4.10.	Estudis d'ultraestructura mitjançant microscopia electrònica de transmissió	169
2.4.11.	Mutagènesi de llavors de la línia PBL i cribratge de mutants	170
2.4.12.	Anàlisi de micromatrius d'RNA	171
3.	Bioinformàtica	171
7.	BIBLIOGRAFIA	173
8.	ANNEX	187

ÍNDEX DE FIGURES

INTRODUCCIÓ

Figura I.1	Esquema de les principals respostes de les plantes a la llum durant les diferents etapes del seu cicle biològic	3
Figura I.2	Contrast de fenotip entre una plàntula d'arabidopsis crescuda en foscor i una altra crescuda en llum	4
Figura I.3	Representació de l'espectre lumínic i dels fotoreceptors que capten les diferents longituds d'ona que el componen, així com el procés en el que estan implicats (fotomorfogènesi o fotosíntesi)	5
Figura I.4	Esquema de les conformacions dels fitocroms i dels seus espectres d'absorció	7
Figura I.5	Mapa molecular del fitocrom	12
Figura I.6	Esquema de la localització subcel·lular dels fitocroms utilitzant phyB com a model	13
Figura I.7	Diagrama de l'acció dels fitocroms	17
Figura I.8	Model hipotètic del paper de la fosforilació reversible del fitocrom en la seva funció	18
Figura I.9	Esquema de la regulació directa de la transcripció per part dels fitocroms	20
Figura I.10	Model simplificat de la transducció del senyal lumínic en la desetioliació per llum FR	20
Figura I.11	Xarxa transcripcional hipotètica generada per la combinació en homo o heterodímers de diferents membres de la família bHLH i la interacció selectiva d'aquests dímers bHLH amb els membres de la família dels fitocroms	21
Figura I.12	Diagrames de la seqüència proteica completa dels membres de la subfamília 15 de la família de proteïnes bHLH	22
Figura I.13	Esquema simplificat de les vies de senyalització de phyA i phyB elaborat a partir d'estudis genètics i moleculars	23
Figura I.14	Model de les interaccions funcionals de les proteïnes COP/DET/FUS	25
Figura I.15	Alteració de la distribució de l'espectre energètic de la llum diürna per la vegetació	27
Figura I.16	Fisiologia de la SAS	29
Figura I.17	Model de la interacció d'hormones en la resposta de la planta a l'ombra	32

RESULTATS

Figura R.1	Canvis en l'expressió dels gens <i>ATHB2</i> i <i>ATHB4</i> als tractaments de desetioliació i SAS, i la seva correlació amb els nivells de la forma activa Pfr dels fitocroms	41
Figura R.2	Evolució de l'expressió del conjunt de gens ràpidament reprimits durant la desetioliació per llum FR	42
Figura R.3	Efecte de l'ombra simulada sobre l'expressió dels gens ràpidament reprimits durant la desetioliació per FR en tres ecotips diferents d'arabidopsis	43
Figura R.4	Efecte de diferents raons R:FR sobre l'expressió dels gens <i>PAR</i>	44
Figura R.5	Efecte d'alts nivells de phyA (AOX) i phyB (ABO) sobre l'allargament de l'hipocòtil i la inducció de l'expressió dels <i>PAR</i> per l'ombra simulada	45
Figura R.6	Efecte del phyB sobre la inducció de l'expressió dels <i>PARs</i> per l'ombra simulada	46
Figura R.7	Efecte del criptocrom HY4 sobre la inducció de l'expressió dels <i>PARs</i> per l'ombra simulada	47
Figura R.8	Esquema de l'efecte de la cicloheximida sobre la transducció del senyal lumínic	48
Figura R.9	Efecte de la CHX sobre l'activitat GUS de plàntules de la línia LhGR-N(4c) induïble per DEX	49
Figura R.10	Identificació de gens diana primaris dels fitocroms	49
Figura R.11	Exemple de tinció GUS de plàntules transgèniques T2 per a l'estudi de promotors	50
Figura R.12	Anàlisi de la regulació per ombra simulada de l'expressió del gen <i>GUS</i> sota el control de 1kb del promotor de diferents <i>PARs</i>	51
Figura R.13	Anàlisi de la regulació per ombra simulada de l'expressió del gen <i>GUS</i> sota el control de diferents fragments del promotor d' <i>ATHB2</i>	52
Figura R.14	Efecte de l'edat de les plàntules sobre la inducció de l'expressió dels <i>PARs</i> per l'ombra simulada	53

Figura R.15	Fenotip de plàntules silvestres Col-0 en resposta al tractament d'ombra simulada	54
Figura R.16	Estructura subcel·lular de plantes silvestres Col-0 en resposta al tractament d'ombra simulada	55
Figura R.17	Fenotip de plàntules de diferents espècies d'arabidopsis en resposta al tractament d'ombra simulada	56
Figura R.18	Anàlisi de l'expressió d'alguns dels gens <i>PAR</i> en resposta a l'ombra simulada en plàntules de diferents espècies d'arabidopsis	56
Figura R.19	Alineament de les seqüències de <i>PAR1</i> de 4 espècies diferents d'arabidopsis	57
Figura R.20	Efecte de COP1 sobre les respostes fisiològiques i moleculars de la SAS	58
Figura R.21	Efecte de COP1 sobre l'expressió dels gens <i>PAR</i> primaris en la desetioliació per FRc	59
Figura R.22	Efecte de HY5 sobre les respostes fisiològiques i moleculars de la SAS	60
Figura R.23	Efecte de DET1 i DET2 sobre les respostes fisiològiques i moleculars de la SAS	62
Figura R.24	Anàlisi de l'expressió de <i>PHYB</i> en resposta a l'ombra simulada	63
Figura R.25	Descripció de la hipòtesi de funcionament de la línia PBL i el seu comportament en resposta a ombra simulada	64
Figura R.26	Esquema de la mutagènesi, cribratge i anàlisi de mutants amb la resposta a l'ombra simulada alterada	65
Figura R.27	Aspecte de les plantes mutagenitzades M1 en cultiu a l'hivernacle	66
Figura R.28	Nomenclatura i nombre de possibles mutants identificats en el cribratge	67
Figura R.29	Aspecte de la línia PBL i diferents línies mutants M3 al cultivar-les a l'hivernacle	67
Figura R.30	Activitat luciferasa del mutant I2.164	68
Figura R.31	Efecte de l'ombra simulada sobre l'allargament de l'hipocòtil de plantes mutants I2.164	68
Figura R.32	Corbes de fluència en Rc i FRc del mutant I2.164 identificat en el cribratge	69
Figura R.33	Anàlisi dels nivells de proteïna PHYB per <i>western-blot</i>	70
Figura R.34	Mapatge de baixa resolució del mutant I2.164	71
Figura R.35	Representació de la regió del cromosoma 1 on es troba la mutació I2.164	72
Figura R.36	Aspecte de les plantes de sobreexpressió d' <i>ATHB2</i> i <i>ATHB4</i>	74
Figura R.37	Caracterització molecular de les línies mutants <i>athb2-1</i> i <i>athb4-1</i>	75
Figura R.38	Fenotip de plàntules mutants <i>athb2-1</i> i <i>athb4-1</i> i dobles mutants <i>athb2/athb4</i> en resposta al tractament d'ombra simulada	75
Figura R.39	Corbes de fluència en Rc i FRc del mutants <i>athb2-1</i> , <i>athb4-1</i> i del doble mutant <i>athb2athb4</i>	76
Figura R.40	Alineament de les seqüències proteiques de PAR1, PAR2 i factors de transcripció de la família bHLH	77
Figura R.41	Caracterització molecular de les línies de sobreexpressió de <i>PAR1</i>	79
Figura R.42	Fenotip de les plàntules de sobreexpressió de <i>PAR1</i> en Wc i en resposta a l'ombra simulada	80
Figura R.43	Estructura subcel·lular de plantes silvestres Col-0 i de sobreexpressió PAR1-G i PAR1-GG	81
Figura R.44	Fenotip de les plàntules de sobreexpressió de <i>PAR1</i> en resposta a la desetioliació	83
Figura R.45	Caracterització molecular de les línies PAR1-RNAi	84
Figura R.46	Fenotip de plantes PAR1-RNAi i anàlisi de la seva fertilitat	85
Figura R.47	Fenotip de les plàntules PAR1-RNAi en Wc i en resposta a l'ombra simulada	86
Figura R.48	Fenotip de les plàntules PAR1-RNAi en resposta a la desetioliació	87
Figura R.49	Anàlisi de la llargada de les arrels de plantes de sobreexpressió de PAR1 i PAR1-RNAi	88
Figura R.50	Efecte de l'aplicació de GA ₃ sobre plantes silvestres i de sobreexpressió de <i>PAR1</i>	89
Figura R.51	Nivells de les diferents GAs en plantes silvestres Col-0 i de sobreexpressió de PAR1	92
Figura R.52	Efecte de l'epibrassinòlide sobre l'allargament de l'hipocòtil de plantes mutants <i>PAR1</i>	93
Figura R.53	Efecte del brassinazol sobre l'aspecte de plantes de sobreexpressió de <i>PAR1</i>	94
Figura R.54	Efecte del 6-BAP sobre la llargada de les arrels de plantes PAR1-RNAi	94
Figura R.55	Efecte del NAA sobre la llargada de les arrels de plantes PAR1-RNAi	95
Figura R.56	Localització subcel·lular de la proteïna PAR1	96
Figura R.57	Fenotip de les plàntules P _{35S} :PAR1-GR	97

Figura R.58	Efecte d'alts nivells de PAR1 sobre la inducció de l'expressió dels <i>PARs</i> per l'ombra simulada	98
Figura R.59	Efecte de baixos nivells de PAR1 sobre la inducció de l'expressió dels <i>PARs</i> per l'ombra simulada	99
Figura R.60	Nivells d'expressió de <i>PAR1</i> en les dues mostres comparades en l'anàlisi transcriptòmica	99
Figura R.61	Gens <i>SAUR</i> diferencialment expressats en les plantes <i>PAR1-GG</i> respecte plantes silvestres identificats mitjançant anàlisi de micromatrius	100
Figura R.62	Arbre filogenètic generat pel mètode <i>Neighbor Joining</i> de les 23 proteïnes <i>SAUR</i> codificades pels <i>SAURs</i> diferencialment expressats en les plantes <i>PAR1-GG</i>	101
Figura R.63	Efecte d'alts nivells de PAR1 sobre l'expressió de <i>SAUR15</i> i <i>SAUR68</i> en un tractament d'ombra simulada	102
Figura R.64	Efecte d'alts nivells de PAR1 sobre la resposta a 2,4-D i BL de l'expressió dels gens <i>SAUR15</i> i <i>SAUR68</i>	103
Figura R.65	Expressió dels gens <i>SAUR15</i> i <i>SAUR68</i> en resposta a les 2,4-D i BL en les línies de sobreexpressió de PAR1 induïbles per DEX	104
Figura R.66	Efecte de la CHX en l'expressió de <i>SAUR15</i> i <i>SAUR68</i>	105
Figura R.67	Efecte de les auxines sobre plàntules de la línia DR5:GUS	106
Figura R.68	Efecte dels BRs sobre plàntules de la línia DR5:GUS	106
Figura R.69	Efecte de l'ombra simulada sobre les línies DR5:GUS	107
Figura R.70	Efecte de l'NPA sobre la inducció de la tinció GUS per l'ombra simulada en les línies DR5:GUS	108
DISCUSSIÓ		
Figura D.1	Esquema de l'hipotètic mecanisme d'acció de PAR1	129
MATERIALS I MÈTODES		
Figura M.1	Esquema de l'estratègia emprada per a les construccions de fusió dels promotors dels gens <i>PAR</i> als gens reporters GFP-GUS	147
Figura M.2	Esquema de la transformació de plantes d'arabidopsis i selecció de les diferents generacions de transformants	164
Figura M.3	Esquema del tractament d'ombra simulada per les anàlisis del fenotip molecular	166
Figura M.4	Esquema del tractament d'ombra simulada per les anàlisis del fenotip fisiològic	166
Figura M.5	Esquema del tractament de desetiolació per les anàlisis del fenotip molecular	167
Figura M.6	Tractament de desetiolació sota diferents intensitats de llum per als estudis de fenotip fisiològic	167

ÍNDEX DE TAULES

INTRODUCCIÓ

Taula I.I	Resum de la classificació i tipus de resposta dels diferents fitocroms	9
------------------	--	---

RESULTATS

Taula R.I	Percentatges de germinació de llavors Col-0 en presència de concentracions creixents de paclobutrazol	90
Taula R.II	Percentatges de germinació de llavors Col-0 i mutants <i>PAR1</i> en presència d'una concentració de paclobutrazol inhibidora i concentracions creixents de GA ₃	91

MATERIALS I MÈTODES

Taula M.I	Antibiòtics utilitzats en el treball amb els bacteris <i>E.coli</i> i <i>A.tumefaciens</i> i amb plantes d' <i>A. thaliana</i>	139
Taula M.II	Construccions emprades en aquest treball	144
Taula M.III	Encebadors utilitzats en aquest treball	148
Taula M.IV	Sondes radioactives utilitzades en aquest treball	157
Taula M.V	Reguladors de creixement i altres agents utilitzats en aquest treball	168

ABREVIATURES I SÍMBOLS

2,4-D	àcid 2,4-diclorfenoxiacètic	KO	ent-kaurè oxidasa
6-BAP	6-benzil amino purina	kV	kilovolt
A	adenina	LD	dia llarg
Amp	ampicil·lina	LFRs	respostes de baixa fluència
Amp^R	resistència a ampicil·lina	LUC	luciferasa
APB	motiu d'unió a phyB	m	midó
BAC	cromosoma artificial bacterià	M	molar
bHLH	basic helix-loop-helix	Mb	megabases
BL	epibrassinòlide	MET	Microscopia Electrònica de Transmissió
BRs	brassinosteroides	mg	milígrams
BRZ	brassinazol	min.	minuts
C	citocina	mL	mililitres
CaMV	Virus del mosaic de la coliflor	MO	microscopi òptic
Cb	Carbenicil·lina	MOPS	Àcid 2-(N-morfolín) etansulfònic
CDD	Complex COP1, DET1, DDB1	mRNA	RNA missatger
cDNA	DNA complementari	mV	milivolts
cGMP	monofosfat de guanosina cíclica	NAA	àcid naftalenacètic
CHX	cicloheximida	NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
CKs	citoquinines	NPA	Àcid naftiltalàmic
cm	centímetres	ng	nanograms
Cot	cotilèdons	nm	nanòmetres
cpm	comptes per minut	Nt	amino terminal
cps	comptes per segon	O/N	tota la nit
cry	criptocrom	P	promotor
CSN	COP9 signalosoma	Paclo	paclobutrazol
Ct	carboxi terminal	PAR	phytochrome rapidly regulated gene
d	dies	PAS	motiu Per-Arnt-Sim
D	fosc	PΦB	fitocromobilina
DEX	dexametasona	Pb	parells de bases
DMF	N-N-dimetilformamida	PCR	reacció en cadena de la Polimerasa
DNA	àcid desoxirribonucleic	Pfr	forma activa dels fitocroms
dNTP	desoxiribonucleotid	phot	fototropines
D.O.	Densitat òptica	Phy	fitocrom actiu
e	estoma	PHY	proteïna fitocrom
EMS	Etil metà sulfonat	PIFs	factors interactors dels fitocroms
EOD-FR	llum roja llunyana al final del dia	PMSF	fenilmetan-sulfonil floride
EOD-R	llum roja al final del dia	Pr	forma inactiva dels fitocroms
ep	epidermis	PRD	domini amb motius PAS repetits
FP	fulles primàries	PSII	fotosistema II
FR	llum roja llunyana	p/v	Relació pes/volum
FRc	llum roja llunyana contínua	R	llum roja
FT	factor de transcripció	R:FR	raó entre llum roja i llum roja llunyana
g	grana (en les imatges de MET)	Rc	llum roja contínua
g	grams	RFA	radiació fotosintèticament activa
g	força centrífuga relativa (RCF)	RNA	àcid ribonucleic
G	Guanina (en les seqüències)	RNAi	acid ribonucleic d'interferència
G	GFP	rpm	revolucions per minut
GA, GA₃	àcid gibberèl·lic	RT-PCR	Retrotranscripció per PCR
GAs	gibberel·lines	SAS	síndrome de fugida de l'ombra
GG	GUS-GFP	SAUR	Small Auxin Up-RNA
GFP	Proteïna verda fluorescent	SD	dia curt
GR	receptor de glucocorticoides	seg.	segons
GUS	β-glucoronidasa	T-DNA	DNA transferit
h	hores	Ta	temperatura
HD-Zip	Homeodomain Zip	TA	temperatura ambient
Hip	hipocòtil	UV-A	llum ultravioleta A
HIRs	respostes d'alta irradiància	UV-B	llum ultravioleta B
HKRD	domini histidin quinasa	V	volts
HLH	hèlix-volta-hèlix	VLFrs	respostes de molt baixa fluència
Hyg	higromicina	vs	versus
Hyg^R	Resistència a la higromicina	v/v	relació volum/volum
HPLC	cromatografia líquida d'alta resolució	W	llum blanca
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactòsid	Wc	llum blanca continua
Km	kanamicina	W+FR	ombra simulada
Km^R	resistència a kanamicina	%	tant per cent
kb	kilobase	λ	longitud d'ona
kDa	kilodalton	♀	femení
		♂	masculí

En les seqüències aminoacídiques:

F Phe, fenilalanina	S Ser, serina	Y Tyr, tirosina	K Lys, lisina	W Trp, triptòfan
L Leu, leucina	P Pro, prolina	H His, histidina	D Asp, aspàrtic	R Arg, arginina
I Ile, isoleucina	T Thr, treonina	Q Gln, glutamina	E Glu, glutàmic	G Gly, glicina
M Met, metionina	A Ala, alanina	N Asn, asparragina	C Cys, cisteïna	V Val, valina

1. INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. La importància de la llum per a les plantes

Com a organismes sèssils que no poden canviar l'ambient on creixen, les plantes necessiten percebre contínuament les característiques de les condicions ambientals que les envolten i, conseqüentment, respondre modificant el seu creixement i desenvolupament per adaptar-se òptimament al medi canviant. Això resulta en una gran plasticitat en el desenvolupament, que implica la integració de molts senyals ambientals, permetent a les plantes sincronitzar el seu creixement i moment de la reproducció amb els canvis diaris i transitoris, estacionals o permanents, per tal de competir efectivament amb els veïns pels recursos essencials. A més de ser la font d'energia per a la reacció de fotosíntesi, la llum és un dels senyals ambientals més importants que regulen el desenvolupament de la planta. Les plantes capten la quantitat (fluència), qualitat (longitud d'ona, λ), periodicitat (durada relativa dia:nit) i direcció de la llum i utilitzen aquesta informació per modular múltiples respostes fisiològiques, com la germinació de la llavor, la desetiolació i l'establiment de la plàntula, l'arquitectura de la planta adulta i l'inici de la reproducció, entre d'altres. Al conjunt de respostes que afecten el desenvolupament de la planta en funció de la llum se l'anomena fotomorfogènesi (Franklin i Whitelam, 2004) (**figura I.1**).

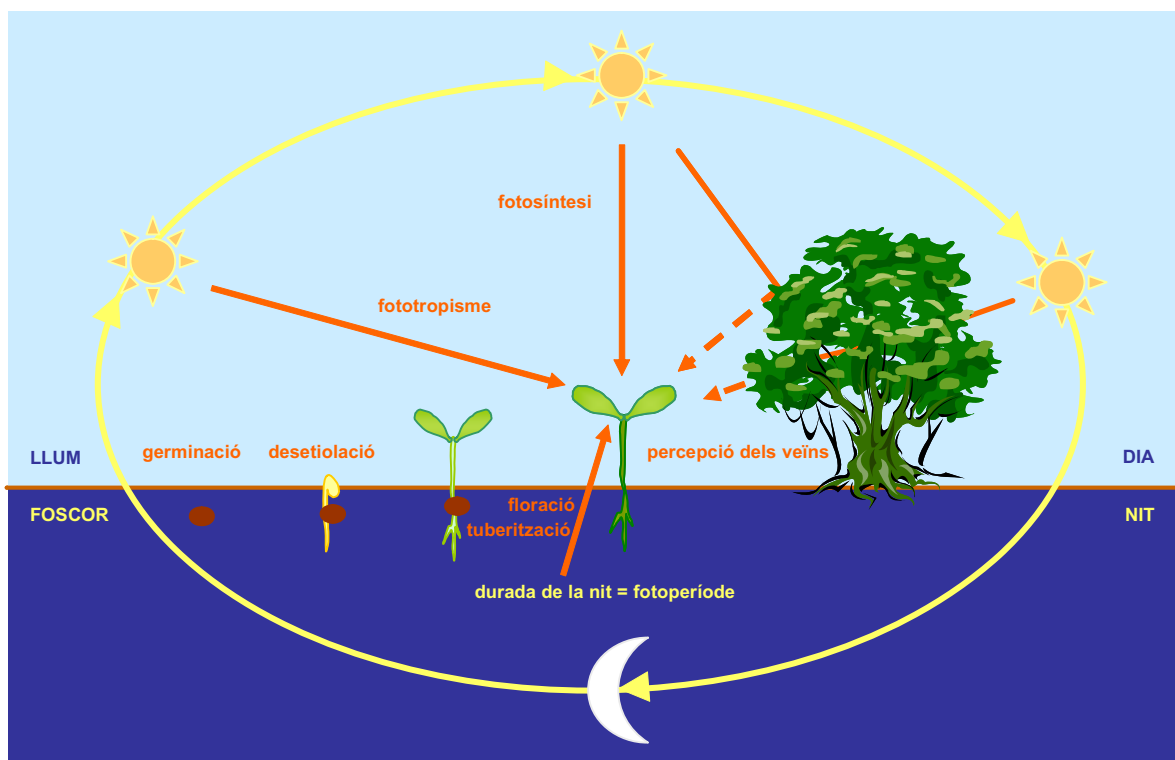
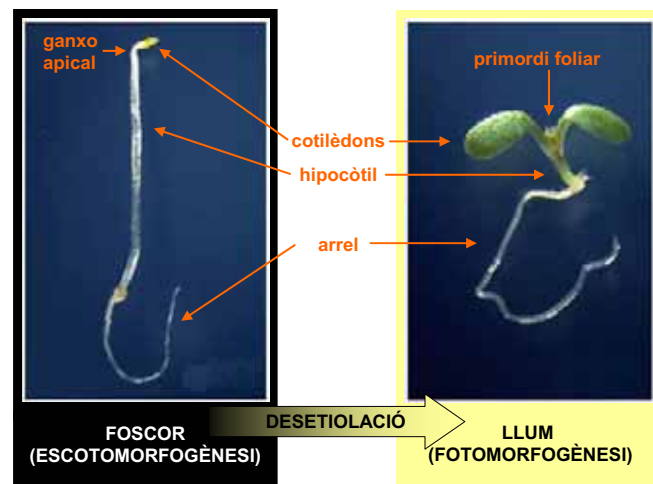


Figura I.1. Esquema de les principals respostes de les plantes a la llum durant les diferents etapes del seu cicle biològic.

2. La desetiolació

Si una planta germina a les fosques, la primera exposició de les plàntules a la llum provoca la desetiolació, el primer gran canvi en el desenvolupament vegetal (Kendrick i col., 1994; Smith, 2000). A nivell fenotípic, aquesta resposta implica un canvi del patró etiolat (hipocòtil allargat, ganxo apical tancat, cotilèdons petits i tancats que envolten el primordi foliar no desenvolupat, color groc pàl·lid) que tenen les plàntules crescudes en foscor (procés conegut com escotomorfogènesi) al patró completament diferent que mostren les plàntules crescudes en llum (inhibició del creixement de l'hipocòtil, desaparició del ganxo apical, obertura i ràpida expansió dels cotilèdons i posteriorment de les fulles, color verd) (**figura I.2**). A nivell cel·lular, aquesta resposta es manifesta en forma d'inhibició de l'allargament de les cèl·lules de l'hipocòtil, estimulació de l'expansió cel·lular als cotilèdons i inducció del desenvolupament dels cloroplasts. A nivell metabòlic, la desetiolació implica el pas de l'heterotròfia, on la plàntula obté l'energia de les reserves de la llavor, a l'autotròfia, on l'obté de la fotosíntesi. A nivell molecular, molts gens implicats en diferents aspectes d'aquesta transició en el desenvolupament s'ha demostrat que estan ràpidament regulats en resposta al senyal lumínic (Ma i col., 2001; Tepperman i col., 2001).

Figura I.2. Contrast de fenotip entre una plàntula d'arabidopsis crescuda en foscor i una altra crescuda en llum.



La resposta a la desetiolació ha estat àmpliament estudiada com a model per investigar els mecanismes primaris implicats en la captació de la llum, transducció del senyal lumínic i regulació de la transcripció. Aquests treballs s'han realitzat principalment en arabidopsis, ja que es pot manipular molt precisament la durada i el tipus de senyal inductor de la fotomorfogènesi (per exemple, diferents qualitats de llum, com es comentarà més endavant), i també perquè els fenotips etiolat i desetiolat que mostra aquesta planta són molt obvis i útils per als cribratges genètics. A més, les respostes recíproques d'expansió cel·lular que es donen a l'hipocòtil i els cotilèdons (inhibició i inducció, respectivament) pel senyal lumínic en la desetiolació suposen una important eina de diagnòstic per distingir mutants que tenen afectats passos específics de les primeres etapes de la senyalització per llum (és a dir, mutants fotomorfogènics) d'altres mutants

afectats en respostes del creixement *per se*, en els que el fenotip es veu afectat globalment, causant un nanisme o gegantisme general de la plàntula (per exemple, mutants hormonals).

3. Els diferents fotoreceptors

La radiació de la llum solar es compon de diferents longituds d'ona, que es corresponen als diferents colors de l'espectre lumínic. Per captar els diferents espectres, les plantes posseeixen diferents fotoreceptors. En les plantes superiors hi ha almenys tres famílies principals de fotoreceptors: els fitocroms (phy) que absorbeixen la llum roja (R, de l'anglès *Red*) i roja llunyana (FR, de l'anglès *Far Red*); i els criptocroms (cry) i les fototropines (phot), que absorbeixen llum UV-A i blava. També s'ha postulat l'existència de fotoreceptors de llum UV-B, tot i que la seva identitat és a hores d'ara encara desconeguda (**figura I.3**).

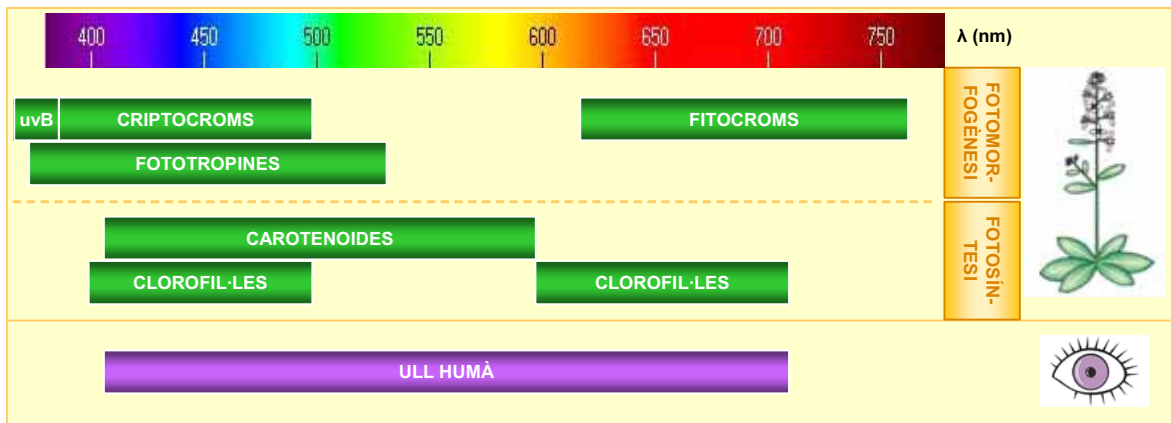


Figura I.3. Representació de l'espectre lumínic i dels fotoreceptors que capten les diferents longituds d'ona que el componen, així com el procés en el que estan implicats (fotomorfogènesi o fotosíntesi).

Els criptocroms i els fitocroms controlen el creixement i desenvolupament en resposta a la qualitat, intensitat i periodicitat de la radiació, mentre que les fototropines controlen el creixement direccional (fototropisme) i/o moviments intracel·lulars dels cloroplasts en resposta a llum (Briggs i Christie, 2002). La llum UV-B provoca respostes com la inhibició de l'allargament de l'hipocòtil i la regulació de la transcripció de multitud de gens (Kim i col., 1998). Cadascuna de les tres classes de fotoreceptors identificats consisteix en una petita família gènica que codifica proteïnes relacionades. En *Arabidopsis*, el sistema vegetal més ben caracteritzat, trobem dos criptocroms (cry1 i cry2), dos fototropines (phot1 i phot2) i cinc fitocroms (phyA, B, C, D i E). Dins de cada família, tot i la redundància, cada membre té funcions fisiològiques o fotosensores relativament diferenciades, la qual cosa proporciona un nivell addicional d'especialització (Quail, 2002a).

4. Els fitocroms

Els fitocroms són i han estat els fotoreceptors més àmpliament estudiats i caracteritzats. S'han trobat fitocroms en tots els tàxons de plantes inferiors i superiors analitzats. En plantes superiors, aquests fotoreceptors es troben en tots els òrgans de la planta. Van ser descoberts als anys 20 com un pigment diferenciat de la fotosíntesi implicat en la detecció del fotoperíode i la inducció de la floració. No va ser fins passats 30 anys quan es va determinar la naturalesa proteica d'aquests pigments. L'ús de mutants ha establert les funcions de cadascun dels membres d'aquesta família de fotoreceptors. Després de certa controvèrsia, a finals dels anys 90 es va establir la localització subcel·lular d'aquests pigments, obrint diferents hipòtesis sobre els mecanismes de transducció de senyal d'aquests fotoreceptors. També a finals d'aquesta dècada es van aïllar proteïnes relacionades amb els fitocroms de bacteris i fongs, evidenciant que no només els organismes fotosintètics disposen d'aquest tipus de fotoreceptors (Kehoe i Grossman, 1996; Karniol i col., 2005).

En les últimes dècades, estudis genètics i cribratges basats en les interaccions proteïna-proteïna han portat a la identificació de nombrosos components moleculars responsables de la transducció del seu senyal. L'arribada de les anàlisis transcriptòmiques ens ha permès saber que la llum indueix la reprogramació massiva de l'expressió gènica en la planta, i que els fitocroms són en gran part responsables del control d'aquestes xarxes transcripcionals. A més, aquest tipus d'experiments han posat de manifest les interaccions existents entre els diferents fitocroms, i dels fitocroms amb altres fotoreceptors i altres senyals ambientals en la regulació de l'expressió gènica. Fa tan sols dos anys que s'ha aconseguit la cristal·lització del domini fotosensor d'un fitocrom bacterià (Wagner i col., 2005), la qual cosa ajudarà a entendre l'evolució dels fitocroms i aportarà explicacions moleculars al comportament fisico-químic d'aquests fotoreceptors.

Així, tot i els avenços en la recerca sobre aquestes molècules i la dedicació d'una munió de grups d'investigació a l'estudi dels diferents aspectes de la regulació i acció dels fitocroms, nombroses qüestions romanen encara sense resposta.

4.1. Descripció i modes d'acció dels fitocroms

Mentre que els criptocroms i les fototropines són fotoreceptors de naturalesa flavoproteïca, els fitocroms són cromoproteïnes dimèriques solubles constituïdes per una proteïna d'uns 125 kDa unida covalentment a un cromòfor tetrapirròlic lineal.

4.1.1. Conformació dels fitocroms

Els fitocroms són sintetitzats en la forma inactiva, que presenta un màxim d'absorció de llum R (Pr, λ màxima 666 nm). Quan rep llum, aquesta forma es converteix en la forma activa, que presenta un màxim d'absorció de llum FR (Pfr, λ màxima 730 nm). La forma Pr del fitocrom es localitza al citoplasma, però ràpidament es transloca al nucli

quan es fotoconverteix a la forma Pfr. Evidències obtingudes en anàlisis fotofísiques indiquen que la conversió de Pr a Pfr causa una obertura de la conformació de la proteïna en relació amb el cromòfor, possiblement facilitant la interacció de la forma Pfr amb els seus interactors (revisat per Smith, 2000). Tot i que la forma Pfr és considerada la forma activa del fitocrom, i per tant la forma que indueix les respostes de desenvolupament, alguns autors suggereixen que la forma Pr també podria induir algunes respostes del desenvolupament, tal i com s'anirà comentant al llarg d'aquesta introducció (revisat per Neff i col., 2000) (**figura I.4**).

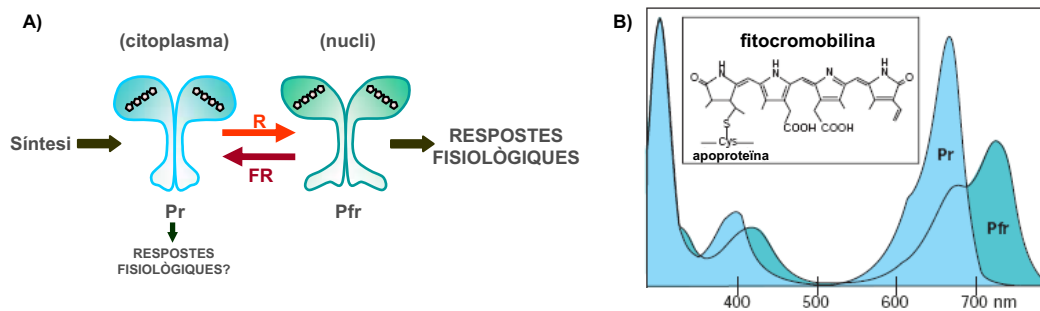


Figura I.4. Esquema de les conformacions dels fitocroms i dels seus espectres d'absorció. A, representació de les formes activa i inactiva del fitocrom i del fotoequilibri que s'estableix entre elles. **B,** espectres d'absorció de les dues formes dels fitocroms i estructura del cromòfor fitocromobilina.

4.1.2. Tipus de respostes regulades pels fitocroms

Als anys 50 el fitocrom va ser caracteritzat com el pigment que controlava la germinació de llavors d'enciam. En aquestes llavors un pols de llum R indueix la germinació, però aquesta inducció es pot inhibir exposant les llavors a un pols de FR. Les llavors es poden tractar repetidament amb llum R i FR, i la resposta final (germinació o no germinació) ve determinada per l'últim pols de llum. Aquesta resposta segueix la Llei de la Reciprocitat de Bunsen-Roscoe, que diu que una resposta ha de dependre només del total de fotons de llum rebuts, independentment de la durada de l'exposició a la font de llum. La reversibilitat i reciprocitat de les respostes R/FR és la clàssica resposta associada als fitocroms, malgrat que els fitocroms també són responsables de respostes no fotoreversibles (Mancinelli, 1994). Tot i que moltes respostes fisiològiques han estat identificades com regulades per llum R i/o FR, les plantes generalment no estan exposades a una llum monocromàtica. A la natura les plantes perceben un senyal lumínic complex (de composició qualitativa i quantitativa variable), i responen d'acord a aquest. Una mostra d'aquest tipus de resposta és la síndrome de fugida de l'ombra (o SAS, de l'anglès *Shade Avoidance Syndrome*). La SAS és l'estratègia que tenen moltes plantes per detectar aquelles plantes veïnes que podrien competir amb elles pels recursos. Aquestes respostes s'indueixen per canvis en la raó R:FR de la llum, bé per l'empobriment de llum R que té lloc sota una coberta vegetal o bé per l'enriquiment de llum FR reflectida per plantes veïnes, que conjuntament definim com canvis en la qualitat de la llum (Smith i

Whitelam, 1997). Aquestes respostes són molt semblants a les que ocorren quan les plantes reben un tractament amb llum enriquida en FR a final del dia (EOD-FR, de l'anglès *End Of Day-FR*). Tots dos tractaments provoquen una reducció en la raó R:FR, percebuda pels fitocroms de la planta i que resulta en l'allargament de les tiges i l'increment en la raó llargada-amplada de les fulles. Aquests tipus de respostes són reversibles amb tractaments equivalents amb llum R (EOD-FR vs. EOD-R o llum de baixa raó R:FR vs. alta raó R:FR), i inclouen altres com la ja comentada germinació de llavors i el control reversible de la inducció de la floració per la interrupció de la nit en plantes de dia curt. Totes elles es coneixen com a respostes de baixa fluència (*Low Fluence responses*, LFRs), i s'han descrit en molts tipus vegetals diferents. A part de les LFRs, hi ha altres dues respostes mediades pels fitocroms: les respostes de molt baixa fluència (*Very Low Fluence responses*, VLFRs), activades per intensitats de llum extremadament baixes, i les respostes d'alta irradiància (*High Irradiance Responses*, HIRs), que depenen d'exposicions prolongades a intensitats de llum relativament altes o de polsos de llum d'intensitats molt altes. Les tres respostes es distingeixen per la quantitat de llum que requereixen, essent 0.1 a 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ per a les VLFRs, 1 a 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ per a les LFRs, i més de 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ per a les HIRs. Les respostes VLFRs, com alguns canvis en l'expressió gènica induïts per llum, no són reversibles (Cerdan i col., 1997; Hamazato i col., 1997). Les respostes HIRs, com la germinació de llavors en determinades espècies vegetals, no són reversibles ni recíproques, i algunes es donen en FR suggerint una certa activitat biològica de la forma Pr del fitocrom (Neff i col., 2000).

4.1.3. Classificació dels fitocroms

Dades fisiològiques relacionades amb la varietat i complexitat de respostes induïdes pels fitocroms van suggerir l'existència de dos tipus de fitocroms: una forma fotolàbil, que tal i com el seu nom indica es degrada al estar sotmesa a la llum, i una forma fotoestable. L'existència d'aquests dos tipus de fitocroms ha estat demostrada bioquímicament, i se'ls ha anomenat fitocroms tipus I i tipus II, respectivament. Tots dos fan la fotoconversió de Pr a Pfr mitjançant llum R, però mentre que la forma Pfr dels fitocroms tipus II és estable, la dels de tipus I és inestable i és degradada ràpidament (Neff i col., 2000). Dels cinc fitocroms presents a *Arabidopsis*, el phyA pertany al tipus I (fotolàbil) mentre que els phyB a E són del tipus II (fotoestables) (**taula I.I**). Els phyA i B són els que predominen a la plàntula.

4.1.4. Accions i interaccions dels membres de la família dels fitocroms

Anàlisis filogenètiques de les seqüències dels fitocroms indiquen l'existència de quatre esdeveniments de duplicació en l'evolució dels gens dels fitocroms. La primera, que va tenir lloc al originar-se les plantes espermatòfitas (plantes amb llavor), va generar les línies PHYA/C i PHYB/D/E. Quan es van originar les plantes amb flor van donar-se dues duplicacions més, separant PHYA de PHYC i PHYB/D de PHYE. Els fitocroms PHYB i D han divergit més recentment (Mathews i Sharrock, 1997). Aquestes duplicacions han creat una família de proteïnes que detecten senyals ambientals idèntics però que utilitzen aquests

senyals per a diferents funcions. S'han assignat funcions concretes als diferents fitocroms basades en la caracterització dels seus mutants individuals. Així, es va establir que el *phyA* és el responsable exclusiu del control de la desetiolació de la plàntula sota llum FR continua (FRc). S'acumula en plàntules etiolades i els seus nivells cauen fins a 100 cops, pràcticament desapareixent, quan aquestes s'exposen a llum R o blanca (W, de l'anglès *White*), degut per una banda a la degradació de la seva forma Pfr, que depèn de llum i requereix reconeixement selectiu i ubiquitinació, i per altra a la repressió de la seva expressió gènica també per llum (Wang i Deng, 2002). En canvi, *phyB*, C, D i E intervenen en processos regulats per llum R i FR en plantes crescudes en llum (Sharrock i Quail, 1989). *PhyB* té el paper majoritari en el control de la desetiolació sota llum R continua (Rc) (Quail, 2002a; Schäfer i Bowler, 2002; Chen i col., 2004). A més, *phyB*, *phyD* i *phyE* corregulen altres respostes en plantes crescudes en llum, com les respostes de la SAS (Smith i Whitelam, 1997). La identificació més recent de mutants *phyC* ens ha permès saber que *phyC* és un receptor dèbil de llum R que modula l'acció d'altres fitocroms en una gran diversitat de respostes durant tot el cicle vital de la planta, com la desetiolació de les llavors, l'arquitectura vegetativa de la planta o la iniciació de la floració (Franklin i col., 2003a; Monte i col., 2003) (**taula I.I**).

Fitocrom	Estabilitat	Activitats fotosensores	Respostes fisiològiques
<i>phyA</i>	Fotolàbil	VLFRs FR-HIRs	Germinació de llavors (llum UV, visible, FR) Desetiolació de plàntules (FRc), Inducció de la floració (LD, dia llarg)
<i>phyB</i>	Fotoestable	LFRs R-HIRs	Germinació de llavors (Rc), Respostes de la SAS (allargament de pecíols i entrenusos, expansió dels cotilèdons, floració) Desetiolació de plàntules (Rc)
<i>phyC</i>	Fotoestable	LFRs R-HIRs	Germinació de llavors (Rc), allargament de pecíols i hipocòtils, expansió de cotilèdons i de les fulles primàries, floració Desetiolació de plàntules (Rc)
<i>phyD</i>	Fotoestable	LFRs R-HIRs	Respostes de la SAS (allargament de pecíols i entrenusos, expansió dels cotilèdons, floració) Desetiolació de plàntules (Rc)
<i>phyE</i>	Fotoestable	LFRs R-HIRs	Germinació de llavors (Rc), Respostes de la SAS (allargament de pecíols i entrenusos, expansió dels cotilèdons, floració) Desetiolació de plàntules (Rc)

Taula I.I. Resum de la classificació i tipus de resposta dels diferents fitocroms.

4.1.5. Interacció dels fitocroms amb altres fotoreceptors i senyals ambientals

Exceptuant la germinació de les llavors i la SAS, que en *arabidopsis* estan exclusivament regulats pels fitocroms (Neff i col., 2000; Chen i col., 2004), altres processos fisiològics com el desenvolupament de la plàntula o la inducció de la floració estan regulats per la interconnexió de les xarxes de transducció del senyal de criptocroms i fitocroms. Aquesta coordinació entre fitocroms i criptocroms, junt amb la coordinació que també existeix entre les funcions dels diferents fitocroms, millora la sensibilitat a les fluctuacions ambientals i permet l'ajust de les respostes del desenvolupament (Chen i col., 2004; Franklin i Whitelam, 2004).

A més, tant el gravitropisme, com el fotoperíode i la temperatura ambient modulen significativament les respostes a la llum i la interacció entre fotoreceptors. La coordinació entre la llum i el gravitropisme millora l'eficiència fotosintètica, ja que la planta disposa la seva part aèria optimitzat la captació de llum, mentre que les seves arrels creixen en la direcció que els permet una major aportació de nutrients. La coordinació entre la llum i la temperatura millora la supervivència de la planta, ja que aquesta germina i floreix en el moment òptim (Franklin i Whitelam, 2004).

4.1.6. Fitocroms bacterians

De la mateixa manera que les plantes, els bacteris també regulen constantment la seva fisiologia i comportament per respondre i adaptar-se al medi. Sovint utilitzen un sistema de "dos components", que consisteix en una proteïna sensora, que detecta els canvis en el medi exterior i li comunica aquesta informació a una proteïna reguladora de la resposta, que regularà l'expressió de gens específics o iniciarà altres funcions cel·lulars per respondre a l'estímul ambiental. La comunicació entre aquests dos components ocorre mitjançant reaccions de fosforilació-defosforilació. Se sap que les proteïnes sensores actuen com a histidin quinases, autofosforilant-se i transferint el grup fosfat a la molècula reguladora, iniciant així la cascada d'esdeveniments que modularan l'expressió gènica. Moltes de les proteïnes fotosensores bacterianes són similars als fitocroms vegetals, sobretot en el domini d'unió al cromòfor. Com ja s'ha comentat breument al introduir els fitocroms, el descobriment d'aquests fotoreceptors en bacteris va demostrar que aquestes proteïnes no són exclusives de plantes. La primera proteïna d'aquest tipus identificada fou el sensor RcaE del cianobacteri *Fremyella diplosiphon*. Després d'aquest, altres fitocroms captadors de R/FR s'han trobat en altres cianobacteris com *Synechocystis sp. PCC6803* (per exemple Cph1/CphA, Cph2, i CphB/BphP), en bacteris no fotosintètics, com *Deinococcus radiodurans*, *Pseudomonas putida* i *Pseudomonas aeruginosa* (anomenats de manera general bacteriofitocroms o BphPs) i fongs (anomenats Fphs). Aquests fitocroms bacterians també mostren la fotoreversió R/FR típica dels fitocroms vegetals (Neff i col., 2000; Wang i Deng, 2002).

4.1.7. Estructura i funció dels diferents dominis de la molècula del fitocrom

L'aïllament de mutacions de pèrdua de funció, l'expressió per transgènesi de formes mutants i truncades de fitocroms, els estudis amb holoproteïnes phyA de nombroses espècies vegetals purificades bioquímicament i la comparació amb els fitocroms bacterians van facilitar l'atribució de certes funcions a diferents dominis de la molècula de fitocrom. Aquesta consta de dos dominis estructurals principals. El domini fotosensor, a la part Nt, té estructura globular. Uneix el cromòfor lineal fitocromobilina (PΦB) a través d'una cisteïna conservada, i és suficient per l'absorció de llum i la fotoreversibilitat. La PΦB és sintetitzada als plastidis i consta de quatre anells, cadascun dels quals juga un paper diferent en la configuració del cromòfor (revisat a Wang i Deng, 2002). La cristal·lització i posterior refinament de la resolució del cristall del domini Nt del fitocrom del bacteri *D. radiodurans* unit al seu cromòfor biliverdina en la forma Pr ha confirmat el lloc exacte d'unió al cromòfor, situant altres aminoàcids claus per aquesta unió i per l'estabilitat de la regió (Wagner i col., 2005; 2007).

Una regió flexible connecta el domini fotosensor amb el domini regulador, a la part Ct, conformacionalment més lineal. Aquest domini és important per la dimerització en solució i la senyalització. Conté diferents motius conservats (identificats per diferents laboratoris i que, per tant, de vegades se solapen entre ells o s'estenen més enllà del domini Ct): el nucli regulador central (*Quail box*), el motiu de dimerització, el domini histidina quinasa (HKRD) i un parell de motius Per-Arnt-Sim (PAS) que se solapen amb la *Quail box*. La regió que comprèn els dos PAS s'anomena PRD (*PAS repeat domain*). Els dominis PAS tenen diverses funcions; poden ser usats en les interaccions proteïna-proteïna o com a mòduls resposta a petits lligands, canvis en les condicions lumíniques, nivells d'oxigen i potencials redox. S'ha vist que la majoria de mutacions puntuals en el domini PRD de phyA i phyB no afecten la fotoreversibilitat però eliminen l'activitat fisiològica, implicant-se per tant en la transferència d'informació als components bioquímics i/o cel·lulars primaris de la cadena del senyal lumínic (és a dir, en la funció reguladora dels fitocroms) (Quail, 1997; Neff i col., 2000). L'expressió per transgènesi en *Arabidopsis* de construccions amb els dominis Nt i Ct intercanviats entre phyA de civada i phyB d'arròs mostren que efectivament la funció fotosensora resideix en la meitat Nt, i la funció reguladora resideix a la meitat Ct (Wagner i col., 1996). Tot i aquests resultats, experiments on la regió Ct del phyB d'*Arabidopsis* era substituïda per dominis aliens als fitocroms però amb la capacitat de dimeritzar i dirigir la proteïna al nucli cel·lular, mostraren que aquest domini Nt "fotosensor" per sí sol és capaç d'activar totes les respostes induïdes per la proteïna phyB sencera, amb més sensibilitat fins i tot que aquesta. Això indicaria que el domini Ct del phyB no està directament implicat en la transducció del senyal, sinó que més aviat estaria atenuant l'activitat de phyB (Matsushita i col., 2003). Finalment, dir que per al phyA de civada, tant el domini Nt com el Ct han resultat necessaris per a la degradació de la forma Pfr, essent la regió Nt necessària per al

reconeixement i ubiquïtinació de la proteïna, i la regió Ct per a la posterior degradació (Clough i col., 1999) (**figura I.5**).

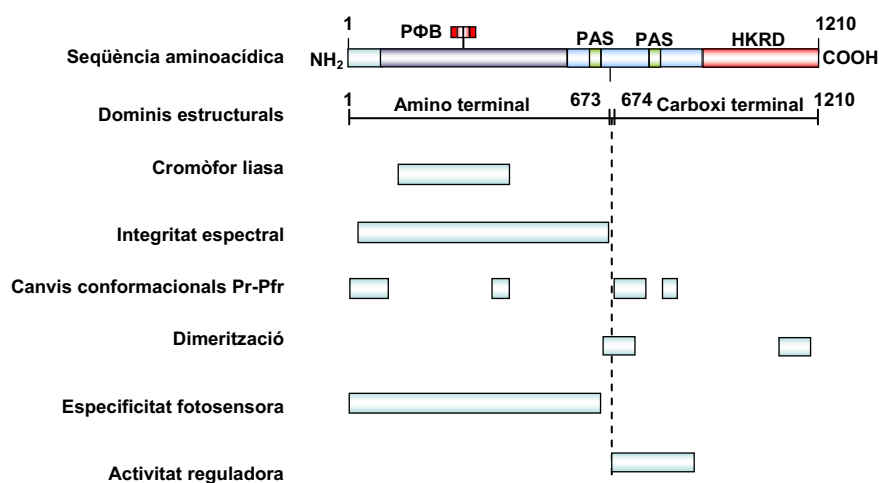


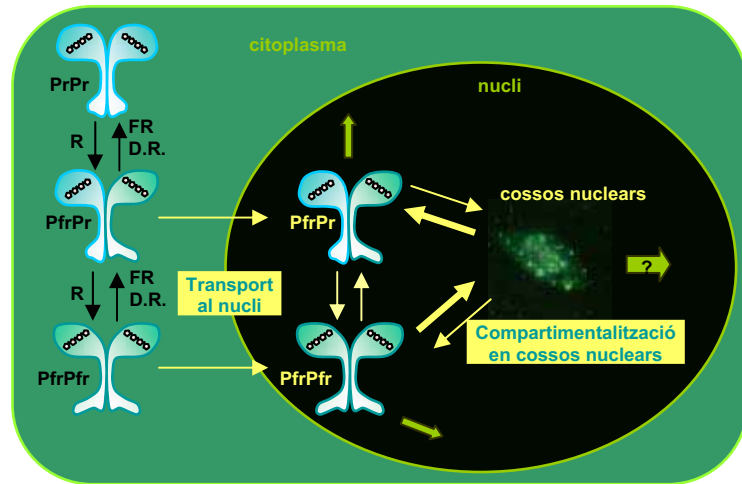
Figura I.5. Mapa molecular del fitocrom. A la part superior es mostra un diagrama esquemàtic d'una molècula de fitocrom consens. Les posicions dels extrems (1-Nt, 1210-Ct) corresponen a la seqüència de phyB, que és la més llarga dels 5 fitocroms. S'indiquen el lloc d'unió del cromòfor PΦB, els dominis PAS i el domini histidina quinasa HKRD. La línia discontinua vertical mostra la divisió en els dos dominis estructurals. Les barres inferiors indiquen la localització per a les diferents activitats, propietats o característiques de la molècula del fitocrom citades a la part esquerra.

4.2. Localització subcel·lular dels fitocroms: regulació per llum i implicacions funcionals

Des de l'inici de l'estudi dels fitocroms ha estat evident que conèixer la distribució subcel·lular d'aquests fotoreceptors seria clau per entendre el seu funcionament. Les anàlisis de localització subcel·lular s'han realitzat mitjançant fusions dels diferents fotoreceptors al gen reporter *GFP* (phy-GFP). Estudis pioners per al phyB han demostrat que aquest es transporta al nucli depenent de la qualitat i quantitat de la llum, essent un transport induït per llum R i reversible per FR (Kircher i col., 1999; Ueguchi-Tanaka i col., 2005). A més, aquest procés és saturable, amb un temps de saturació al 50% d'entre 1 a 2 hores (Kircher i col., 1999). El transport al nucli del phyB sempre va acompanyat de la formació de cossos nuclears, la qual s'atura quan l'impuls de llum desapareix, llavors la quantitat de cossos nuclears va decaient gradualment en la foscor (Kircher i col., 2002; Nagy i Schäfer, 2002; Ueguchi-Tanaka i col., 2005). A més, s'ha vist que la formació de cossos nuclears associats amb la proteïna de fusió phyB:GFP té una oscil·lació diürna (Kircher i col., 2002). La formació de cossos nuclears és una característica del fotoreceptor fisiològicament actiu, ja que les formes inactives de phyB s'acumulen en el nucli però no formen cossos nuclears. Més concretament, la localització de phyB en cossos nuclears depèn del percentatge de phyB en la forma Pfr. El transport de phyB al nucli té lloc en fluències molt baixes de llum R. En aquestes condicions, el phyB segurament es troba en

forma d'heterodímers PfrPr. La formació de cossos nuclears de phyB requereix altes fluències de R, condicions en les quals es trobarà en homodímers PfrPfr (**figura I.6**). Aquesta observació suggereix que els heterodímers PfrPr són suficients per al transport al nucli, i que els homodímers PfrPfr afavoreixen la localització en cossos nuclears (Chen i col., 2004) (**figura I.6**).

Figura I.6. Esquema de la localització subcel·lular dels fitocroms utilitzant phyB com a model. El transport al nucli requereix com a mínim una molècula Pfr en el dímer del fitocrom. Al nucli, els homodímers PfrPfr tenen més probabilitats de formar cossos nuclears. Les fletxes verdes indiquen senyalització iniciada per phyB. D.R., reversió per fosc (dark reversion).



El domini Ct de phyB conté els requeriments estructurals tant per al transport nuclear com per la localització en cossos nuclears, mentre que el domini Nt regula ambdós senyals de manera dependent de llum. Així, tant el domini Ct com el Nt contribueixen a la localització subcel·lular dels fitocroms (Nagy i Schäfer, 2000; Matsushita i col., 2003). A més, les dades obtingudes per diferents laboratoris suggereixen que la cinètica de la localització nuclear del phyB depèn d'un mecanisme de retenció. El phyB és activament retingut al citoplasma en la seva forma Pr en la foscor, i la fotoconversió Pr→Pfr mediada per llum indueix la pèrdua de retenció, que és seguida pel transport de la forma Pfr al nucli. La funció fisiològica i els mecanismes de retenció de phyB al citoplasma encara no es coneixen.

Si es considera la mida i la dinàmica dels cossos nuclears es fa difícil pensar que aquests contenen únicament phyB. Segurament es tracta de complexos transcripcionalment actius i/o complexos de degradació (Seo i col., 2003; 2004), que possiblement contenen un elevat nombre de molècules que interaccionen amb el fitocrom física o funcionalment. Per resoldre aquesta hipòtesi s'hauran de dilucidar aquestes estructures (Nagy i Schäfer, 2002).

PhyA també es transporta al nucli i forma cossos nuclears similars a phyB. La diferència és que el transport de phyA al nucli és un ordre de magnitud més ràpid que el de phyB (ocorre en qüestió de minuts), i és precedit per una formació de cossos encara més ràpida i també dependent de la llum en el citoplasma (Kircher i col., 1999). Posteriors estudis sobre la localització subcel·lular de phyC, phyD i phyE permeten concloure que els cinc fitocroms identificats a arabidopsis localitzen al citoplasma en foscor, es transporten al nucli de manera dependent de llum i allí formen cossos nuclears (Kircher i

col., 2002). Tots es transporten al nucli en la forma activa Pfr sota llum R i W, essent phyA l'únic que es transporta al nucli sota llum FRc. El phyA forma cossos nuclears minuts després de ser transportat al nucli. L'acumulació de phyB, C i E en cossos nuclears és un ordre de magnitud més lent (a les poques hores de llum W), mentre que phyD és el més lent amb una gran diferència (després de 8 hores de llum W el número de cossos nuclears és encara molt baix). Els cossos nuclears de tots els fitocroms desapareixen quan s'elimina el senyal lumínic, i en el cas de phyA també desapareixen ràpidament sota llum R i W, degut a que phyA és fotolàbil i, per tant, mostra una ràpida degradació de la forma Pfr. Per als cinc fitocroms s'ha suggerit que tant el transport com l'acumulació en cossos nuclears estan regulats pel rellotge circadiari.

Respecte als components implicats en la senyalització per fitocroms (dels quals se'n parlarà més endavant) cal destacar que tot i que la majoria es troben al nucli, alguns, com FIN219, PKS1 i PAT1, es troben exclusivament al citoplasma (Fankhauser i col., 1999; Bolle i col., 2000; Hsieh i col., 2000), mentre que altres, com FHY1, NDPK2 i SRR1 poden localitzar-se tant al nucli com al citoplasma (Choi i col., 1999; Desnos i col., 2001; Staiger i col., 2003). Això, junt amb el fet que un elevat percentatge de la forma activa dels fitocroms sempre roman al citoplasma, suggereix que aquests fotoreceptors també tenen una funció citoplasmàtica. S'ha suggerit que la fracció de phyB Pfr citoplasmàtica podria tenir un paper en la regulació de les respostes ràpides als fitocroms com fluxos d'ions a la membrana plasmàtica, l'orientació dels cloroplasts o el polarotropisme i el fototropisme (Nagy i Schäfer, 2002). Estudis farmacològics van suggerir que les proteïnes G heterotrimètriques, el cGMP (monofosfat de guanosina cíclic), el calci i la calmodulina són components primers de la senyalització dels fitocroms en el citoplasma. La implicació directa de les proteïnes G sembla haver-se descartat, però la implicació del calci ha guanyat força degut a la identificació d'una proteïna citoplasmàtica d'unió a calci, la SUB1, que modula la senyalització de phyA (revisat a Chen i col., 2004; Schepens i col., 2004).

4.3. Mecanismes de transducció del senyal lumínic

Per entendre els mecanismes de senyalització dels fitocroms, aquests s'han de considerar dins del context general de la transducció de la llum. Anàlisis transcriptòmiques recents indiquen que la llum indueix una important reprogramació de l'expressió gènica en la planta. Depenent de si una plàntula es desenvolupa en llum (fotomorfogènesi) o en foscor (escotomorfogènesi) (Ma i col., 2001; Tepperman i col., 2001), hi ha una expressió diferencial d'aproximadament un 20% dels gens. Els efectes de la llum s'estenen fins a la regulació gènica de la majoria de les rutes bioquímiques situades dins d'òrgànuls cel·lulars (Ma i col., 2001). Sembla doncs que les xarxes de la regulació de la transcripció de gens diana específics tenen un paper molt important en la transducció del senyal lumínic. Per tant, entendre la jerarquia d'aquestes xarxes formades per factors de transcripció i identificar els elements reguladors clau en els diferents processos del desenvolupament regulats per la llum resulta essencial. Més d'un fotoreceptor pot contribuir a una

determinada fotoresposta, de manera que hi ha d'haver punts d'integració del senyal procedent dels diferents fotoreceptors. A més, sovint les respostes de desenvolupament depenen d'altres factors ambientals a part de la llum (com la temperatura i la gravetat), indicant nous punts d'integració de senyals d'aquestes diferents xarxes. A aquesta complexitat, se li afegeix el fet que existeixen fotorespostes específiques d'òrgan o de moment del desenvolupament (Jiao i col., 2007).

La llum regula factors de transcripció a diferents nivells. En primer lloc, pot existir una regulació, positiva o bé negativa, a nivell transcripcional. A nivell post-traducciona, la llum pot modificar per fosforilació la capacitat de certs factors de transcripció d'unir-se a determinats promotors i/o la seva localització subcel·lular. A més, recentment s'ha demostrat la importància de la proteòlisi mediada per ubiquitina en la regulació dels nivells de certs factors de transcripció. En molts casos la llum exerceix aquesta regulació a diferents nivells sobre un mateix factor de transcripció. A més, determinades famílies de factors de transcripció tendeixen a formar dímers, la qual cosa implica multitud de combinacions, un nivell de complexitat afegit a la regulació de factors de transcripció per llum (Jiao i col., 2007).

4.4. Mecanismes d'acció dels fitocroms

En el cas concret dels fotoreceptors fitocroms, ha estat demostrat que en moltes ocasions aquests actuen mitjançant la regulació selectiva de l'expressió gènica. L'expressió de nombrosos gens, principalment els que codifiquen enzims i altres components de la maquinària fotosintètica, està regulada per llum, sovint pels fitocroms. Per altra banda, però, tal i com ja s'ha suggerit a l'apartat 4.2, algunes respostes dependents dels fitocroms s'explicarien millor assumint alteracions ràpides en els equilibris iònics inter o intracel·lulars, com ja s'ha descrit en molses, falgueres i algunes algues (Kendrick i col., 1994). Algunes respostes del creixement també ocorren en minuts, plantejant el dubte de si les xarxes de transducció que impliquen la regulació de l'expressió gènica en el nucli poden ser suficientment ràpides com per dur-les a terme. De manera que, donades les respostes que regulen, els fitocroms podrien tenir com a mínim dos mecanismes d'acció: un que opera ràpidament i reversiblement per modular el balanç iònic cel·lular, i un altre que resulta en l'expressió selectiva de gens diana.

Sobre aquest últim mecanisme s'han proposat dues hipòtesis no necessàriament incompatibles. En una, els fitocroms es consideren quinases que actuarien sobre múltiples substrats per regular diferencialment l'expressió gènica. En l'altra, els fitocroms s'unirien a un o més factors transcripcionals, dirigint la transducció del senyal cap al control selectiu de l'expressió gènica (Smith, 2000). A continuació es presenta una recopilació de les dades que recolzen cadascuna d'aquestes hipòtesis.

4.4.1. Els fitocroms com a fosfoproteïnes i quinases

Els fitocroms són fosfoproteïnes, la fosforilació de les quals podria tenir un paper regulador en la seva senyalització. En la molècula del phyA de civada hi ha dues serines que són fosforilades *in vivo*: Ser-7 i Ser-598. La Ser-7 es troba fosforilada tant en la forma Pr com en la forma Pfr, mentre que la fosforilació de la Ser-598 sembla ser específica de Pfr. *In vitro*, hi ha dues serines que són fosforilades per la proteïna quinasa A (PKA): Ser-17, fosforilada preferentment en la forma Pr, i Ser-598, en la forma Pfr. Tot i la identificació d'aquests llocs de fosforilació, no es coneix quin paper poden dur a terme en la funció primària del phyA. El que sí se sap és que mutacions que converteixen les Ser-7 i 17 en alanines incrementen l'activitat de phyA, suggerint que la fosforilació regula negativament les respostes iniciades per aquest fotoreceptor. A més, s'ha vist que la fosforilació de la Ser-598, a la regió flexible, impedeix la unió del fitocrom amb NDPK2 i PIF3, modulant així la interacció proteïna-proteïna entre el fotoreceptor i possibles factors transductors del seu senyal (Kim i col., 2005b).

L'activitat quinasa dels fitocroms es suggerí per la relativa similitud en el seu domini Ct amb proteïnes quinases procariotes amb activitat histidina quinasa. L'activitat quinasa va ser demostrada mitjançant l'obtenció de fitocroms recombinants que, no obstant la similitud amb histidines quinasa d'organismes procariotes, presentaven activitat serina/treonina quinasa sent capaços d'autofosforilar-se i transferir fosfat a altres proteïnes (Yeh i Lagarias, 1998). El lloc responsable de l'activitat quinasa del fitocrom no s'ha identificat però s'ha situat al domini Nt, al voltant de les Ser-7 i 17. El fet que, com hem vist abans, les mutacions en aquests residus resultin en una major activitat de phyA indicaria que l'autofosforilació del fitocrom i/o la seva activitat quinasa juguen un paper regulador negatiu en la senyalització per llum (Kim i col., 2005a). A més, hi ha un ecotip d'*Arabidopsis* anomenat Lm-2 que té un canvi en un aminoàcid del phyA i que presenta hiposensibilitat a FRC i baixa autofosforilació de phyA essent aquest fitocrom més estable en llum, suggerint que l'activitat quinasa de phyA podria ser important per la seva funció (Friedrichsen i col., 2002).

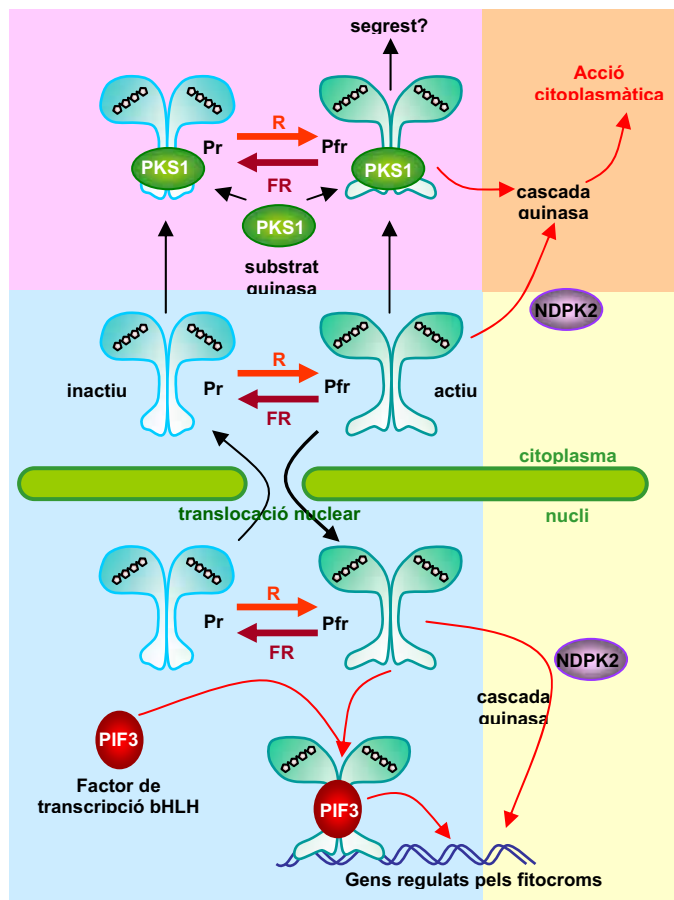
Per cribratges de doble híbrid i assaigs quinasa *in vitro* s'han identificat diferents substrats de l'activitat quinasa dels fitocroms. Totes les proteïnes que es presenten a continuació interaccionen amb diferents motius estructurals en el domini Ct dels fitocroms, i sovint aquestes interaccions són regulades diferencialment per la llum. Tot i la seva identificació, el paper que aquestes fosforilacions causen *in vivo* encara no es coneix. PKS1 (*phytochrome kinase substrate 1*) és una proteïna citoplasmàtica que és fosforilada *in vitro* pel phyA de civada. Aquesta fosforilació és dependent de llum, essent més alta amb Pfr que amb Pr. També se sap que PKS1 és fosforilada *in vivo* de manera dependent de fitocroms (Fankhauser i col., 1999). Malgrat això, no existeixen evidències de la participació de PKS1 en la senyalització de phyA *in vivo* (Quail, 2000). El que sí s'ha demostrat és que PKS1 és un regulador negatiu de la fotomorfogènesi específic de la senyalització per phyB, podent-se tractar d'un factor de retenció dels fitocroms al

citoplasma (Fankhauser i col., 1999; Fankhauser, 2000; Kim i col., 2005b). El phyA també interacciona amb una quinasa nucleòsid-difosfat (NDPK2, *nucleoside diphosphate kinase 2*), que es troba tant al nucli com al citoplasma. La fosforilació de NDPK2 és estimulada per llum R *in vivo*. NDPK2 podria actuar com a regulador de la transcripció (Zimmermann i col., 1999), tot i que la regulació de l'expressió gènica podria ser deguda al fitocrom per sí mateix (ja que com hem comentat la fosforilació del fitocrom impedeix la seva unió a NDPK2) i/o a l'activació de la NDPK2. NDPK2 ha resultat ser un regulador positiu de les vies de senyalització tant de phyA com de phyB (Choi i col., 1999).

Altres substrats de l'activitat quinasa dels fitocroms són els fotoreceptors criptocroms (CRY1 i CRY2), essent la fosforilació de cry1 estimulada per llum R (Kim i col., 2005b). Les proteïnes Aux/IAA també són fosforilades pels fitocroms. Tot i que es desconeix la rellevància funcional d'aquestes fosforilacions, podrien estar relacionades amb la degradació d'aquestes proteïnes, essent un mecanisme molecular de connexió entre les vies de senyalització de llum i auxines. Finalment, s'ha vist que els fitocroms interaccionen amb el factor de transcripció PIF3 en la transducció ràpida del seu senyal (Ni i col., 1998), i que la fosforilació del fitocrom és important per aquesta interacció (Kim i col., 2004). Manca ara per saber si el fitocrom és la quinasa que fosforila PIF3, ja que recentment s'ha descrit la ràpida degradació per llum de PIF3, i que aquesta requereix fosforilació prèvia (Al-Sady i col., 2006) (**figura I.7**).

Figura I.7. Diagrama de l'acció dels fitocroms.

Les formes inactiva (Pr) i activa (Pfr) dels fitocroms es troben en forma de dímers a la cèl·lula. La conversió Pr→Pfr iniciada per la llum provoca un canvi conformational d'obertura de la proteïna que facilita la seva unió amb proteïnes interactores. En el diagrama es mostren tres de les teories principals de l'acció dels fitocroms, tot i que la forma Pfr deu regular el desenvolupament per altres processos. Àrea rosa: Les formes Pr i Pfr interaccionen amb PKS1, substrat de l'activitat quinasa del fitocrom, al citoplasma. Aquest podria ser el primer pas d'una cascada quinasa (àrea taronja), que culmina al citoplasma. De manera alternativa, la interacció amb PKS1 podria resultar en el segrest del fitocrom al citoplasma, evitant el seu transport al nucli. Àrea groga: la forma Pfr interacciona amb NDPK2, que es localitza tant al citoplasma com al nucli. De nou, aquesta interacció pot iniciar una cascada quinasa (àrea taronja), que culmina al citoplasma i/o al nucli (àrea groga). Àrea blava: Pfr es transloca al nucli i Pr es transloca de nou al citoplasma. El gruix de les fletxes indica les diferents taxes de transport. Al nucli, Pfr s'uneix a PIF3, localitzat exclusivament al nucli. PIF3 s'uneix als promotors dels gens regulats per la llum en combinació amb Pfr i regula la seva transcripció (adaptat de Smith, 2000).

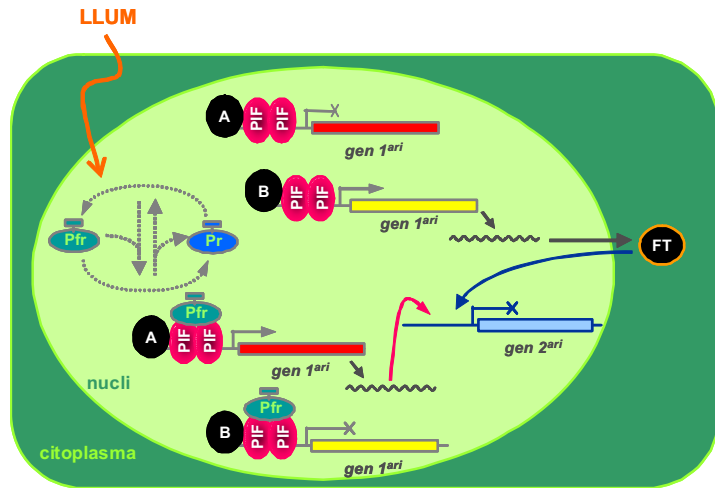


4.4.2. Els fitocroms com a reguladors de la transcripció

Independentment de si els fitocroms actuen com a fosfoproteïnes i/o quinases, es considera que aquests fotoreceptors actuen com a reguladors directes de la transcripció, tot i que, com hem vist a l'apartat 4.3, la llum a través dels fitocroms pot regular l'expressió gènica a diversos nivells. Com hem comentat a l'apartat anterior, assaigs de doble híbrid han identificat diverses proteïnes que interaccionen físicament amb phyA i phyB. Posteriorment i mitjançant tècniques de genètica reversa s'ha confirmat la importància d'alguns d'aquests interactors en la senyalització de la llum a partir dels fitocroms. El primer element identificat i el que ha estat més ben caracteritzat és PIF3 (*phytochrome interacting factor 3*), un factor de transcripció nuclear del tipus bHLH (basic Helix-loop-Helix). PIF3 es va trobar en un cribratge que utilitzava la part Ct de phyB com a esquer. S'ha vist que interacciona amb igual eficiència amb l'extrem Ct de phyA que de phyB, però que preferentment ho fa amb la proteïna phyB intacta, essent aquesta interacció dependent de llum. Així, PIF3 s'uneix preferentment a la forma Pfr del fitocrom, i la fotoconversió de la forma Pfr a la forma Pr provoca la dissociació de PIF3. Sembla doncs que PIF3 podria participar en les vies de transducció del senyal de phyA i phyB, però genèticament se li ha atribuït un paper com a regulador negatiu de la desetiolació, principalment en la via del phyB (Kim i col., 2003).

PIF3 es localitza constitutivament al nucli (Ni i col., 1998), consistentment amb la idea de pertànyer a la família bHLH de factors de transcripció. A més, se sap que PIF3 s'uneix al DNA de manera específica, reconeixent la seqüència palindròmica d'hexanucleòtids CACGTG, coneguda com a G-box (Martinez-Garcia i col., 2000). La G-box és una representació específica d'un motiu més general anomenat E-box (CANNTG), descrit com la seqüència consens a la que s'uneixen les proteïnes bHLH de sistemes no vegetals (revisat a Quail, 2000). Així, inicialment es va suggerir que determinats gens són activats quan PIF3 es troba unit alhora a les G-box de les seves regions promotores i al fitocrom actiu, pel que phyB regula directament la seva expressió a través de PIF3 (Martinez-Garcia i col., 2000). El phyB s'uneix a PIF3 unit als promotors dels gens un cop l'estímul de llum l'ha convertit en la forma Pfr, regulant la seva expressió de manera ràpida (al voltant d'una hora) i fotoreversible, ja que desapareix si aquesta és fotoconvertida a Pr. El fet que phyB pugui utilitzar PIF3 per regular directament un conjunt de gens, molts d'ells també factors de transcripció, suggereix l'existència d'una cascada de senyalització molt curta entre els fitocroms i la regulació de l'expressió gènica. En aquesta cascada de senyalització, els gens activats per factors de transcripció que interaccionen físicament amb els fitocroms seran considerats gens diana primaris o directes dels fitocroms, mentre que els gens regulats per aquests gens diana primaris rebran el nom de gens diana secundaris o indirectes dels fitocroms (**figura I.9**).

Figura I.9. Esquema de la regulació directa de la transcripció per part dels fitocroms. La forma activa del fitocrom Pfr accedeix al promotor dels gens fotoregulats diana primaris i regula la seva expressió mitjançant la unió als dímers de PIFs. Els gens diana primaris poden codificar factors de transcripció (FTs) que posteriorment regularan l'expressió de gens diana secundaris de l'acció dels fitocroms. A i B descriuen FTs necessaris per a la regulació dels gens diana primaris que no requereixen l'acció dels fitocroms.



La ràpida degradació per llum de PIF3, però, té implicacions per aquest model tan senzill (Al-Sady i col., 2006). No obstant, això no significa que aquesta sigui l'única via de transducció de senyal dels fitocroms, però sí que tant phyA com phyB, mitjançant la unió amb factors de transcripció claus, indueixen una primera onada de canvis en l'expressió gènica. Els nombrosos estudis sobre els fitocroms realitzats en el procés de la desetioliació suggereixen que la transducció del senyal lumínic en aquest procés té lloc a través d'una xarxa transcripcional complexa que es ramifica ràpidament a partir dels fitocroms (**figura I.10**).

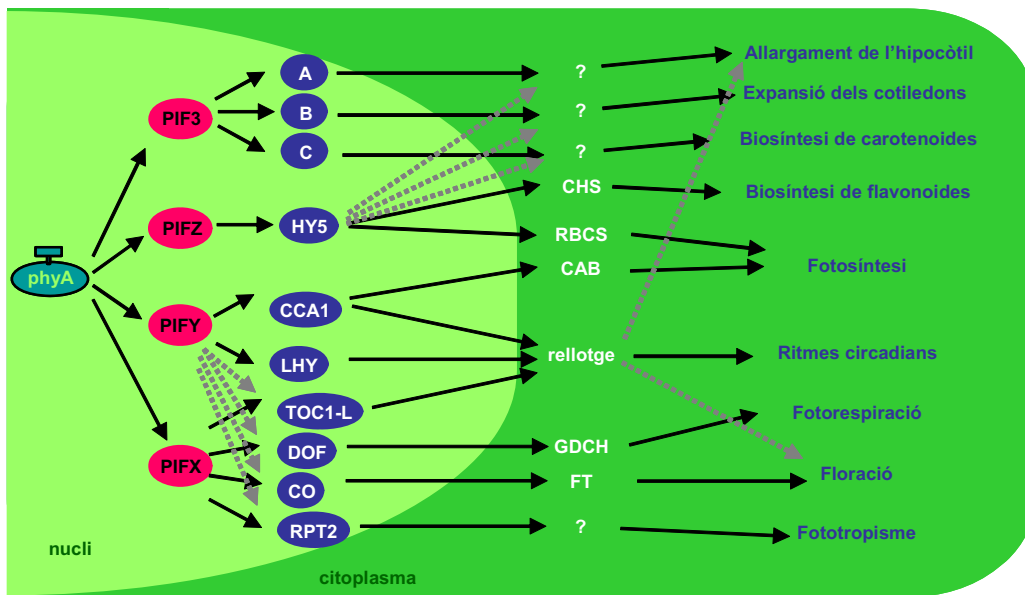
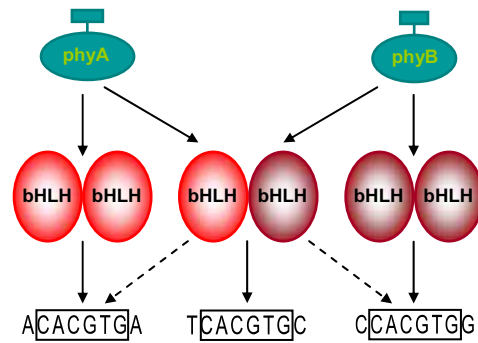


Figura I.10. Model simplificat de la transducció del senyal lumínic en la desetioliació per llum FR. Es proposa que un conjunt de gens de resposta primerenca a llum són diana primaris de la forma activa de phyA a través de reguladors constitutivament presents al nucli (PIFs). Aquests gens diana primaris codificarien factors de transcripció que regularan l'expressió d'altres gens més tardans que controlaran una o més branques de la xarxa transcripcional que regula diferents processos de la fotomorfogènesi. Les fletxes discontinües indiquen interaccions o regulacions potencials (adaptat de Quail, 2002b).

El fet que PIF3 pertanyi a una subfamília gènica de proteïnes bHLH suggereix que els fitocroms podrien regular directament una gran varietat de gens a través de la interacció amb les diferents proteïnes bHLH. Se sap que aquestes proteïnes formen homodímers i/o heterodímers amb membres de la mateixa família, la qual cosa ens fa pensar en l'ampliació de la llista de promotors que podrien ser reconeguts específicament per aquests factors (**figura I.11**).

Figura I.11. Xarxa transcripcional hipotètica generada per la combinació en homo o heterodímers de diferents membres de la família bHLH i la interacció selectiva d'aquests dímers bHLH amb els membres de la família dels fitocroms. En aquest model, phyA i phyB unirien selectivament membres de la família bHLH. Cada dímer bHLH podria reconèixer diferents promotors gènics, i l'especificitat d'aquest reconeixement vindria donada pels nucleòtids adjacents a la caixa conservada G-box (CACGTG).

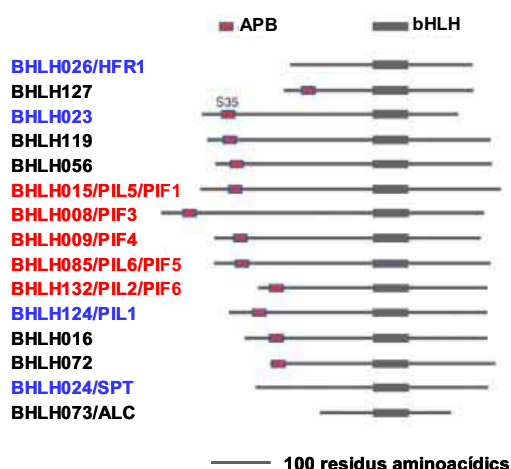


A més, a la identificació de PIF3 (Ni i col., 1998; Kim i col., 2003) li ha seguit la d'altres membres de la subfamília, coneguda com a grup VII o subfamília 15 (Heim i col., 2003; Toledo-Ortiz i col., 2003): HFR1 (Fairchild i col., 2000), PIL1 (Makino i col., 2002), PIF4 (Huq i Quail, 2002), PIL5/PIF1 (Yamashino i col., 2003; Huq i col., 2004), PIL6/PIF5 (Yamashino i col., 2003; Khanna i col., 2004) i PIL2/PIF6 (Yamashino i col., 2003; Khanna i col., 2004), tots ells implicats en la senyalització mediada pels fitocroms. Com s'observa, aquesta subfamília inclou tant PIFs (PIF1, PIF3, PIF4, PIF5 i PIF6), com PILs (PIF3-like protein), que no tenen la capacitat d'interaccionar directament amb els fitocroms (com HFR1 i PIL1), però que s'ha demostrat que heterodimeritzen amb els PIFs, possiblement modulant la seva activitat (Fairchild i col., 2000; Khanna i col., 2004). Alguns PIFs van ser primer identificats com a PILs i després s'han reanomenat com a PIFs al demostrar-se la seva interacció directa amb el fitocrom (Huq i col., 2004; Khanna i col., 2004).

El domini bHLH que defineix a la classe bHLH de factors de transcripció consta de 60 aminoàcids organitzats en dos subdominis: un domini bàsic Nt de 15-20 residus, i un domini HLH format per dues alfa hèlixs amfipàtiques separades per una regió variable de volta o llaç. El domini bàsic està implicat en la unió a DNA, mentre que el domini HLH és requerit per a la interacció proteïna-proteïna (és a dir, dimerització). Vàries subfamílies de proteïnes bHLH d'arabidopsis mostren motius conservats fora del domini bHLH, els quals podrien proporcionar capacitat addicional d'unió al DNA i especificitat i/o capacitat d'interacció amb proteïnes (Heim i col., 2003; Toledo-Ortiz i col., 2003). Per exemple, s'ha demostrat la unió *in vitro* de PIF4, PIF5 i PIF6 a la forma Pfr de phyB, mentre que PIF1 i PIF3 uneixen la forma Pfr tant de phyA com phyB (Zhu i col., 2000; Khanna i col., 2004). Totes aquestes proteïnes disposen del motiu d'unió a phyB actiu APB. PIL1 també el presenta tot i que no uneix phyB. La raó per la que aquesta unió no es produeix es

desconeix, tot i que potser altres regions de la proteïna podrien estar interferint amb el domini APB, impedit aquesta unió (**figura I.12**).

Figura I.12. Diagrames de la seqüència proteïca completa dels membres de la subfamília 15 de la família de proteïnes bHLH. A l'esquerra s'identifiquen les proteïnes amb el nom genèric, i també s'indiquen altres noms o sinònims. A la dreta es mostren els diagrames alineats en el domini bHLH. S'indica la presència del consens APB en 12 dels 15 membres que el presenten. En blau, proteïnes que no interaccionen amb phyB. En vermell, proteïnes que interaccionen específicament amb phyB. En negre, proteïnes en les que no s'ha testat la interacció. S35 indica la variant de la caixa APB de la proteïna BHLH23 que li impedeix la unió a phyB. SPT, SPATULA. ALC, ALCATRAZ.



El motiu APB s'ha demostrat necessari i suficient per la unió a phyB però no a cap altre membre de la família dels fitocroms, la qual cosa suggereix l'existència d'altres motius similars per a la unió a altres fitocroms. Recentment s'ha identificat un motiu d'unió a phyA en PIF3, al que s'ha anomenat APA (Al-Sady i col., 2006).

4.5. Intermediaris específics de la senyalització per fitocroms

La majoria dels components de la senyalització de phyA o phyB que es coneixen avui en dia han estat identificats per anàlisis genètics clàssics basats en l'estudi de la desetiolació de la plàntula sota diferents tipus de llum. Aquests cribratges han identificat dos grups principals de mutants: un grup variat, que inclou components que serien específics de la senyalització de phyA, phyB o ambdós fitocroms, i el grup de reguladors globals COP/DET/FUS.

4.5.1. Components específics de la senyalització de phyA

Els mutants afectats exclusivament en el procés de senyalització per phyA es van trobar en cribratges realitzats sota llum FRc. Així, es van identificar components com FHY1, FHY3, FIN2, SPA1, FAR1, FIN219, PAT1, EID1, HFR1, LAF1, LAF6 i FHY4 (revisat a Wang i Deng, 2002). Els mutants *fhy1*, *fhy3*, *fin2*, *fin219*, *far1*, *laf1*, *laf6* i *hfr1* mostren menys sensibilitat en FRc, indicatiu de que els respectius gens codifiquen reguladors positius de la senyalització per phyA. Els mutants *spa1* i *eid1* mostren major sensibilitat a FRc, indicant que SPA1 i EID1 són reguladors negatius. El fet que els mutants individuals de tots aquests gens mostrin només defectes parcials i en diferents graus de severitat en la desetiolació de la plàntula sota llum FR indica que hi ha certa redundància entre les funcions dels gens que codifiquen, la qual cosa suggereix que la senyalització a partir del phyA no és lineal, sinó que consta de múltiples ramificacions. Alguns d'aquests intermediaris han estat caracteritzats molecularment, però no tots. Caracteritzar-los,

determinar les interaccions proteïna-proteïna entre ells i identificar nous factors que interaccionen amb ells ajudarà a comprendre la via de senyalització de *phyA*. *HFR1*, identificat genèticament com a regulador positiu específic de la via de senyalització de *phyA* (Fairchild i col., 2000), també ha estat relacionat amb les respostes de la SAS, la qual cosa el situa també en la via de senyalització d'altres fitocroms per la regulació d'altres respostes (Sessa i col., 2005) (**figura I.13**).

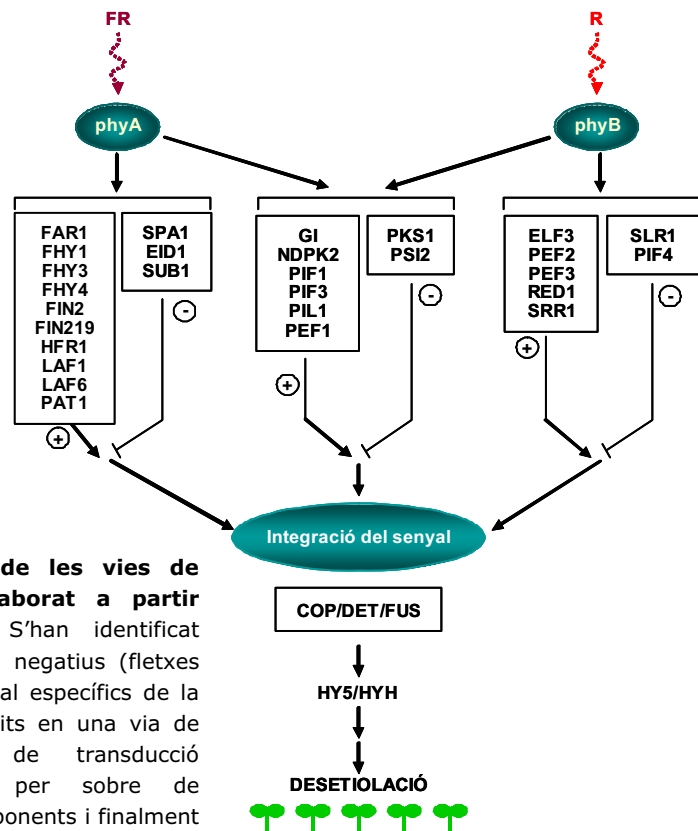


Figura I.13. Esquema simplificat de les vies de senyalització de *phyA* i *phyB* elaborat a partir d'estudis genètics i moleculars. S'han identificat components tant positius (fletxes) com negatius (fletxes bloquejades) de la transducció del senyal específics de la senyalització de *phyA*, *phyB* o compartits en una via de senyalització comuna. Les vies de transducció primerenques convergeixen en o per sobre de *COP/DET/FUS*, que regularan altres components i finalment la fotomorfogènesi. En aquesta figura no es diferencia entre els elements que ja han estat clonats i els que no.

La tecnologia de les micromatrius de DNA utilitzada en els últims anys per investigar els gens regulats per *phyA* a nivell de tot el genoma (Ma i col., 2001; Tepperman i col., 2001) ha servit per ampliar la llista de factors candidats a formar part de la senyalització de *phyA*, així com per establir jerarquies entre ells, tot i que manca encara un gran treball per comprovar l'aportació de cadascun d'aquests components al desenvolupament de la planta en resposta a la llum.

4.5.2. Components específics de la senyalització de *phyB*

També han estat identificats putatius factors específics de la via de senyalització de *phyB*. La caracterització dels mutants *red1*, *pef2*, *pef3* i *srl1* ha postulat *RED1*, *PEF2* i *PEF3* com a reguladors positius de la senyalització per *phyB*, i *SRL1* com a regulador negatiu (revisat a Wang i Deng, 2002). D'aquests, només *RED1* ha estat caracteritzat

molecularment (Hoecker i col., 2004). Amb posterioritat altres factors com ELF3, GI i SRR1 s'han identificat i caracteritzat com a reguladors positius de la senyal de phyB, connectant-la a més amb el rellotge circadiari (Huq i col., 2000; Wesley i col., 2001; Staiger i col., 2003). Recentment GI també s'ha implicat en el control de les respostes VLFR mediades per phyA de manera independent al rellotge circadiari (Luccioni i col., 2002), la qual cosa el situa també en la via de senyalització d'aquest fitocrom. En el cas de la proteïna bHLH PIF4, s'ha vist que forma part de la senyalització de phyB (Huq i Quail, 2002), de la mateixa manera que passa amb PIF1 i PIF3. Tant PIF1 com PIF3 i PIF4 participen en la desetiolació de la plàntula mediada per phyB, tot i que tenen papers diferenciats. PIF1 i PIF3 semblen actuar primerencament en la regulació de la biosíntesi de clorofil·les prevenint el dany oxidatiu causat per l'excés de precursor lliure, que pot arribar a ser letal (Kim i col., 2003; Bauer i col., 2004; Huq i col., 2004; Monte i col., 2004). PIF3 a més, participa en diferents respostes, entre elles en el control de l'allargament de l'hipocòtil sota llum Rc exclusivament (Kim i col., 2003). PIF4, en canvi, sembla estar reprimint l'expansió cel·lular a l'hipocòtil i els cotilèdons en resposta a Rc (Huq i Quail, 2002). Funcions similars es postularien per a PIF5 i PIF6, els altres membres de la seva subfamília que disposen d'un motiu actiu d'unió a phyB (Khanna i col., 2004) (**figures I.12, I.13**).

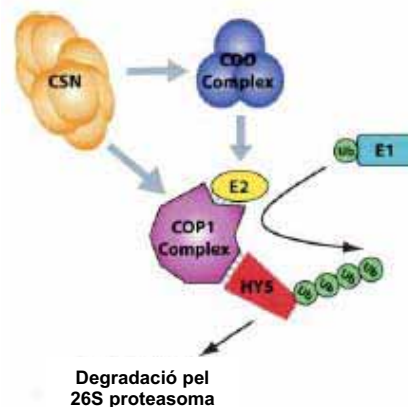
4.5.3. Components comuns de la senyalització de phyA i phyB

La identificació i clonatge de components comuns de la senyalització de phyA i phyB ajudarà a la comprensió de la integració d'aquestes dues vies en la regulació de la fotomorfogènesi. Alguns factors, com PEF1 i PSI2, encara no han estat identificats, mentre que de la funció d'altres, com PIF1, PKS1 i NDPK2 se'n té força més informació (**figura I.13**). PIF1, que interacciona amb la forma fotoactiva de phyA i phyB, participa com altres PIFs en la desetiolació de la plàntula, com ja s'ha comentat en l'apartat anterior. Pel que fa a PIF3, tot i que uneix *in vitro* tant phyA com phyB, la unió a phyB és molt més eficient. Això, junt amb el fet que PIF3 afecta l'obertura i expansió dels cotilèdons mediada per phyA i phyB però la inhibició de l'allargament de l'hipocòtil només quan aquesta és mediada per phyB, suggereix que aquest factor possiblement jugui un paper més important en la via de senyalització de phyB (Kim i col., 2003). PKS1, malgrat interaccionar amb phyA i phyB i ser fosforilat *in vivo* per phyA, s'ha descrit com a regulador negatiu de la senyalització de phyB exclusivament (Fankhauser i col., 1999). Pel que fa a PIL1, el seu mutant ha resultat ser hiposensible tant a llum Rc com a FRc, la qual cosa el situa en la via de senyalització tant de phyA com de phyB (Salter i col., 2003).

4.5.4. Components integradors de la transducció de la llum

Els estudis genètics també van identificar mutants nuls de la família de factors COP/DET/FUS, els quals tenen un fenotip constitutivament desetiolat a la foscor. Es tracta de factors que reprimeixen la fotomorfogènesi a la foscor, i la seva activitat és revertida per la llum. Els diferents factors COP, DET i FUS pertanyen a les vies de senyalització de diferents fotoreceptors (criptocroms, phyA, phyB i possiblement també la resta de fitocroms), integrant el senyal de tots ells (**figura I.13**). *COP1* codifica un repressor de la fotomorfogènesi que forma part d'un gran complex proteic i té activitat E3 lligasa respecte alguns factors de transcripció (Saijo i col., 2003; Seo i col., 2003). En plàntules cultivades en foscor, COP1 s'acumula al nucli, on interacciona amb factors de transcripció que desencadenen la desetiolació, com HY5, HYH, LAF1 i HFR1 (Holm i col., 2002; Seo i col., 2003; Duek i col., 2004), marcant-los per la degradació via proteasoma amb l'ajuda de la proteïna SPA1 i la participació de COP9 signalosoma (CSN) i COP10, una E2 que conjuga ubiquitina (Yanagawa i col., 2004). Després de la il·luminació, es donen canvis ràpids tant en l'expressió gènica (una hora després del tractament) com en l'abundància de proteïnes (dues hores després del tractament) d'aquests factors de transcripció iniciadors de la transcripció. A més llarg termini (unes quantes hores després de l'inici de la irradiació) el lent transport de COP1 fora del nucli elimina la repressió dels factors de transcripció, iniciant-se la desetiolació de la plàntula (Osterlund i col., 1999; 2000; Hardtke i col., 2000). A DET1 se li ha associat dues activitats: una remodeladora de la cromatina (Benvenuto i col., 2002), i l'altra implicada en la degradació de proteïnes via proteasoma juntament amb COP1. S'ha vist que DET1 i DDB1, un factor que interacciona amb DET1, (Schroeder i col., 2002) formen un complex amb COP10 anomenat complex CDD. DET1 és probablement necessari per a la localització nuclear i l'estabilitat d'aquest complex. CDD interacciona amb el complex que formen COP1 i alguna E2 lligasa, actuant com a potenciador de la E2 (Yanagawa i col., 2004) (**figura I.14**). Així, s'ha suggerit que, a la foscor, COP1 i DET1 actuen junts regulant la degradació mediada pel proteasoma dels factors de transcripció que promouen la fotomorfogènesi (Yanagawa i col., 2004).

Figura I.14. Model de les interaccions funcionals de les proteïnes COP/DET/FUS. A la foscor, COP9 signalosoma (CSN) interacciona directament amb el complex CDD i possiblement amb el complex COP1 per regular la seva unió i/o activitat. El complex COP1 té activitat E3 ubiquitina lligasa i, mitjançant la unió a una proteïna E2 i a HY5, facilita la transferència d'ubiquitina de la E2 a HY5. L'activitat de l'enzim E2 també és incrementada pel complex CDD, que també interacciona directament amb el complex COP1. Subsegüents rondes d'ubiquitinació porten a la poliubiquitinació de HY5 i a la seva degradació via proteasoma (adaptat de Yanagawa i col., 2004).



4.6. Desetiolació *versus* plantes cultivades en llum

Com hem vist fins ara, els nombrosos estudis sobre els fitocroms realitzats en el procés de la desetiolació suggereixen que la transducció del senyal lumínic en aquest procés té lloc a través d'una xarxa transcripcional complexa ràpidament ramificada a partir dels fitocroms (**figura I.10**). Tot i aquests estudis, hi ha una gran llacuna en la comprensió de l'acció d'aquests fotoreceptors, ja que la funció dels fitocroms en plantes crescudes en llum ha estat molt poc estudiada. Sota aquestes condicions és el phyB el més abundant, el fotoequilibri entre les formes Pfr i Pr ja està establert, els fitocroms ja estan al nucli (Kircher i col., 2002) i els nivells de COP1 són baixos (tot i que encara són suficients per modular el desenvolupament (von Arnim i col., 1997). Existeixen moltes altres diferències entre plàntules etiolades i plàntules cultivades en llum (Tepperman i col., 2001; Ma i col., 2003). Per estudiar la transducció del senyal lumínic un cop les plantes s'han desetiolat, nosaltres en hem centrat en l'estudi de la SAS, una de les respostes dependents de fitocroms que es donen en plantes cultivades en llum.

4.7. Respostes a la qualitat de la llum: la Síndrome de Fugida de l'Ombra (SAS)

Sempre que les plantes creixen pròximes, en boscos, en comunitats herbàcies, en prats o bardisses, hi ha competència per la llum. Els recursos d'energia radiant són poc estables i irregulars, i l'evolució ha dotat les plantes amb dues estratègies principals per a la supervivència en aquestes condicions ambientals. Essencialment, les plantes poden evitar l'ombra, o tolerar-la. En particular, les angiospermes (plantes amb flors) han desenvolupat una capacitat extraordinària per fugir de l'ombra, i aquesta és possiblement una de les claus del seu èxit. La SAS és una de les estratègies competitives més importants que tenen les plantes, i la seva efectivitat és indubtablement conseqüència de les múltiples respostes que té la planta ombrejada (Smith, 1982).

La distribució de l'espectre energètic de la llum diürna és molt alterat per la vegetació. Per una banda, els pigments fotosintètics clorofil·les i carotenoides absorbeixen la llum de la majoria de l'espectre visible (del blau al roig), tot i que una petita part de la llum verda és reflectida o transmesa (per això veiem les plantes verdes). La radiació FR, en canvi, és molt poc absorbida i, per tant, es transmet a capes inferiors de la planta o es reflecteix. Un paràmetre que s'utilitza per descriure l'ambient natural de llum és la raó entre la radiància fotònica de llum R respecte a la radiància fotònica de llum FR:

$$\text{Raó R:FR} = \frac{\text{radiància fotònica entre 655 i 665 nm}}{\text{radiància fotònica entre 725 i 735 nm}}$$

Així, la raó R:FR durant el dia està al voltant del 1.15 i no varia gaire durant l'any, essent molt poc afectada pel clima o la nuvolositat. Sota una coberta vegetal, la llum solar està filtrada sobretot en la part de l'espectre que va del blau al roig (**figura I.15**).

La raó R:FR en aquestes condicions es situa entre els 0.05 i 0.7, degut principalment a la reducció en el component R (Smith, 1982). La proximitat de vegetació, tot i no ombrejar la planta, també altera la raó R:FR. Les plantes pròximes reflecteixen específicament llum FR, que enriqueix la llum solar, i conseqüentment redueix també la raó R:FR, degut principalment a l'increment en el component FR (Ballaré, 1990) (**figura I.15**). Aquestes condicions s'anticipen a l'ombrejat vegetal, i produeixen respostes en la planta encaminades a sobreviure i competir per la llum, respostes observables en condicions naturals abans de que la planta sigui efectivament ombrejada (Ballaré, 1990). Aquest senyal que indica la proximitat de vegetals es fa interessant des del punt de vista de l'estudi de les respostes modulades pels fitocroms, ja que provoca respostes exclusivament fotomorfogèniques, és a dir, degudes exclusivament a un efecte de la llum com a senyal informatiu ambiental i no com a font d'energia per la fotosíntesi.

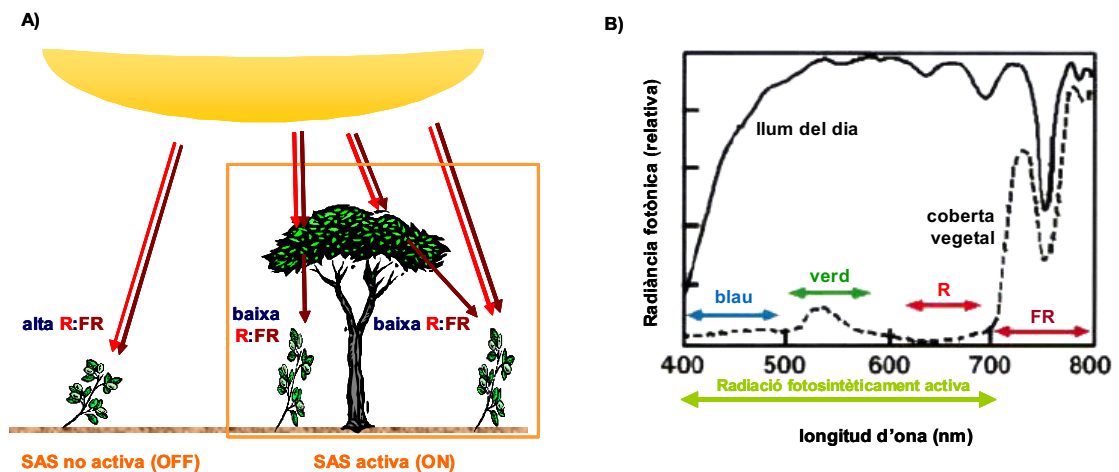


Figura I.15. Alteració de la distribució de l'espectre energètic de la llum diürna per la vegetació. **A**, representació de les condicions vegetals que alteren la raó R:FR i que activen la SAS. Quan una planta creix aïllada (esquerra) la llum del dia que li arriba li proporciona una raó R:FR alta, i la SAS no està activada. Quan una planta creix sota una coberta vegetal (al mig), rep una raó R:FR baixa degut a l'empobriment en llum R de la llum solar. Quan la planta creix amb vegetació pròxima (dreta), rep una raó R:FR baixa degut a l'enriquiment en llum FR de la llum solar. En les dues últimes situacions, la SAS s'activa. **B**, espectre energètic de la llum durant el dia i sota una coberta vegetal. Sota el gràfic es mostra la quantificació de la raó R:FR en ambdues condicions, així com la raó R:FR estimada (*) provocada per la presència de vegetació propera no ombrejant.

Condicions lumíniques	R:FR
Llum del dia (migdia)	1.13-1.17
Coberta vegetal	0.05-0.77
Proximitat vegetal	0.38-0.9*

Per a estudiar els efectes de la proximitat vegetal abans de que la planta estigui efectivament ombrejada, s'ha de variar la qualitat de la llum mantenint constant la quantitat de radiació fotosintèticament activa (RFA=400-700 nm). Això s'aconsegueix utilitzant tubs de llum W fluorescent que aporten la RFA constant, i enriquint aquesta amb FR emesa per una font quasi monocromàtica, simulant així les condicions d'ombra o

proximitat vegetal (Smith, 1982). Per comoditat, al llarg d'aquest treball a aquestes condicions les anomenarem ombra simulada.

4.7.1. Fisiologia de la SAS

Les respostes a l'ombra o proximitat vegetal són múltiples i variades, i totes elles s'inicien en resposta a un sol senyal ambiental, la reducció de la raó R:FR, captada pels fitocroms, que ocorre en comunitats vegetals molt poblades. Aquestes respostes resulten en un redireccionament dels recursos, invertint-los en el creixement en extensió dels entrenusos i els pecíols en un esforç de la planta per optimitzar la captació de la llum, en detriment del creixement de les fulles i els òrgans d'emmagatzematge de la planta. Si la reducció de la raó R:FR persisteix i la planta no és capaç de sobrepassar les plantes veïnes, es pot accelerar la floració, augmentant les possibilitats de supervivència (Franklin i Whitelam, 2005).

A la **figura I.16** es detallen els principals tipus de resposta que es donen en plantes creixent en condicions de SAS, observant-se que les respostes de la SAS són importants durant tot el cicle vital de la planta, des de la germinació a la floració i establiment de la llavor (Smith i Whitelam, 1997).

Aquest fenomen adaptatiu de les plantes als seus veïns, que en condicions naturals resulta avantatjós per a la supervivència de la planta, en monocultius d'alta densitat pot frenar la producció de fulles, fruits i llavors, el que es tradueix en una collita inferior a la que potencialment poden oferir aquelles plantes. Per tant, entendre la fisiologia dels fitocroms i el control molecular d'aquesta síndrome pot ajudar a millorar substancialment la productivitat dels conreus.

4.7.2. Paper dels fitocroms en la SAS

Per determinar la funció dels fitocroms individuals en les respostes de la SAS s'han estudiat aquestes respostes en mutants per un o més membres d'aquesta família de fotoreceptors. Els mutants *phyB* de múltiples espècies quan creixen en llum W mostren el fenotip típic de les respostes de la SAS: tiges i pecíols allargats, mida de la fulla reduïda, contingut de clorofil·les reduït i floració primerenca (Devlin i col., 1992; Lopez-Juez i col., 1992; Tian i col., 2002). Això implica que *phyB* té un paper principal en les respostes a la SAS. El fet però que aquests mutants encara mostrin algunes de les respostes de la SAS indica la participació d'altres fitocroms (Whitelam i Smith, 1991). Plantes mutants *phyD* responen a l'ombra de la mateixa manera que plantes silvestres (Aukerman i col., 1997; Devlin i col., 1999), però quan es comparen les respostes de la SAS del doble mutant *phyB/phyD* amb les del mutant simple *phyB* es veu que el doble mutant presenta pecíols més llargs i floració més primerenca, indicant redundància de funció entre *phyB* i *phyD* en la regulació de les respostes de la SAS (Devlin i col., 1999). L'obtenció del triple mutant *phyA/phyB/phyE* i l'estudi de les respostes d'aquest a tractaments d'EOD-FR (molt similars a la SAS, apartat 4.1.2 d'aquest capítol) van dur a atribuir a *phyE* les funcions d'allargament dels entrenusos de les fulles de la roseta i la floració primerenca en resposta

a aquests tractaments (Devlin i col., 1998). Per tant, sembla que phyB, phyD i phyE actuen de manera redundants en les respostes de la SAS (Franklin i col., 2003b).

Malgrat que phyA és ràpidament degradat per llum, també s'ha demostrat que juga un paper en l'allargament de l'hipocòtil en resposta a canvis en la raó R:FR. Els mutants *phyA* cultivats en baixa raó R:FR tenen hipocòtils més llargs que les plantes silvestres, indicant que phyA està reprimint l'allargament de l'hipocòtil mediat per phyB en resposta a l'ombra (Whitelam i col., 1993).

El fet que el triple mutant *phyB/phyD/phyE* no respongui a baixes raons R:FR ni a tractaments EOD-FR i que el mutant simple *phyC* o dobles i triples mutants d'aquest amb altres fitocroms no manifestin cap fenotip diferent al de plantes silvestres en resposta a baixa raó R:FR fa que es descarti un paper de phyC en les respostes de la SAS (Franklin i col., 2003a; Franklin i col., 2003b; Monte i col., 2003).

A)

PROCÉS FISIOLÒGIC	RESPOSTA A L'OMBRA (baixa R:FR)
Germinació	Retardada
Creixement en extensió/allargament	Accelerat
Allargament dels entrenusos	Ràpidament incrementat
Allargament dels pecíols	Ràpidament incrementat
Allargament de la fulla	Incrementat
Desenvolupament de la fulla	Retardat
Creixement de l'àrea de la fulla	Marginalment reduït
Gruix de la fulla	Reduït
Desenvolupament dels cloroplasts	Retardat
Síntesi de clorofil·la	Reduïda
Raó clorofil·la <i>a:b</i>	Alterada
Dominància apical	Enfortida
Ramificació	Inhibida
Fillolament (en cereals i pastures)	Inhibit
Floració	Accelerada
Taxa de floració	Molt incrementada
Establiment de la llavor	Severament reduïda
Desenvolupament del fruit	Truncat
Distribució d'assimilats	Marcadament canviada
Emmagatzematge en òrgans de reserva	Severament reduït

B)

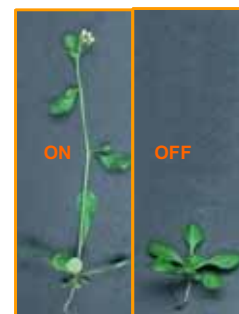


Figura I.16. Fisiologia de la SAS. **A**, taula on s'enumeren les diferents respostes fisiològiques de la SAS que tenen lloc en nombroses espècies vegetals. **B**, aspecte de plàntules (part superior) i plantes adultes (part inferior) d'*Arabidopsis* en condicions de SAS activa (esquerra, ON) o inactiva (dreta, OFF).

4.7.3. Components moleculars de la SAS

Després de la percepció de la raó R:FR pels fitocroms, la informació relativa als components que formen part del control de la SAS és força desconeguda. A l'inici d'aquesta tesi existien treballs que mostraven que l'expressió de 2 gens, *ATHB2/HAT4* (d'ara en endavant *ATHB2*) i *ATHB4*, que codifiquen per factors de transcripció d'una família de proteïnes homeobox (HD-Zip), està ràpida i reversiblement regulada per la SAS. En plàntules i plantes adultes, *ATHB2* s'expressa en nivells baixos sota llum W (raons R:FR altes), però és ràpida i fortament induït per l'ombra simulada (raons R:FR baixes), és a dir, en condicions que activen la SAS (Carabelli i col., 1993; 1996). L'expressió d'aquest gen està regulada pel phyB, a més de com a mínim un altre fitocrom fotoestable que jugaria un paper principal (Carabelli i col., 1996). L'expressió d'*ATHB4* també és induïda per ombra simulada (Carabelli i col., 1993). Mitjançant transgènesi es va demostrar que *ATHB2* afecta la morfologia de la planta durant tot el seu desenvolupament (Schena i col., 1993), i que també està implicat en la regulació de la SAS, ja que les plantes de sobreexpressió d'*ATHB2* presenten un fenotip que recorda molt a les respostes de la SAS. Aquestes plantes presenten inhibició de l'allargament dels cotilèdons (degut a la inhibició de l'allargament tant de les cèl·lules epidèrmiques com de les del mesòfil i en palissada), inducció de l'allargament de l'hipocòtil (degut a la inducció de l'allargament apical-basal de les cèl·lules epidèrmiques, corticals i endodèrmiques), inhibició la formació d'arrels laterals i també inhibició del creixement secundari dels sistema vascular tant de l'arrel com de l'hipocòtil (Steindler i col., 1999). Els autors postulen que *ATHB2* provoca tots aquests efectes redistribuint lateralment les auxines en la planta, augmentant la quantitat d'auxines transportada activament pels teixits no vasculars en detriment de la quantitat d'auxines transportades pels teixits vasculars (Steindler i col., 1999; Morelli i Ruberti, 2000). A més, en experiments *in vitro* aquests autors van demostrar que *ATHB2* actua com a regulador negatiu de l'expressió gènica en experiments d'expressió transitòria. Posteriorment s'ha demostrat que *ATHB2* reprimeix la seva pròpia expressió (Ohgishi i col., 2001).

Durant l'elaboració d'aquest treball s'han identificat dos gens més, *PIL1* i *HFR1*, l'expressió dels quals està ràpida i reversiblement regulada per l'ombra simulada. Anàlisis genètiques han demostrat que *PIL1* està implicat en les respostes del hipocòtils de plàntules joves a exposicions a ombra transitòries (Salter i col., 2003). Aquests autors també mostren com l'expressió de *PIL2*, un gen homòleg a *PIL1*, també presenta nivells de transcripció elevats en resposta a baixes raons R:FR. A més, la resposta de l'expressió de *PIL1* i *PIL2* a ombra simulada oscil·la circadiàriament. Donat que la desrepressió de *PIL2* per baixa raó R:FR és més lenta que la de *PIL1* (té lloc en unes tres hores) els autors postulen un possible paper de *PIL2* en les respostes de la SAS més tardanes.

HFR1 regula negativament les respostes de la SAS, ja que els mutants *hfr1* presenten respostes de la SAS més acusades que les plantes silvestres. En aquests mutants cultivats en baixa raó R:FR i alhora baixa RFA, l'àrea dels cotilèdons està reduïda,

els pecíols estan molt allargats, la complexitat del sistema vascular està reduïda i les plantes adultes presenten floració primerenca (Sessa i col., 2005).

Anàlisis genòmiques realitzades durant l'elaboració d'aquest treball també han identificat desenes d'altres gens regulats per l'ombra simulada (Devlin i col., 2003), suggerint que el programa de la SAS és dut a terme per la regulació pels fitocroms d'una xarxa transcripcional complexa, tal i com s'ha proposat per la desetiolació. Malgrat això, se sap molt poc sobre com la percepció de la llum pels fitocroms es tradueix en canvis en l'expressió gènica durant la SAS, quins factors cel·lulars o activitats bioquímiques hi estan implicats, i si els canvis en l'expressió gènica després de l'ombra simulada són necessaris per dur a terme els canvis morfològics i fisiològics que resulten en respostes de la SAS mesurables.

4.7.4. Paper d'altres senyals en les respostes de la SAS

A part dels canvis en la raó R:FR, la reducció en la quantitat total de llum també pot provocar les respostes de la SAS. Concretament, tant reduccions en la RFA (ja comentades) com en la llum blava, captada pels criptocroms i les fototropines, poden provocar les respostes de la SAS en cogombre i tabac. A més, plantes de tabac insensibles a etilè no responien als estímuls de la SAS, mentre que l'aplicació de baixes concentracions d'etilè induïen també en tabac respostes de la SAS, assenyalant a l'etilè com un component important en la regulació de les respostes de la SAS induïdes per llum blava. A més, donat que existeix una acumulació d'etilè en comunitats vegetals denses, aquesta hormona podria ser per sí mateixa un indicador afegit de la presència de competidors pròxims (revisat a Franklin i Whitelam, 2005).

4.7.5. Relació de les hormones amb les respostes de la SAS

Totes les hormones vegetals implicades en el creixement en llargada són candidates a participar en les respostes de la SAS. Les auxines s'han implicat en la plasticitat de tota la planta i més específicament en la curvatura fototròpica. Se sap que el fototropisme implica tant un transport d'auxines diferencial com una senyalització diferencial d'auxines (revisat a Vandebussche i col., 2005). A part d'aquesta resposta, l'allargament de la planta en resposta a una baixa raó R:FR també depèn d'auxines (Steindler i col., 1999). S'ha suggerit que el mecanisme per l'allargament depèn de la distribució lateral d'auxines a la tija i en conseqüència de la reducció del transport d'auxines cap a les arrels (Morelli i Ruberti, 2002). A més, les respostes de la SAS requereixen una senyalització intacta d'auxines (Vandebussche i col., 2003).

La baixa raó R:FR també incrementa la producció d'etilè, produint-se l'acumulació d'aquesta hormona en altes densitats vegetals. El mutant d'arabidopsis sobreproductor d'etilè *eto2* té una resposta exagerada a baixes intensitats de llum (Vandebussche i col., 2003), i tractaments amb etilè poden causar moviment de les fulles de la planta cap amunt (hiponàstia), de la mateixa manera que ho fa el tractament amb llum de baixa raó R:FR (Millenaar i col., 2005). A més, plantes transgèniques insensibles a etilè tenen reduït

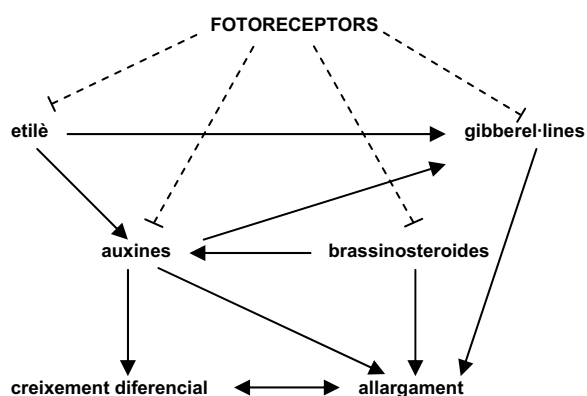
l'allargament de la tija i l'elevació de les fulles en resposta a baixa raó R:FR o a elevada densitat vegetal (Pierik i col., 2004). Els estudis relatius a aquesta hormona semblen indicar que la senyalització per etilè seria més important en la fugida de l'ombra sota una coberta vegetal on tant la quantitat com la qualitat de la llum està reduïda, més que en la detecció de plantes properes on només està tenint lloc un enriquiment en llum FR (Vandenbussche i col., 2003).

Les respostes d'allargament induïdes per la raó R:FR i per etilè són dependents d'àcid gibberèl·lic (GA). A més, el fenotip de resposta de la SAS constitutiva del mutant *phyB* es suprimeix amb la inactivació de *GA1*, un gen que codifica l'enzim que catalitza el primer pas de la biosíntesi de gibberel·lines (GAs). Depenent de l'espècie, *phyB* regula negativament la sensibilitat i/o la biosíntesi de GAs. Recentment s'ha vist que les auxines i l'etilè determinen la integritat de les proteïnes DELLA de la via de les GAs (Vriezen i col., 2004) i que l'etilè i les auxines controlen la regulació per GAs de l'allargament de les cèl·lules i la formació d'estomes a l'hipocòtil (Saibo i col., 2003), integrant així diferents vies de senyalització hormonals.

La via de senyalització dels brassinosteroides (BRs) que estimula l'allargament també és un altre factor implicat en la ja complexa regulació de les respostes de la SAS. El mutant d'*Arabidopsis* *dwf1-101*, defectiu en la biosíntesi de BRs, no té hipocòtils allargats en altes densitats vegetals (Luccioni i col., 2002). La sobreexpressió de l'enzim inactivador de BRs *BAS1* suprimeix el fenotip del mutant *phyB-4* (Neff i col., 1999). L'observació de que els BRs controlen la distribució lateral de les auxines o la senyalització per auxines en els hipocòtils fa que s'especuli sobre la connexió d'aquestes hormones amb el model de resposta a baixa raó R:FR proposat fins ara, en el que les auxines semblaven jugar un paper principal (Morelli i Ruberti, 2002). En ombra, nivells elevats de BRs podrien incrementar el transport lateral d'auxines, el que provocaria una major senyalització per auxines. De manera alternativa, els BRs i les auxines podrien estimular directament gens diana comuns (Nakamura i col., 2003; De Grauwe i col., 2005).

En resum, les dades actuals suggereixen que les GAs, les auxines, els BRs i l'etilè regulen les respostes de la SAS (**figura I.17**).

Figura I.17. Model de la interacció d'hormones en la resposta de la planta a l'ombra. L'ombra disminueix l'acció negativa (línies discontinües) dels fotoreceptors sobre la biosíntesi d'etilè, sobre els BRs actius i sobre la biosíntesi i la senyalització de les GAs actives. L'ombra també regula el transport d'auxines. Les hormones per sí mateixes també interaccionen (fletxes). Tot això resulta en un creixement diferencial de les plantes cap a la llum, allargant les tiges i els pecíols. La fletxa amb dues puntes indica un possible solapament dels components que mitjancen els canvis en el creixement diferencial i l'allargament de la part aèria de la planta.



Resulta a més molt interessant el fet que la transducció de la llum i de les hormones tenen un procés en comú fonamental: la inactivació per degradació de proteïnes marcades per ubiquïtinació, la qual cosa ha fet que alguns autors postulïn interaccions llum-hormones en el procés de degradació de proteïnes (Vandenbussche i col., 2005).

4.7.6. Interès biotecnològic de la SAS

Com ja s'ha comentat, les respostes de la SAS resulten en un redireccionament dels recursos invertint-los en el creixement en extensió dels entrenusos i els pecíols en un esforç de la planta per optimitzar la captació de la llum, en detriment del potencial de creixement de les fulles i els òrgans d'emmagatzematge de la planta, que sovint són els òrgans d'interès agronòmic. Aquest creixement longitudinal de la planta per evitar l'ombra implica processos com la divisió, expansió i diferenciació cel·lular, que depenen de complexes interaccions moleculars i cel·lulars. Per tant, la identificació dels components que connecten diferents vies de senyalització té i tindrà un impacte en la nostra habilitat per modificar cultius hortícoles i agrícoles per a la seva millora (Robson i Smith, 1997).

Als anys 90 es van obtenir diferents millores en la producció sobreexpressant diferents fitocroms en plantes d'interès agronòmic. La sobreexpressió del *PHYA* de civada en tabac transgènic, per exemple, augmentava la collita ja que algunes de les respostes de la SAS degudes a la sembra i cultiu de plantes properes no es manifestaven en aquestes plantes (Robson i col., 1996). De manera similar, la sobreexpressió de *phyB* d'*Arabidopsis* en patateres transgèniques augmentava la producció de tubercles (Thiele i col., 1999). La sobreexpressió de *phyA* de civada en àlber (*Populus alba*) híbrid resultà en plantes nanes amb una resposta reduïda a l'ombra simulada, possibilitant el cultiu de plantes properes i una major producció de fusta per àrea cultivada (Olsen, 1997).

Malgrat aquests prometedors resultats, alterar els nivells d'expressió dels fotoreceptors no és la millor manera de manipular els cultius, degut a l'elevat nombre de canvis que es produeixen en la planta, no tots ells desitjables. Per exemple, tot i que la sobreexpressió de *phyB* en patateres transgèniques augmentava la producció de tubercles, la mida dels tubercles era més petita (Thiele i col., 1999). L'àlber híbrid que sobreexpressava *phyA* havia perdut la seva capacitat d'aclimatació a temperatures fredes degut a la pèrdua de les respostes d'EOD-FR, fent que les plantes fossin més susceptibles a congelació (Olsen, 1997).

Per tant, clonar i modificar aquells gens per sota de l'acció dels fitocroms que afecten un grup de caràcters determinat permetrà desenvolupar un sistema més fi per controlar els trets de les plantes en resposta a la llum (Neff i col., 2000). En aquest sentit, la manipulació de les respostes de la SAS específicament ha esdevingut una diana per la manipulació per transgènesi (Sawers i col., 2005). La identificació dels factors interactors dels fitocroms i d'altres factors implicats en la fotomorfogènesi de les plantes resulta doncs clau per comprendre les complexes interaccions entre la senyalització dels fitocroms

i altres sistemes reguladors del desenvolupament de la planta, i manipular la producció dels conreus de manera desitjada.

2. OBJECTIUS

OBJECTIUS

Com ha quedat exposat en la introducció, la desetiolació és un procés regulat per llum per al que s'ha suggerit una xarxa transcripcional complexa de transducció del senyal lumínic gràcies a amplis estudis genètics. Aquesta xarxa es ramifica a partir del moment en què la llum és captada pels fitocroms. El nostre grup està interessat en l'estudi de la transducció del senyal lumínic un cop les plantes estan creixent en llum, i per això s'ha centrat en la síndrome de fugida de l'ombra. La nostra hipòtesi de treball es basa en què, de la mateixa manera que passa en el procés de la desetiolació, durant la SAS també hi haurà una ràpida i extensa ramificació del senyal a partir dels fitocroms. Al inici d'aquest treball, molt pocs factors implicats en aquest procés havien estat identificats.

Així doncs, partint d'aquest context, l'objectiu principal d'aquesta tesi és **disseccionar la cadena de transducció del senyal del procés conegut com a síndrome de fugida de l'ombra en *Arabidopsis thaliana***, identificant components que en formen part i analitzant la seva funció i regulació. Per a tal fi es van desenvolupar els següents objectius concrets:

1. Identificar gens regulats primerencament pels fitocroms en el procés de la síndrome de fugida de l'ombra.
2. Estudiar el paper d'elements de la transducció de la llum ja coneguts en la regulació de l'expressió dels gens *PAR*.
3. Cercar nous elements de la transducció de la llum en resposta a l'ombra, mitjançant una estratègia genètica.
4. Estudiar la funció de gens *PAR* concrets, iniciant l'estudi d'*ATHB2* i *ATHB4*, i aprofundint en l'estudi de *PAR1*.