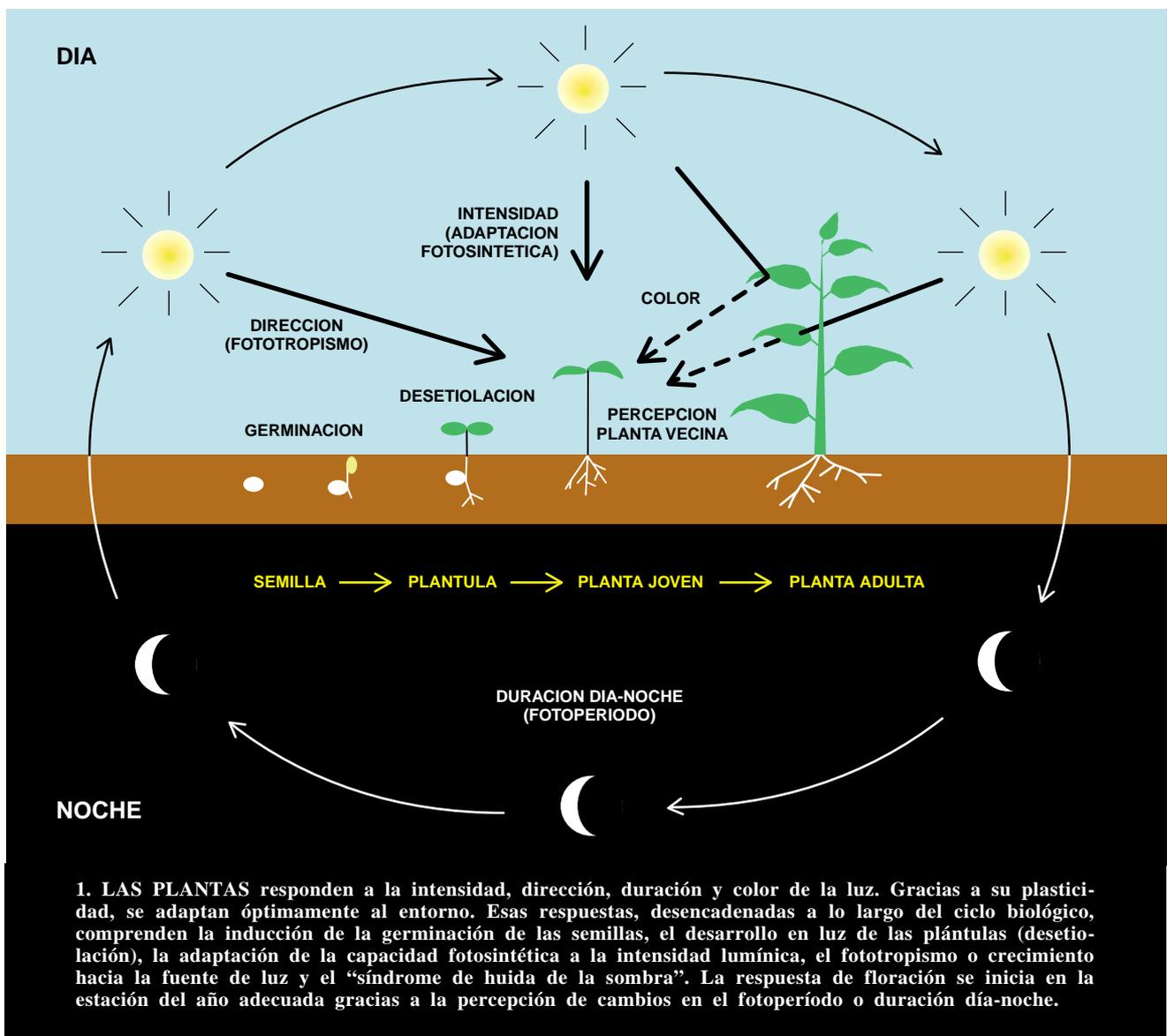


Fitocromos y desarrollo vegetal

Los fitocromos son unos pigmentos vegetales que controlan diferentes aspectos del desarrollo e informan a las plantas de los cambios operados en el entorno para optimizar su crecimiento

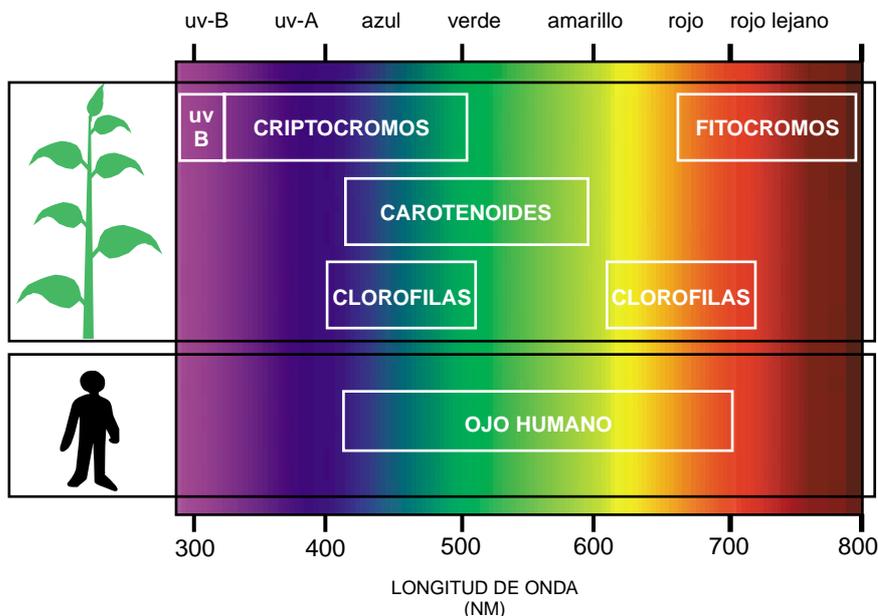
Jaime F. Martínez-García, Elena Monte y Francisco J. Ruiz Cantón



Las plantas, fijadas en el suelo, no pueden ir en busca de condiciones ambientales óptimas. El lugar donde germina la semilla determina la disponibilidad de luz, agua y nutrientes. De entre esos factores, la luz cumple un papel principal a lo largo del ciclo biológico. Sirve de carburante en la fotosíntesis, que posibilita la formación y desarrollo de hojas, tallos, raíces y flores.

La luz constituye también una fuente de información sobre el entorno. Las plantas “perciben” diferentes segmentos de su espectro de radiación, así como su intensidad, duración, periodicidad y dirección. Detectan, además, los cambios de tales propiedades experimentados en el transcurso del año y del día o en la cercanía de otras plantas. En razón de esa información las plantas adaptan sus propios procesos, desde el momento de la germinación hasta la detiolación, y el fototropismo o la floración. El conjunto de respuestas que afectan al desarrollo y aspecto de la planta en función de la luz se conoce como “fotomorfogénesis”.

¿Cómo “perciben” las plantas las características de la luz del medio? La radiación solar consta de diferentes colores, acordes con las distintas longitudes de onda en que se transmite. Para captarlos, las plantas poseen receptores especiales, los pigmentos fotosensibles o fotorreceptores. De éstos, clorofilas y carotenoides absorben la gama que va del azul al rojo, implicada en la fotosíntesis. Pero en el control de la fotomorfogénesis participan otros fotorreceptores que captan y transmiten señales de dife-



2. LA LUZ SOLAR se compone de diferentes colores, que se corresponden con luces de diferentes longitudes de onda (expresadas en nanómetros). El espectro visible al ojo humano cubre la región de 400 a 700 nm, mientras que las plantas “perciben” además las regiones del ultravioleta (uv) y del rojo lejano. Para ello están dotadas de distintos tipos de proteínas: receptores de luz uv-B (280-320 nm); criptocromos, que absorben mayoritariamente luz uv-A (320-390 nm) y azul (400-500 nm); clorofilas, que absorben luz azul y roja (600-700 nm); carotenoides, que absorben luz verde y amarilla (400-600 nm), y los fitocromos, que absorben luz roja y roja lejana (700-800 nm).

rentes regiones del espectro: el receptor de luz ultravioleta-B, los criptocromos, que captan la luz ultravioleta cercana y azul y los fitocromos, que perciben la luz roja y roja lejana.

Los fitocromos se descubrieron en los años cincuenta en el marco de una investigación sobre el efecto de la luz en la germinación de las semillas de lechuga. Se observó que no llegaban al 20% las semillas que germinaban en oscuridad; por contra, el porcentaje de germinación era máximo cuando irradiaban las semillas con un pulso de luz roja (R). Se halló, además, que la irradiación subsiguiente con un pulso de luz roja lejana (RL) anulaba el efecto inductor de la luz roja, evitando la germinación. Las irradiaciones alternas con luz R y RL (R, R + RL, R + RL + R, R + RL + R + RL, etcétera) pusieron de manifiesto que el último color aplicado determinaba la germinación de las semillas, y que la luz roja constituía el factor estimulante del proceso y, su inhibidor, la luz roja lejana.

En busca de una explicación de tales fenómenos se propuso la existencia de un pigmento, al que llama-

ron fitocromo, que absorbía la luz roja. El fitocromo en cuestión, tras absorber luz roja, se convertía en una forma capaz de absorber radiación roja lejana; forma que tornaba a su condición inicial tras realizar dicha absorción. La hipótesis halló respaldo experimental a principios de los años sesenta con la purificación, a partir de extractos de plántulas de cereales, de una proteína dotada de las características predichas. Los fitocromos son proteínas solubles que se encuentran en las semillas, hojas, tallos, raíces y demás órganos de la planta.

Aparecen en dos configuraciones intercambiables, denominadas Pr y Pfr. De la absorción de la luz roja se encarga la forma Pr; de la radiación roja lejana, la forma Pfr. Puesto que en los procesos fisiológicos la luz roja tiene un efecto activador y la roja lejana un efecto inhibitor, Pfr se considera la forma biológicamente activa del fitocromo y Pr, la inactiva. Esta última se aloja en el citoplasma, mientras que la forma activa (Pfr) se localiza preferentemente en el núcleo celular.

Por tratarse de moléculas receptoras, los fitocromos cumplen dos fun-

JAIME F. MARTINEZ GARCIA, ELENA MONTE COLLADO y FRANCISCO J. RUIZ CANTON trabajan desde hace varios años en pigmentos vegetales. Martínez, actualmente en el Instituto de Biología Molecular de Barcelona, estudió en la Universidad de Valencia y completó su formación en el Instituto John Innes de Norwich y en el Centro de Expresión Génica de Plantas (PGEC) de Albany. Monte, que trabaja en esta última institución, se formó en la Universidad Autónoma de Barcelona. Ruiz, que también pasó por el PGEC de Albany, trabaja en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga.

ciones, una sensora y otra reguladora. La función sensora implica la percepción de la señal luminosa incidente. Compete a la función reguladora transferir la información recibida a los componentes de la cadena de transducción de la señal, encargada de transmitir la información cap-

tada a otros componentes celulares. En la naturaleza, donde la luz es policromática, los fitocromos operan a la manera de interruptores moleculares, que informan a la planta de la presencia y los cambios en las proporciones relativas de luz roja y de roja lejana del ambiente, para que

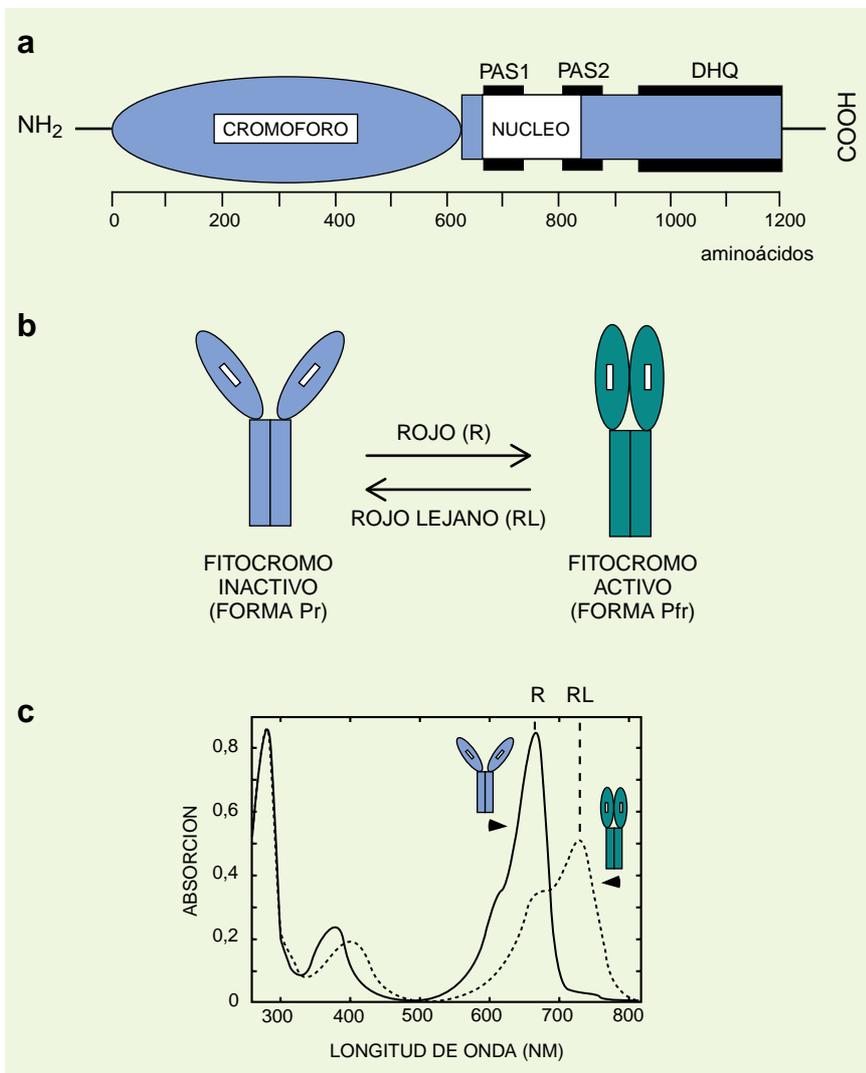
acometa las respuestas fisiológicas oportunas.

Los fitocromos intervienen en el ciclo biológico de la planta, desde la germinación a la floración y tuberización, pasando por la desetiación de las plántulas y el alargamiento de tallo y entrenudos. Según la cantidad y duración de irradiación requeridas para inducir esos procesos en condiciones controladas de laboratorio, se han clasificado las respuestas en tres tipos: respuestas de baja fluencia (RBF), respuestas de muy baja fluencia (RMBF) y respuestas de alta irradiancia (RAI).

Las respuestas de baja fluencia vienen inducidas por pulsos breves de luz roja; se anulan si se suministra un subsiguiente pulso de luz roja lejana. Son las que inicialmente identificaron procesos controlados por fitocromos, como la germinación. Para desencadenar una respuesta de muy baja fluencia bastan cantidades exiguas de cualquier longitud de onda entre 300 y 780 nm. Ocurre así en la expresión de los genes *LHC*, que cifran proteínas del aparato fotosintético que unen clorofilas. Por fin, las respuestas de alta irradiancia se presentan ante una irradiación de intensidad moderada o elevada y continuada de luz R (Rc) o RL (RLc). El ejemplo mejor estudiado de este tipo de respuesta es el proceso de desetiación, que consiste en el conjunto de cambios en el desarrollo de plántulas germinadas en oscuridad cuando se exponen a la luz.

La naturaleza fotorreversible de la molécula de fitocromo explica las respuestas RBF, emitidas ante un pulso de luz roja y anulables si, tras éste, se suministra un pulso de luz roja lejana. Las respuestas RMBF y RAI, que no revierten nunca, pueden iniciarse por luz roja lejana, un pulso en el caso de RMBF o irradiación continua en el caso de respuestas de alta irradiancia. El efecto inductor de la luz RL se explica en parte por el solapamiento de los espectros de absorción de las formas Pr y Pfr de los fitocromos, que implica la existencia de forma activa (Pfr) incluso tras irradiación con luz RL.

Los fitocromos pueden regular un proceso fisiológico a través de diversos modos de acción. La desetiación presenta un componente de RBF y otro de RAI, la inducción de los genes *LHC* muestran un componente de RMBF y otro de RBF y la germinación de *Arabidopsis* se apoya



3. LOS FITOCROMOS son proteínas solubles y constituidas por dos subunidades idénticas de unos 1200 aminoácidos y 125 kilodalton de masa molecular. Cada subunidad consta de un dominio amino terminal, globular, al que se une un cromóforo responsable de la absorción de la luz, y de un dominio carboxilo terminal, implicado en la dimerización y en la función reguladora del fitocromo. En el dominio carboxilo distinguimos el "núcleo", de interés en la transmisión de la información ambiental percibida, las regiones PAS1 y PAS2, implicadas quizás en interacciones entre proteínas, y la región DHQ, que debe su nombre a la semejanza que guarda con los dominios histidina quinasa. El dímero de fitocromo existe en dos formas fotoconvertibles: Pr, que absorbe luz roja, y Pfr, que absorbe luz roja lejana. Los fitocromos se sintetizan en la forma inactiva Pr; la absorción de luz roja produce un cambio reversible en la conformación de la proteína (acercamiento entre los extremos globulares de las dos subunidades del dímero) que la convierte a la forma activa Pfr. Esta última forma puede inactivarse y volver a la conformación Pr por la absorción de luz roja lejana. Los espectros de absorción de Pr y Pfr se solapan en buena parte, lo que significa que la forma activa Pfr coexiste siempre con la inactiva Pr en un fotoequilibrio que se establece en función de la proporción relativa de luz roja y roja lejana de la irradiación incidente.

en un triple componente de RMBF, RBF y RAI.

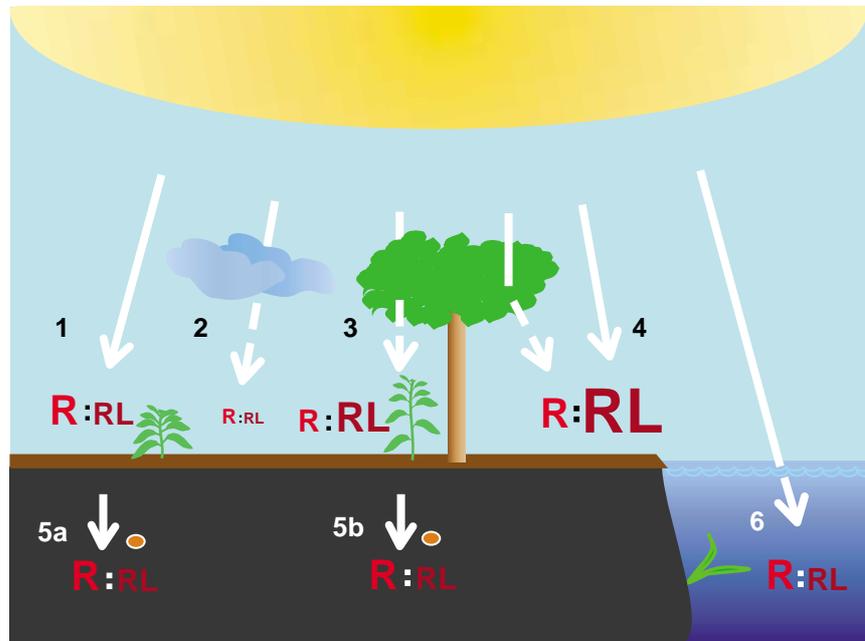
La variedad y complejidad de respuestas fisiológicas mediadas por luz roja y roja lejana sugirieron la posibilidad de que hubiera más de un tipo de fitocromo implicado en su regulación. A tenor de la investigación fisiológica, ciertas respuestas aparecían sometidas al control de un fitocromo fotolábil, que se degradaba tras la exposición a luz, y otras sujetas a un fitocromo fotoestable, que no se degrada tras la exposición.

Se agregaban a esos resultados los datos bioquímicos e inmunitarios que apoyaban la existencia de dos especies moleculares de fitocromos, los de tipo I y tipo II. Ambos fitocromos se convertían a la forma activa al absorber luz roja, pero diferían en la estabilidad *in vivo* tras la exposición; y así, la forma Pfr (activa) del tipo II era estable, y la forma Pfr del tipo I inestable al degradarse rápidamente.

La confirmación definitiva de la existencia de fitocromos diferentes vino con la identificación de los ADN complementarios (ADNc, es decir, ADN transcrito a partir del ARN mensajero) que cifraban tales proteínas en una misma especie vegetal. Estas secuencias de ADNc sirvieron luego para aislar los correspondientes genes. Así, en *Arabidopsis thaliana* se aislaron hasta cinco genes distintos para los fitocromos A, B, C, D y E. Cuando se comparó la secuencia aminoacídica de esas cinco proteínas se observó que sólo un 50 % de los aminoácidos de la proteína son iguales, excepto los fitocromos B y D, que comparten un 80 % de la secuencia de aminoácidos.

Del cotejo entre la secuencia de una porción del fitocromo de tipo I y las secuencias traducidas de ADNc de los genes identificados en diferentes especies se desprendía que el fitocromo A era el único de tipo I. Siguiendo un método similar, se vio que el fitocromo B era de tipo II. Los análisis de la abundancia relativa de los distintos fitocromos mostraron que los A y B constituían las formas predominantes en la plántula.

El fitocromo A se acumula en plántulas etioladas, para decaer de inmediato tras la exposición a luz roja o blanca, debido a la fotolabilidad de la forma activa de la proteína y también a una represión coordinada de la expresión de su gen. En plántulas crecidas en luz y en plantas adultas, los niveles de fitocromo A



4. RAZON ENTRE LUZ ROJA Y ROJA LEJANA. Esa proporción percibida por las plantas, simbolizada por la expresión R:RL, constituye un índice de la densidad y la proximidad de vegetación. Esta razón establece un fotoequilibrio entre las formas Pr y Prf de los fitocromos. En la radiación solar directa, R:RL es constante, con valores entre 1,05 y 1,25 (1). Las condiciones climáticas apenas alteran la relación, aunque en un día muy nublado la intensidad total se puede reducir hasta 10 veces (2). Ante ciertas condiciones ecológicas sí varía la relación R:RL. Los pigmentos fotosintéticos de las plantas (clorofilas y carotenoides) absorben luz de casi todo el espectro visible, mientras que son casi transparentes al rojo lejano. Por eso, en la zona de sombra vegetal la relación R:RL disminuye hasta valores entre 0,05 y 0,15 (3). Parte del rojo lejano incidente se refleja, con la caída consiguiente de la razón en R:RL captada por las plantas vecinas (4). La relación R:RL de la luz que se filtra informa a la semilla enterrada o a la plántula emergente de las condiciones en la superficie (5a, 5b). Asimismo, un incremento de la relación R:RL puede informar a las plantas acuáticas de la profundidad a que se hallan, ya que el agua absorbe luz roja lejana (6).

son muy bajos; de los fitocromos restantes, predomina el B.

El efecto dispar que la luz ejercía sobre la concentración relativa de los fitocromos A-E respaldaba la hipótesis de la singularidad funcional de éstos. Cada fotorreceptor desempeñaba una función propia en la regulación del desarrollo. La fotolabilidad del fitocromo A sugiere que intervendría en las transiciones de oscuridad a luz, como las que ocurren durante la germinación de la semilla bajo tierra o en los ciclos noche-día, mientras que los fitocromos fotoestables participarían en los procesos regulados por luz roja y roja lejana, en las plantas crecidas en luz.

Para obtener pruebas más sólidas de la peculiaridad funcional se inició la búsqueda, identificación y análisis de mutantes carentes de un fitocromo concreto. Se trabajó con *Arabidopsis thaliana*, angiosperma ideal para la experimentación, pues su genoma consta de sólo 100 me-

gabases, desarrolla un ciclo biológico de un mes apenas y alcanza un tamaño pequeño.

La investigación se centró en la longitud del hipocótilo, un carácter simple y fácil de observar, cuyo alargamiento se inhibe con la luz. Las plántulas mutantes que carecieran de algún fitocromo deberían manifestar una menor respuesta (o hiposensibilidad) a la luz; se las identificaría en seguida por ser más largas que las no mutantes si crecían en un medio de irradiación continua con luz blanca, roja o roja lejana.

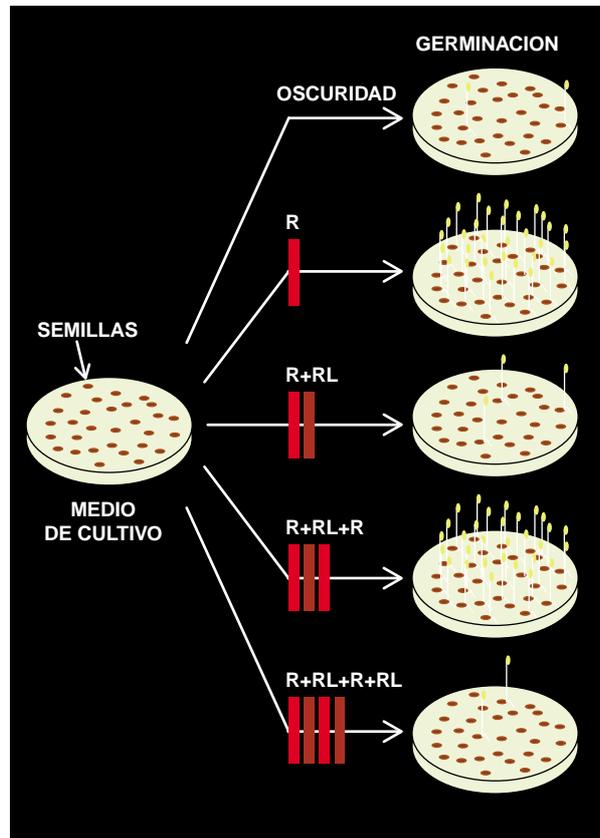
Se identificó un primer mutante que presentaba el hipocotilo alargado en un entorno de luz blanca. Cuando se utilizó luz monocromática, la plántula retenía la respuesta normal bajo luz roja lejana, pero presentaba ceguera a la luz roja. Esa *Arabidopsis* mutante carecía de fitocromo B, por culpa de una mutación bloqueadora del gen subyacente (*PHYB*); se la rotuló *phyB*.

Se necesita una fotografía de un cultivo in vitro de Arabidopsis

De ello se desprendía que la percepción de luz roja continua por la plántula dependía principalmente del fitocromo B. La ausencia del fotorreceptor afectaba al desarrollo de la planta en diferentes estadios, prueba del papel destacado que desempeñaba en el control de varias respuestas fotomorfogénicas; intervenía, por ejemplo, en la desetiología, alargamiento del tallo, germinación y control de la floración.

La investigación fisiológica, por otro lado, atribuía al fitocromo fotolábil la inducción de la desetiología bajo iluminación con luz roja lejana continua. Ahondando en esa línea, se aislaron los primeros mutantes deficientes en fitocromo A, denominados *phyA*. Estos se caracterizaban por su ceguera absoluta a la luz roja lejana continua, mientras seguían respondiendo con normalidad bajo iluminación roja o blanca. Por tanto, la percepción de luz roja lejana correspondía en exclusividad al fitocromo A. La investigación ulterior en este mutante ha demostrado que, en condiciones naturales, el fitocromo A contribuye a la supervivencia de las plántulas que germinan bajo una zona de sombra vegetal, en que el ambiente se enriquece en luz roja lejana.

Los cribados bajo luz roja continua en plántulas de *Arabidopsis* no descubrieron mutantes deficientes en los fitocromos C, D y E. Además, las plantas que carecían de los fitocromos A y B seguían reaccionando ante algunos estímulos de la luz roja y roja lejana, especialmente en es-



5. UN EJEMPLO CLASICO de las respuestas mediadas por los fitocromos es el control por luz de la germinación de las semillas. En condiciones de oscuridad, el porcentaje de germinación es bajo. Basta un pulso inicial de luz roja (R) para inducir la germinación. Pero si tras ese pulso se aplica otro de luz roja lejana (RL), se obtienen porcentajes de germinación similares a los de semillas mantenidas en oscuridad. La observación de la sucesión de pulsos (R + RL + R, R + RL + R + RL) permitió descubrir que el color del último pulso aplicado controlaba la germinación.

tado adulto. Parecía clara la regulación de tales respuestas por los fitocromos C, D y E.

Y eso es lo que se confirmó en un ecotipo de *Arabidopsis* denominado Wassilewskija o WS, deficiente en fitocromo D (*phyD*) a causa de una mutación espontánea en el gen correspondiente. Dada la ligera hiposensibilidad a la luz roja de las plántulas mutantes *phyD*, cabe suponer que este fitocromo participa, junto con el B, en la percepción de luz roja. También se han identificado plantas mutantes en el fitocromo E (*phyE*), que muestran, en ausencia de fitocromo B, alteraciones en la percepción de la razón entre luz roja y roja lejana.

La complementariedad o redundancia de función observada entre los fitocromos B, D y E les permite, quizás, a las plantas percibir pequeños

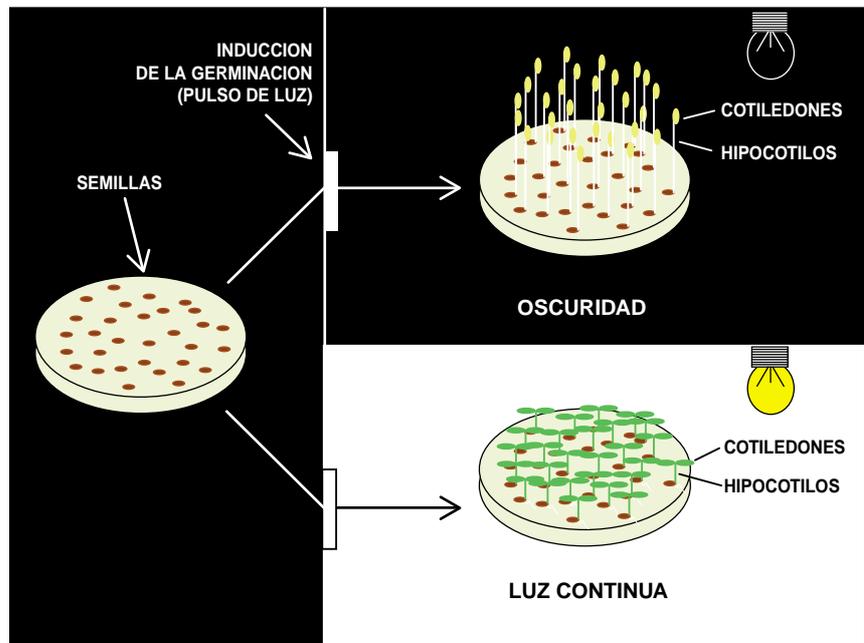
cambios en las condiciones de luz y ajustar su crecimiento. No se ha obtenido ninguna planta deficiente en fitocromo C, por lo que se desconoce el proceso fisiológico concreto en que interviene.

Tras la percepción de la luz, los fitocromos transforman la información ambiental en una señal celular. Se supone que ésta se transmite a la cadena de transducción iniciada por la función reguladora de los fitocromos. Esta cadena consta, así se cree, de elementos que actúan como mensajeros moleculares desde el fitocromo hasta los genes implicados en los cambios fisiológicos y de desarrollo de adaptación a la luz.

Para abordar la función reguladora de los fitocromos se empezó por comparar su secuencia aminoacídica con la de otras proteínas conocidas. La identificación en el dominio carboxilo terminal de dos regiones PAS (PAS1 y PAS2) y una región DHQ abría la posibilidad de que los fitocromos fueran quinasas, enzimas preparadas para transmitir la señal a través de la fosforilación de otras proteínas. Se ha comprobado que el fitocromo A tiene actividad quinasa *in vitro*, pero no se ha podido corroborar este proceso *in vivo* ni su relevancia biológica.

Por métodos genéticos se han acotado, además, regiones de las moléculas de fitocromo A y B que participan en la función reguladora. En el caso del fitocromo A se realizaron cribados genéticos de poblaciones mutantes de *Arabidopsis* para aislar los individuos total o parcialmente ciegos a luz roja lejana en los que la función sensora del fitocromo A permanecía inalterada. La secuenciación de los genes del fitocromo en las plantas mutantes descubrió mutaciones puntuales que provocaban cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína. La mayoría de estas mutaciones puntuales se concentraban en "región núcleo", un segmento del dominio carboxilo terminal que, por tanto, localizaba físicamente la función reguladora.

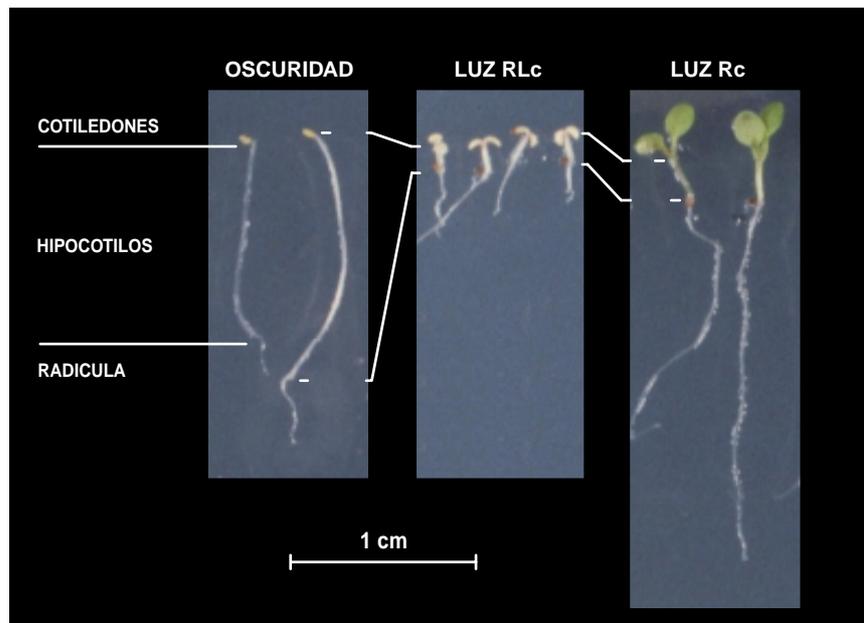
6. SI TRAS INDUCIR la germinación con un pulso de luz las semillas se mantienen en oscuridad, las plántulas emergentes se etiolan, es decir, no desarrollan los órganos fotosintéticos, presentan un aspecto amarillento-blanquecino por la ausencia de clorofilas y concentran sus recursos en el crecimiento del hipocotilo en busca de luz. En las plántulas desarrolladas en luz continua, por contra, se inhibe el alargamiento del hipocotilo y se producen la expansión de los cotiledones y el desarrollo de la maquinaria fotosintética para captar la luz. En la parte inferior de la ilustración se muestran plántulas de *Arabidopsis thaliana* desarrolladas en oscuridad y bajo luz continua roja lejana (RLc) y roja (Rc). Aunque la luz roja lejana activa el desarrollo de las plántulas, no induce la síntesis de clorofilas; por eso presentan una coloración similar a la de las plántulas etioladas. A tenor del tratamiento varía la longitud de los hipocotilos.



En el caso de fitocromo B, con idéntica estrategia pero buscando mutantes afectados en la respuesta a luz roja, se identificaron mutaciones puntuales en la misma región. Y se postuló la implicación de la región núcleo en la interacción con un factor que recoge la información del fitocromo e inicia la cadena de transducción de la señal.

Con el fin de descubrir los componentes inmediatos de la cadena de transducción de la señal, es decir, los que interaccionarían directamente con los fitocromos, se recurrió a la técnica del doble híbrido en levadura. Utilizando como anzuelo el extremo carboxilo terminal del fitocromo B, que contenía la región núcleo, se aisló PIF3, un factor que interaccionaba también con el extremo carboxilo terminal del fitocromo A. Se trata de un factor que se une de forma fotorreversible *in vitro* al fitocromo B entero y fotoactivo. Cuando el fitocromo B contiene la región núcleo mutada, la interacción con PIF3 disminuye. Se obtuvieron plantas transgénicas de *Arabidopsis* con niveles reducidos de PIF3 (anti-PIF3). Las plántulas anti-PIF3 son hiposensibles a luz roja y roja lejana, tal como cabe esperar al reducir los niveles de una proteína que interacciona directamente con los fitocromos A y B e interviene en la transmisión de la señal que estos receptores inician.

Con posterioridad y utilizando también la técnica del doble híbrido en



levadura, se aislaron dos factores más, PKS1 y NDPK2, que interaccionan con el fitocromo A. PKS1 es una proteína citosólica que se fosforila *in vitro* por fitocromo A. NDPK2 es una quinasa cuya actividad se incrementa cuando se une a la forma activa (Pfr) del fitocromo A. El aislamiento de estos factores que interaccionan directamente con el fitocromo A apoyan la hipótesis de que los fitocromos pueden actuar como quinasas *in vivo*.

Para identificar otros posibles componentes de la cadena de transducción de señal se recurrió también a los cribados genéticos, mediante la

misma estrategia utilizada para identificar la "región núcleo", pero centrándose en las mutaciones que afectaban a genes distintos del que cifraba la propia molécula fotorreceptora. Se daba por supuesto que en este tipo de mutantes estaba afectado alguno de los pasos de transducción de la señal iniciada por los fitocromos. De los mutantes encontrados en *Arabidopsis* algunos mostraron hiposensibilidad o hipersensibilidad específicamente a la radiación roja, mientras que otros exclusivamente a la luz roja lejana. En ambos casos, los mutantes no presentaron ninguna alteración cuando germinaron en oscu-

ridad, mostrando que el efecto de la mutación alteraba específicamente a la fotopercepción. La obtención de mutantes afectados sólo en la percepción de luz roja lejana o roja corroboraba la existencia de componentes específicos de la transmisión

de la señal iniciada por el fitocromo A o la iniciada por el B.

Otros mutantes mostraban hiposensibilidad o hipersensibilidad a la luz roja y roja lejana. O lo que era igual, había otros componentes que eran comunes a las rutas iniciadas por ambos fitocromos. Había un grupo

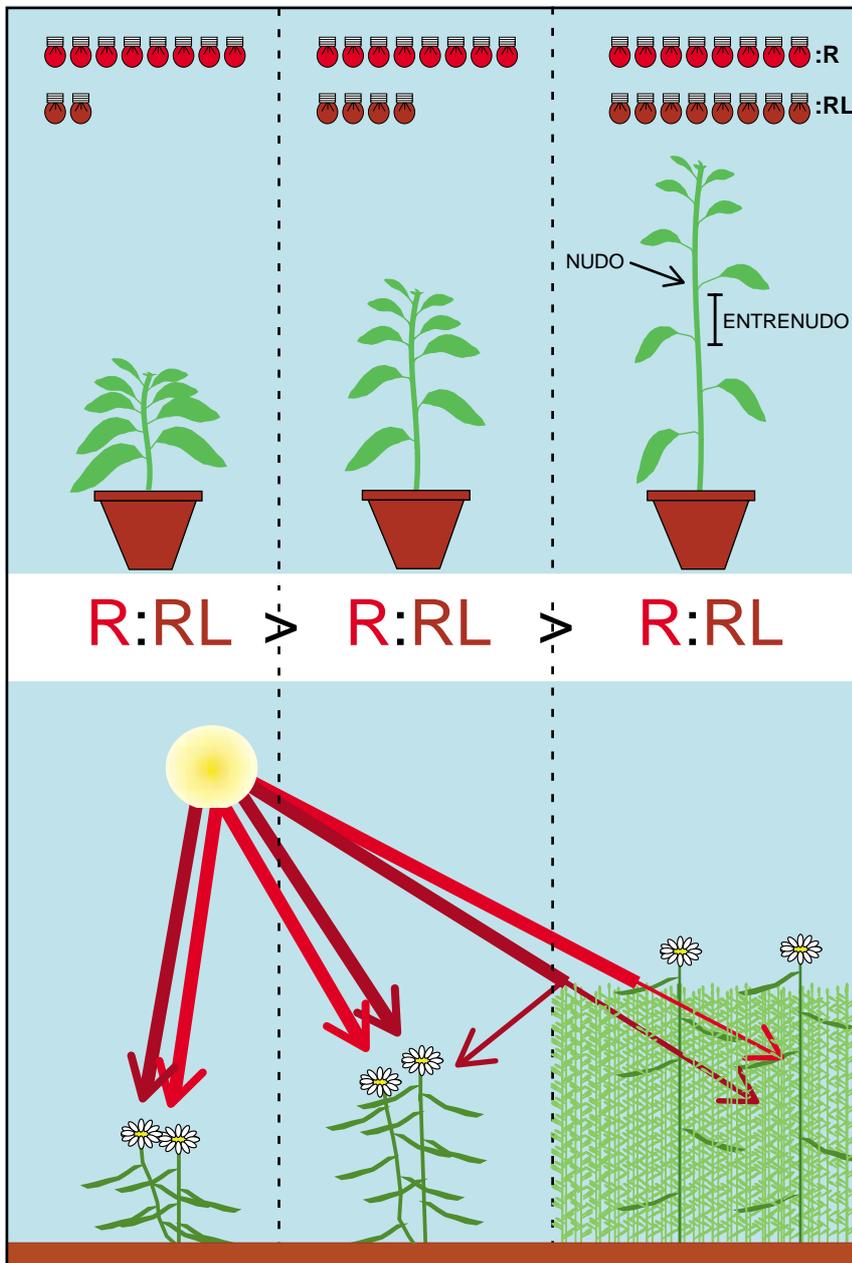
de mutantes en plantas que se desarrollaban en oscuridad como si crecieran en luz. En éstos, la falta de la proteína codificada por el gen mutado iniciaba el desarrollo fotomorfogénico en ausencia del estímulo luminoso. Se aisló, asimismo, un mutante hiposensible a luz continua roja, roja lejana y azul.

De los componentes identificados por las estrategias genéticas sólo se han aislado los genes de algunos. El gen *PIF3* cifra la proteína PIF3, que pertenece a cierta familia de factores de transcripción. La proteína se aloja en el núcleo de las células vegetales, donde puede unirse a consecuencias promotoras concretas del ADN para interactuar con los fitocromos A y B activos. Este mecanismo permitiría establecerse una conexión directa, rápida y continuada entre la percepción de la luz por la acción de los fitocromos y la regulación de la expresión génica.

La llegada de la señal luminosa al núcleo celular afecta la expresión de ciertos genes. En el caso de la desetiología de las plántulas, se activa un grupo de genes cuya presencia se requiere en un entorno luminoso, genes que permanecen silentes en oscuridad. ¿De que modo los fitocromos regulan y coordinan la acción génica? La expresión de un gen viene dictada principalmente por las secuencias de su promotor; a éste se une la maquinaria responsable de la transcripción del ADN en ARNm. Mediante el análisis y comparación de promotores de varios genes regulados por la luz podemos identificar elementos de respuesta a la luz. Tales elementos han aparecido también en otros promotores.

La regulación del desarrollo vegetal por la luz implica cambios en la expresión génica de las células u órganos fotosensibles. En el caso de que los órganos de percepción y los de respuesta no coincidan, se precisa la comunicación entre las diferentes partes de la planta. En la tuberización de la patata y en la floración del tabaco y *Arabidopsis*, la percepción del fotoperíodo ocurre en las hojas, mientras que la respuesta tiene lugar en los estolones (tuberización) o en los meristemos apicales (floración).

Para explicar la comunicación entre las hojas y los órganos de respuesta al fotoperíodo se apela a determinados factores que se transmiten desde los órganos de percep-



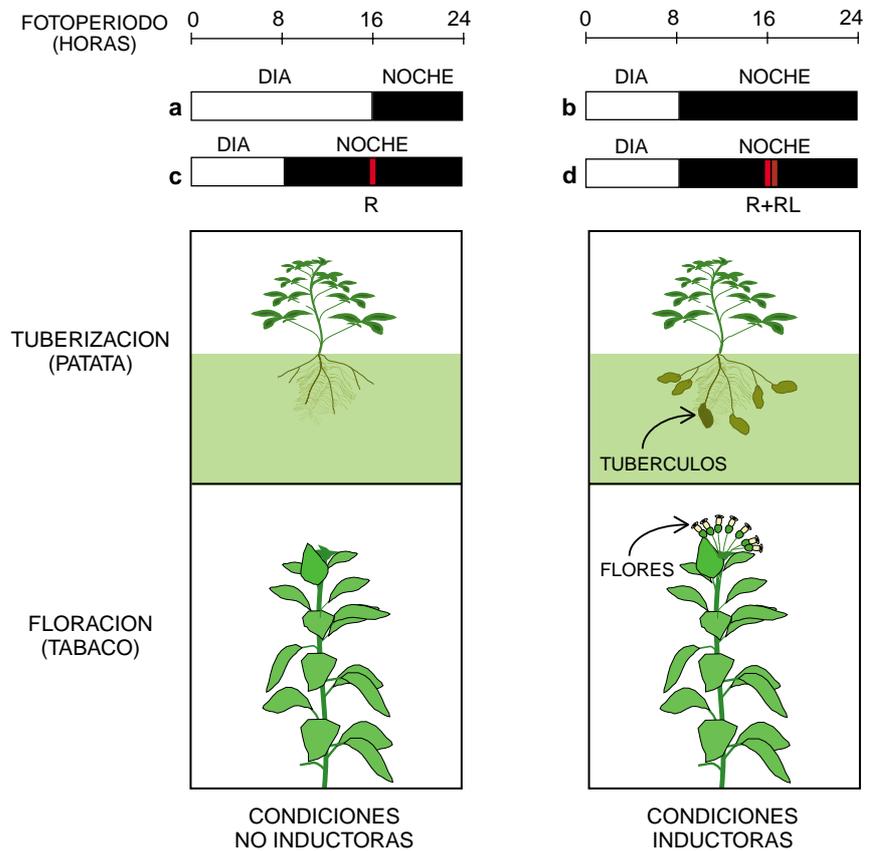
7. LA LONGITUD DE LOS ENTRENUDOS en plantas adultas está modulada por la acción de los fitocromos. En condiciones de laboratorio (*arriba*), los entrenudos son más largos cuanto menor es la razón entre luz roja (R) y luz roja lejana (RL) en que crecen. Esta respuesta forma parte del “síndrome de huida de la sombra”, un mecanismo desarrollado por algunas plantas para competir por la luz. En condiciones naturales (*abajo*), el síndrome se manifiesta en la longitud del tallo de las margaritas que crecen en la cercanía o entre las plantas de un cultivo de gramíneas, en respuesta al enriquecimiento en luz roja lejana que reduce la relación R:RL. Por el contrario, las margaritas que crecen en un espacio abierto, donde es mayor la relación R:RL, no desarrollan este síndrome y presentan entrenudos cortos.

ción hasta los de respuesta. Tales factores podrían ser hormonas. En la tuberización, las condiciones inductoras alteran los niveles de giberelinas en las hojas y en los estolones. En la floración el fotoperíodo desencadenante de la floración provoca cambios en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de estas hormonas: aumentan los niveles de giberelinas activas en las hojas y en el meristemo apical, que estimulan la producción del tallo floral. Las giberelinas podrían operar por tanto como intermediarios endógenos para la integración en la planta de la información ambiental.

En los monocultivos de alta densidad, el “síndrome de huida de la sombra” frena la producción de hojas, frutos y semillas. La cercanía de las plantas en los monocultivos provoca una disminución en la razón entre luz roja y roja lejana percibida a través de los fitocromos fotoestables (B, C, D y E). Esta señal induce el síndrome que, entre otros efectos, estimula el alargamiento de los tallos en detrimento del desarrollo de las hojas.

En las plántulas, la percepción de luz roja lejana por el fitocromo A, fotolábil, ejerce un efecto antagonista al de los fitocromos fotoestables, que comporta la reducción del alargamiento del vástago. Pero el fitocromo A no abunda en la planta adulta, razón por la cual este fotoreceptor deja de controlar el alargamiento del tallo en este estadio. Inconveniente que podría solucionarse con plantas transgénicas que sobreexpresaran el gen del fitocromo A. En el laboratorio de Harry Smith, de la Universidad de Leicester, se consiguieron plantas transgénicas de tabaco que acumulaban cantidades moderadas de fitocromo A. Estas plantas eran más enanas que las normales porque el efecto antagonista de la cantidad extra de fitocromo A enmascaraba el “síndrome de huida de la sombra”. Se producía el “enanismo condicionado por la proximidad de otras plantas”.

En las condiciones de alta densidad vegetal propias de los monocultivos, el “enanismo condicionado por la proximidad de otras plantas”, aunque no aumenta la cantidad total de biomasa producida, sí incrementa la proporción de biomasa cosechable (las hojas en el caso del tabaco) entre un 15-20% en relación a los monocultivos de plantas no modificadas genéticamente.



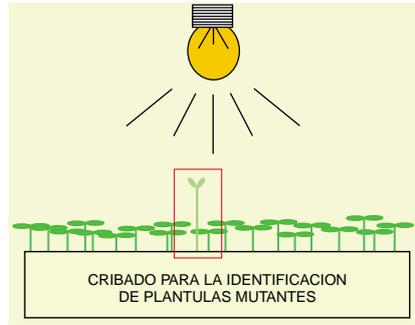
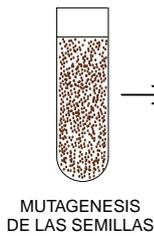
8. LAS PLANTAS INICIAN LA FLORACION y la tuberización en la estación del año adecuada gracias a la percepción de cambios en el fotoperíodo o duración día-noche. En ciertas variedades de patata la tuberización depende del fotoperíodo; en días largos (16 horas de luz y ocho de oscuridad) las plantas no tuberizan y en días cortos (ocho horas de luz y 16 de oscuridad desarrollan tubérculos). En algunas variedades de tabaco la floración sigue un comportamiento similar. Si en fotoperíodos inductores de días cortos la noche se interrumpe con un pulso de luz blanca o roja las plantas no tuberizan ni florecen. Podemos anular el efecto inhibitor del pulso de luz mediante otro pulso subsiguiente de luz roja lejana.

En el laboratorio de Christiane Gatz, de la Universidad de Göttingen, se ha observado que la sobreexpresión de fitocromo B de *Arabidopsis* en patata provoca, junto a otros efectos, un mayor rendimiento fotosintético, con el consiguiente incremento en la producción de tubérculos, al menos en condiciones de laboratorio. Estos

resultados prometedores indican que el entendimiento de la fisiología de los fitocromos puede ayudar a mejorar sustancialmente la productividad agrícola.

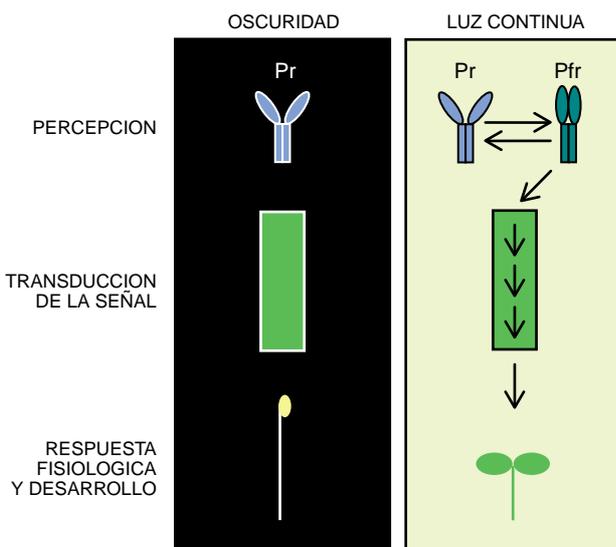
BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

- PHOTOMORPHOGENESIS IN PLANTS. Dirigido por R. E. Kendrick y G. H. M. Kronenberg (segunda edición). Kluwer Academic Publishers; 1994.
- GENETIC ENGINEERING OF HARVEST INDEX IN TOBACCO THROUGH OVEREXPRESSION OF A PHYTOCHROME GENE. P. R. H. Robson, A. McCormac, A. S. Irvine y H. Smith, en *Nature Biotechnology*, vol. 14, págs. 995-998; 1996.
- NUCLEAR AND CYTOSOLIC EVENTS OF LIGHT-INDUCED, PHYTOCHROME-REGULATED SIGNALING IN HIGHER PLANTS. F. Nagy y E. Schäfer en *EMBO Journal*, vol. 19, págs. 157-163; 2000.
- LIGHT: AN INDICATOR OF TIME AND PLACE. M. M. Neff, C. Fankhauser y J. Chory en *Genes and Development*, vol. 14, págs. 257-271; 2000.

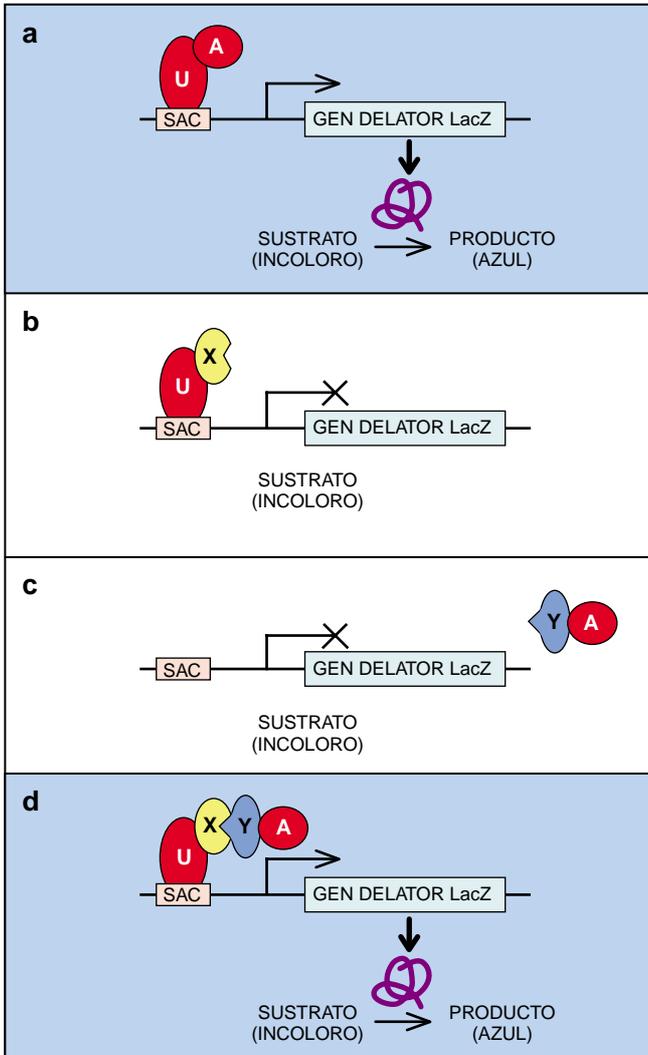


10. LA TECNICA DEL DOBLE HIBRIDO DE LEVADURA permite detectar *in vivo* la interacción entre dos proteínas. Bajo el control de un promotor mínimo y una secuencia activadora (SAC), se introdujo el gen delador *LacZ* en el genoma de levadura. El factor de transcripción implicado consta de dos módulos funcionales: el dominio de unión al ADN (U) y el dominio activador de la transcripción (A). Dicha proteína se une a la SAC del promotor a través del dominio U, y activa la transcripción del gen *LacZ* gracias al dominio A. Cuando el gen *LacZ* se expresa, produce una enzima que transforma un sustrato incoloro en un producto azul; el color delata, pues, a las levaduras. La proteína UX, fusión del dominio U y una proteína X, se une a la SAC del promotor pero no activa la transcripción de *LacZ*, ya que carece del dominio A, ocupado por el X (*amarillo*). La proteína AY, fusión del dominio A y una proteína Y, no activa la transcripción de *LacZ* porque carece del dominio U para unirse a la SAC del promotor. En ambos casos (B y C) las levaduras son blancas. Pero cuando ambas proteínas UX y AY se expresan en la misma célula, si las proteínas X e Y interaccionan el complejo resultante se une a SAC en el promotor y activar la transcripción de *LacZ*, por lo que las levaduras son azules.

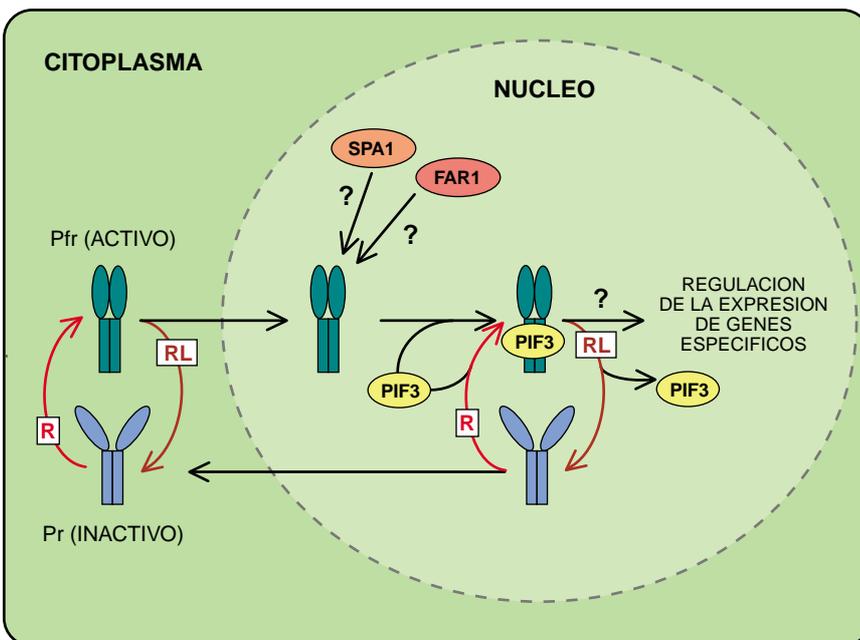
	OSCURIDAD	LUZ RLc	LUZ Rc
PLANTA SILVESTRE			
MUTANTES EN LA PERCEPCION			
PLANTA SIN FITOCROMO A (phyA)			
PLANTA SIN FITOCROMO B (phyB)			
MUTANTES EN LA TRANSDUCCION DE LA SEÑAL (CON FITOCROMOS)			
cop/det/fus			
fhy1 fhy3 fhy1			
spa1			
red1 pef2 pef3			
pef1			
psi2			



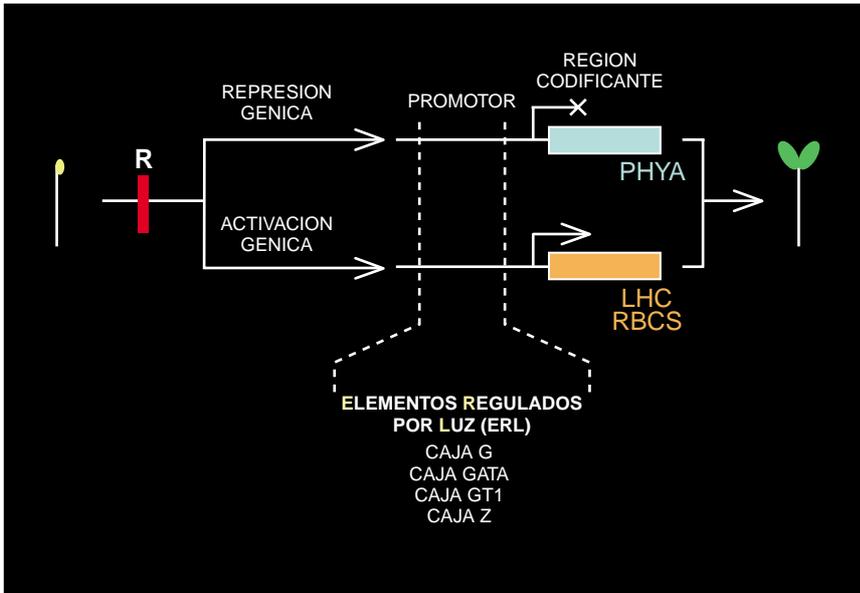
9. MODULACION DEL DESARROLLO VEGETAL por acción de los fitocromos. Procede en tres pasos: percepción de la luz por los fitocromos, transferencia de esta información desde los fitocromos hacia los componentes celulares de la cadena de transducción de la señal y respuesta fisiológica y de desarrollo. En oscuridad, los fitocromos se hallan inactivos (Pr), no hay transferencia de la señal (*caja vacía*) y las plántulas se etiolan. En luz continua los fitocromos se activan (Pfr) e inician las transducción de la señal (*caja con flechas*); las plántulas responden desetioldándose.



11. PLANTULAS DE *ARABIDOPSIS* mutantes cultivadas bajo luz continua roja (Rc) o roja lejana (RLc). Los mutantes *phyA* y *phyB* carecen de fitocromo A y B, respectivamente. Otros mutantes, en cambio, tienen fitocromos funcionales, por lo que la mutación podría afectar a genes que cifran componentes celulares implicados en la transducción de la señal luminosa. Algunos de estos mutantes se desetiolan en oscuridad (*det/cop/fus*), mientras que otros sólo muestran el efecto de la mutación cuando medran en luz RLc (*fhy1*, *fhy3*, *far1* y *spa1*), Rc (*red1*, *pef2*, y *pef3*) o en ambas (*pef1* y *psi2*).



12. LAS CONDICIONES DE LUZ controlan la ubicación subcelular de los fitocromos y su interacción con PIF3, un posible factor de transcripción. El fitocromo acabado de sintetizar es inactivo (forma Pr) y se aloja en el citoplasma. Si la célula recibe luz roja (R), el fitocromo se convierte en la forma Pfr activa y pasa al núcleo, donde puede unirse a PIF3. Si se irradia con luz roja lejana (RL), el fitocromo Pfr se inactiva y se desprende de PIF3. El complejo formado por Pfr y PIF3 podría regular la expresión génica. Otros componentes de la transducción de la señal lumínica, como SPA1 y FAR1, se instalan también en el núcleo, donde podrían intervenir en el control de la expresión génica.



13. ANTE UN ESTIMULO LUMINICO, las plantas activan o inhiben determinados genes. Algunos de estos genes fotorregulados se expresan en oscuridad y, tras la exposición a un pulso de luz roja (R), se reprimen; ocurre así con el gen del fitocromo A, *PHYA*. Otros apenas se expresan en oscuridad y se activan tras el pulso de luz roja. En este grupo se encuentran genes nucleares que producen proteínas cloroplásticas relacionadas con la fotosíntesis, como los genes *LHC* y *RBCS*. Mediante el análisis de los promotores de genes activados por la luz a través de los fitocromos se han identificado secuencias de ADN, cajas, necesarias para la fotorregulación de la expresión.

MONOCULTIVO DE TABACO:

CULTIVO DE PLANTAS NO TRANSGENICAS	PROPORCION DE BIOMASAS	
	HOJA:TOTAL	TALLO:HOJA
<p>20 cm</p>	1	1,3
CULTIVO DE PLANTAS TRANSGENICAS, CON NIVELES MODERADOS DE FITOCROMO A	HOJA:TOTAL	TALLO:HOJA
<p>20 cm</p>	1,15 1,20	1

14. APLICACIONES AGRICOLAS de la investigación en fitocromos. En condiciones de alta densidad vegetal de los monocultivos, la vecindad entre individuos pone en marcha “el síndrome de huida de la sombra”, que estimula el alargamiento de los tallos de las plantas en detrimento de la cosecha, las hojas. En esa misma situación, las plantas transgénicas de tabaco que sobreproducen niveles moderados de fitocromo A desarrollan el “enanismo condicionado por la proximidad de otras plantas”, que altera la productividad del cultivo. En el monocultivo de plantas transgénicas la proporción de biomasa cosechable aumenta un 15-20%.