

## LA PLANTA MODEL *Arabidopsis thaliana*

ELENA MONTE

*Departament de Genètica Molecular, Centre de Recerca en Agrigenòmica,  
Consorti CSIC-IRTA-UAB-UB*

Adreça per a la correspondència: Elena Monte. Departament de Genètica Molecular, Centre de Recerca en Agrigenòmica, Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB. Campus UAB, Edifici CRAG. 08193 Bellaterra. Tel.: 935 636 600. Adreça electrònica: [elena.monte@cid.csic.es](mailto:elena.monte@cid.csic.es).

### RESUM

En els últims trenta anys la planta angiosperma *Arabidopsis thaliana* ha estat l'organisme model utilitzat per milers de biòlegs. *Arabidopsis* s'autopollinitza, té un genoma petit, té un cicle de vida curt, és de mida petita i té uns requisits de creixement senzills que la fan fàcil de fer créixer en condicions de laboratori. L'èxit d'*Arabidopsis* com a planta model es basa en la disponibilitat de mètodes genòmics i d'eines que han estimulat la recerca en la biologia de plantes i han facilitat la investigació d'un ampli ventall de preguntes biològiques. Aquest article explica alguns dels esdeveniments clau en la història d'*Arabidopsis* com a planta model, i en el creixement de la comunitat d'investigadors que la utilitzen per a la seva recerca. I també il·lustra com *Arabidopsis* ha facilitat la recerca, amb l'exemple en un camp d'especial interès en plantes: el de la percepció i resposta a la llum del seu entorn.

**Paraules clau:** *Arabidopsis thaliana*, planta model, mutant, fitocrom, factor interactor de fitocrom.

### THE MODEL PLANT *Arabidopsis thaliana*

### SUMMARY

During the past 30 years, the flowering plant *Arabidopsis thaliana* has been the model organism of choice for thousands of biologists. *Arabidopsis* is self-fertilizing, has a small genome, has a short life cycle, and the small size and simple growth requirements make it easy to grow in laboratory conditions. The extensive acceptance of *Arabidopsis* as a model plant is based on the genomic methods and resources that are available for it, which have

greatly stimulated plant biological research and have facilitated the investigation of a range of biological questions. Here, we review some of the key events in the history of *Arabidopsis* as a model plant and the growth of the *Arabidopsis* research community. And we explain how *Arabidopsis* has facilitated the research in a field of particular importance in plants: the perception and response to their light environment.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*, model plant, mutant, phytochrome, phytochrome-interacting factor.

## PER QUÈ ES NECESSITA UNA PLANTA MODEL?

Les plantes constitueixen la majoria de biomassa del nostre planeta i en podem trobar en un ventall molt ampli d'ecosistemes. La seva gran diversitat i capacitat d'adaptació a una varietat d'ambients molt àmplia va fer pensar durant molt de temps que les conclusions que es poguessin treure de l'estudi d'una planta model no es podrien aplicar fàcilment a cap altra planta. De fet, l'estudi de plantes model és relativament recent comparat amb l'ús, per exemple, d'animals model. Fins als anys vuitanta, quan va començar l'era molecular, la recerca genètica en plantes estava basada en plantes d'interès agronòmic o ornamental com el blat de moro, el tomàquet, l'ordi, el pèsol o la petúnia. Aquestes espècies atreïen l'interès experimental per característiques que les feien atractives, com la grandària dels cromosomes de l'ordi o el color de les flors de la petúnia. L'interès d'aquestes espècies en justificava l'ús en recerca, però també va condicionar el tipus de preguntes que s'estudiaven. A partir dels anys vuitanta, quan es van desenvolupar les primeres tècniques de clonatge de gens, es va fer palès que moltes d'aquestes plantes d'interès agronòmic eren massa difícils d'utilitzar per a estudis genètics i moleculars, ja que posseïen genomes molt grans, poliploides i sovint amb alt contingut de DNA repetitiu, característiques que en complicaven l'anàlisi i manipulació ge-

nòmiques. Per tant, d'ençà de l'era molecular, el sistema model experimental idoni per a la comunitat científica de plantes havia de ser un organisme amb un genoma senzill que fos fàcil d'utilitzar tant en estudis de genètica clàssica com de genètica molecular.

## LA PLANTA MODEL *Arabidopsis thaliana*

Des dels anys vuitanta, *Arabidopsis* ha estat l'organisme model de la comunitat de biòlegs de plantes (Somerville i Koornneef, 2002). *A. thaliana* és una petita planta angiosperma (planta que fa flors i llavors), una mala herba de la família de les brassicàcies i parent silvestre de les brassicàcies hortícoles com la col, el bròquil o la coliflor (vegeu la figura 1). S'han descrit més de 750 ecotips d'*Arabidopsis*, que són varietats adaptades a condicions ambientals específiques. Aquests ecotips estan distribuïts per tot el món, amb una gran variació natural tant a escala morfològica i de desenvolupament (per exemple, en la forma de les fulles), com de fisiologia (per exemple, en el temps de floració o la resistència a patògens). Atès l'elevat nombre d'espècies distribuïdes a l'Àsia central, es pensa que l'origen de l'espècie es trobaria en aquesta zona, mentre que la seva presència a Amèrica i a Austràlia s'atribuiria a les migracions humanes. Geogràficament, *Arabidopsis* té preferència per climes temperats amb

poca pluja. Tots els ecotips descrits es poden trobar al centres ABRC (sigles en anglès de l'*Arabidopsis* Biological Resource Center), i NASC (sigles en anglès del Nottingham *Arabidopsis* Stock Center). Els ecotips més utilitzats en recerca són Columbia (Col), Landsberg *erecta* (Laer), i Wassilewskija (Ws). *Arabidopsis* no té interès agronòmic, però és molt adequada per a la recerca bàsica de genètica i biologia molecular per diverses raons: a) la seva mida petita i la facilitat de créixer en condicions de laboratori; b) el seu temps curt de generació (5-6 setmanes de la germinació a la planta madura), i c) el seu petit genoma (125.000.000 bases, un dels més petits de les plantes amb flor), diploide i seqüenciat l'any 2000. Un altre gran avantatge d'*Arabidopsis* com a model és la facilitat amb què una planta mutant (planta amb un gen afectat) es pot mantenir, ja que el pol·len d'una flor d'*Arabidopsis* fertilitza la seva mateixa flor mitjançant autopol·linització. A més, *Arabidopsis* es transforma fàcilment utilitzant el bacteri *Agrobacterium tumefaciens*. La transformació d'*Arabidopsis* permet introduir un gen d'interès al genoma de la planta utilitzant *A. tumefaciens* com a vector i generar una planta transgènica. Aquesta metodologia també s'ha utilitzat per generar mutants d'inserció de tDNA (en què es muten gens de la planta per interrupció de la seva seqüència a causa de la inserció de tDNA «buit» sense gens bacterians ni transgens). Actualment, la comunitat científica que treballa amb *Arabidopsis* també té disponibles eines com microxips de DNA, que permeten fer estudis dels gens que s'expressen en la planta en unes condicions ambientals determinades o sota el control de gens específics. Diverses pàgines web com TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource, [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) recullen tota aquesta informació i la posen a disposició de la comunitat científica.

Aquesta disponibilitat d'eines, recursos i estratègies experimentals per a *Arabidopsis* han fet que tingués gran acceptació com a planta model i han estimulat l'expansió de la recerca de la biologia de plantes en els últims trenta anys.

## HISTÒRIA D'*Arabidopsis thaliana* COM A ORGANISME MODEL

*Arabidopsis* va ser descoberta per Johannes Thal (d'aquí ve el nom *thaliana*) al segle XVI a les muntanyes alemanyes de Harz. Thal li va donar el nom de *Pilosella siliquos*, i el nom actual el va proposar De Candle l'any 1821. La primera descripció d'un mutant data del 1873, i l'any 1943 Friedrich Laibach va descriure els avantatges d'usar-

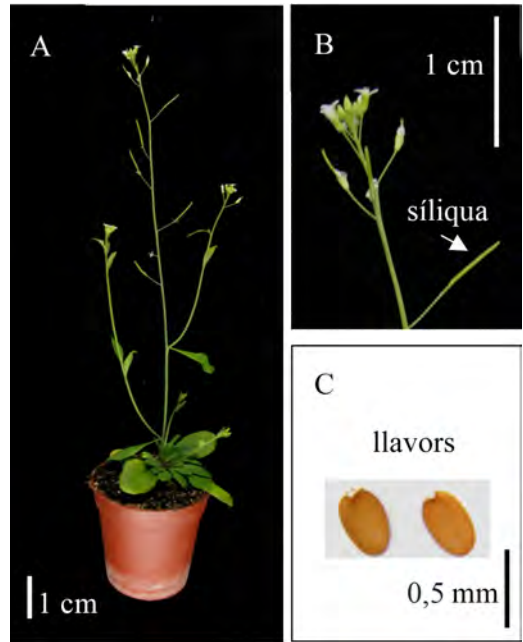


FIGURA 1. a) *Arabidopsis thaliana* crescuda a l'hivernacle durant quatre setmanes. b) Detall d'una inflorescència i dels fruits allargats (les siliques), que contenen unes cinquanta llavors cadascuna. c) Llavors d'*Arabidopsis* observades amb augment.

la en experiments genètics, i va suggerir que es podria utilitzar com a organisme model. Laibach va ser qui va establir que *Arabidopsis* té cinc cromosomes i va proposar que podria ser una bona planta model perquè es desenvolupa ràpid, per la seva facilitat de cultiu, el seu baix nombre de cromosomes i l'alta variació natural. L'any 1947 la seva estudiant Erna Reinholz va mostrar que era possible induir mutacions utilitzant raigs X i va crear la primera col·lecció de mutants induïts. En els anys cinquanta altres científics alemanys van adoptar *Arabidopsis* per als seus estudis, i al principi dels anys seixanta el seu ús es va estendre a Holanda, on es va utilitzar per a estudis de genètica bioquímica. La majoria dels estudis als anys seixanta que utilitzaven aquesta planta cercaven nous mutàgens químics. El 1963, alguns genetistes que treballaven amb *Arabidopsis* es van trobar al XI Congrés de Genètica que es va fer a la Haia i van establir el Servei d'Informació d'*Arabidopsis* (AIS, per la sigla en anglès), que va continuar actiu fins l'any 1990. La comunitat d'*Arabidopsis* començava a estar organitzada. El 1965 es va fer la primera Conferència Internacional d'*Arabidopsis* a Göttingen, Alemanya, amb vint-i-cinc participants, sobretot europeus. Durant els anys setanta l'interès per *Arabidopsis* va créixer. Però al principi dels anys vuitanta, amb la nova metodologia molecular i el descobriment que *A. tumefaciens* podia transferir gens al genoma nuclear de plantes, *Arabidopsis* la van començar a adoptar com a organisme model els biòlegs de plantes que van veure les possibilitats d'utilitzar-la per estudiar temes que fins aquell moment no havien semblat abordables. La major part dels articles que utilitzen *Arabidopsis* publicats al principi dels anys vuitanta descriuen l'aïllament de mutants afectats en diferents processos. Per exemple, Maarten Koornneef va identi-

ficar una sèrie de mutants afectats en la resposta de les plantes a fitohormones i a llum. Aquests mutants demostraven la facilitat amb què diferents processos es podien alterar amb mutacions. Amb el desenvolupament de tècniques de clonatge de gens, aquestes col·leccions de mutants van permetre l'ús sistemàtic de la genètica i la biologia molecular per analitzar processos biològics fonamentals. Un dels articles més influents dels anys vuitanta feia una estimació de la mida del genoma d'*Arabidopsis* en només 70.000.000 bases de DNA nuclear, el més petit de les plantes superiors. Això va facilitar la construcció de genoteques o col·leccions de fragments de DNA que contenien representat tot el genoma, i que van incentivar molt l'ús d'aquesta planta en recerca. Les primeres seqüències de gens d'*Arabidopsis* es van publicar l'any 1986. A més, durant els anys vuitanta la possibilitat de transformar de manera molt eficient amb *A. tumefaciens* va donar lloc a les primeres col·leccions de mutants d'inserció de tDNA. El 1989 es va clonar el primer gen mutat a partir d'una d'aquestes línies de tDNA, la qual cosa va permetre determinar el gen causant del fenotip mutant de la línia. Aquests clonatges de gens al final dels anys vuitanta van ser clau per portar *Arabidopsis* a l'era molecular. Encara ara, la facilitat amb què es pot transformar la planta (ruixant d'*A. tumefaciens* les flors amb un esprai) facilita molt la caracterització gènica i explica per què és la planta model per als genetistes moleculars. A banda d'aquests avantatges tècnics, *Arabidopsis* també va demostrar que era molt útil per resoldre preguntes científiques complexes. Per exemple, al principi dels anys noranta es va desenvolupar el model combinatori ABC per explicar la morfogènesi de les flors a través de l'expressió de tres classes de gens (A, B i C) que determinen la identitat dels òrgans florals en sèpals, pètals, es-

tams i carpels (Weigel i Meyerowitz, 1994). En mutants en els quals falta una o més funcions A, B o C, la identitat dels òrgans està afectada, i en el cas extrem en què totes tres funcions estan mutades, tots els òrgans florals semblen fulles. El model es va basar en el clonatge de gens de patró floral a partir de mutants, en l'anàlisi del patró d'expressió, i en l'anàlisi de dobles i triples mutants, i va permetre entendre com cada funció A, B o C i la combinació d'AB o de BC en cada verticil de la flor determina el desenvolupament de l'òrgan floral corresponent. Aquest model simple i elegant explicava la morfogènesi floral, i el disseny i l'execució dels experiments demostrava que un procés tan complex de desenvolupament podia ser analitzat i entès en plantes. L'elegància d'aquests experiments va mobilitzar els biòlegs de plantes i va atraure molta gent a treballar amb *Arabidopsis*.

Actualment, la Conferència Internacional d'*Arabidopsis* té lloc anualment amb més de mil participants d'arreu del món. Hi ha més de dotze mil científics d'*Arabidopsis* registrats a la pàgina web TAIR, i es publiquen més de 2.500 articles anualment en què es descriu recerca feta utilitzant *Arabidopsis*. A Catalunya hi ha uns vint grups treballant amb *Arabidopsis*, ubicats a la Universitat de Barcelona, a la Universitat Autònoma de Barcelona i al Departament de Genètica Molecular del Centre d'Investigació i Desenvolupament del CSIC. Actualment, la majoria d'aquests grups formen part del Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG), fruit d'una associació CSIC-IRTA-UAB-UB. Les primeres publicacions a Catalunya sobre *Arabidopsis* es van publicar al final dels anys vuitanta i al començament dels noranta, i diversos científics del CSIC van participar en la seqüenciació del genoma d'*Arabidopsis*, que va publicar en els anys 1999 i 2000 un equip internacional.

## EL GENOMA D'*Arabidopsis*: QUANTS GENS FAN UNA PLANTA?

La comunitat internacional d'*Arabidopsis* va crear l'any 1996 el comitè AGI (de l'anglès *Arabidopsis* Genome Initiative), que es va encarregar de coordinar la seqüenciació del genoma per part de diferents equips dels Estats Units, d'Europa i del Japó. Per a la seqüenciació, es va escollir l'ecotip Columbia. La seqüència dels cromosomes 2 i 4 es va publicar l'any 1999, i la dels cromosomes 1, 3 i 5 es va publicar l'any 2000 (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). L'anàlisi de la seqüència d'*Arabidopsis* va incloure l'anotació de gens predits i l'assignació de categories funcionals, l'arquitectura dels cromosomes, la distribució de transposons, i la comparació amb genomes d'altres organismes, i ha permès de començar a entendre les bases genètiques de les diferències entre plantes i altres eucariotes.

S'ha predit que el genoma d'*Arabidopsis* conté uns 28.000 gens, nombre similar a les estimacions en humans i més gran que els del cuc *Caenorhabditis elegans* (20.000) o la mosca *Drosophila* (14.000). Quant al nombre de proteïnes codificades, *Arabidopsis* sembla que en tindria entre 11.000 i 15.000 de diferents, nombre comparable a *C. elegans*, els humans o *Drosophila*. Aquests nombres suggereixen que aquest seria el mínim de proteïnes necessàries per tal que els organismes eucariotes multicel·lulars puguin desenvolupar-se i respondre al seu entorn.

*Arabidopsis* és un organisme autotròfic que només necessita minerals, llum, aigua i aire per créixer. Per tant, una gran part del seu genoma codifica enzims implicats en processos metabòlics com la fotosíntesi, la respiració, el metabolisme intermediari, la captació de minerals i la síntesi de lípids, àcids grassos, aminoàcids, nucleòtids i co-factors. El conjunt de gens dedicats a

aquests processos és similar al d'un altre organisme autotròfic: el cianobacteri *Synechocystis*. Però, mentre que *Synechocystis* generalment té un únic gen que codifica cada enzim, *Arabidopsis* normalment en té diversos i presenta un alt nivell de redundància. De fet, el genoma d'*Arabidopsis* conté un nombre de duplicacions gèniques gran (uns 6.000 gens, pràcticament la quarta part del seu genoma), que es pensa que pot conferir plasticitat al genoma i proporcionar-li noves funcions. En animals, el nombre de duplicacions gèniques no és tan elevat, i la plasticitat gènica sembla que està determinada per la presència de promotors alternatius o per la diferent maduració de l'RNA (tall i unió alternatiu), fenòmens menys freqüents en plantes.

Al contrari que la majoria dels animals, les plantes no es mouen, es poden perpetuar indefinidament i sintetitzen tots els seus metabòlits. Com es determinen aquestes diferències a escala gènica? Gràcies a la seqüenciació del genoma d'*Arabidopsis*, s'han identificat nous receptors i components cel·lulars específics de plantes, i s'han descobert possibles noves vies metabòliques també específiques. Malgrat que moltes famílies de proteïnes són comunes a tots els eucariotes, s'ha vist que *Arabidopsis* en té unes 150 d'úniques, que inclouen factors de transcripció, proteïnes estructurals, enzims i moltes proteïnes de funció desconeguda. Curiosament, mentre que moltes de les proteïnes associades a la cromatina estan conservades entre els organismes eucariotes, un 85 % dels factors de transcripció d'*Arabidopsis* no té gens relacionats en altres genomes, la qual cosa reflecteix l'evolució independent i possibles funcions específiques dels factors de transcripció de plantes. Per contra, al voltant del 50 % de gens amb funcions en síntesi de proteïnes tenen equivalents en altres genomes eucariotes, cosa que reflecteix que les seves

funcions gèniques són més conservades. Quant a rutes de traducció de senyal, sembla que les vies de senyalització en resposta a patògens i a senyals ambientals són més abundants en *Arabidopsis* que en altres organismes, probablement per la importància que té per a la supervivència de les plantes la capacitat de percebre i respondre correctament al seu entorn, ja que no poden escapar-se de les condicions adverses. Finalment, la transferència d'un nombre relativament petit de gens de cianobacteris a partir d'un possible ancestre endosimbiòtic també ha afegit diversitat a les proteïnes que es troben en plantes, comparat amb les dels animals.

#### ESTUDI DE LA FUNCIÓ DELS FITOCROMS, UN EXEMPLE DE L'ÈXIT D'*Arabidopsis* COM A ORGANISME MODEL

##### Com veuen les plantes el que passa al seu entorn? La importància de la llum per a les plantes: la fotomorfogènesi

Atès que són sèssils (és a dir, no poden moure's) i necessiten fer fotosíntesi per sobreviure, la majoria de plantes han desenvolupat al llarg de l'evolució formes úniques de «veure» els canvis en el seu entorn lumínic per tal de respondre-hi adequadament i maximitzar la taxa de fotosíntesi (per exemple, evitant l'ombra) o iniciar les transicions de desenvolupament clau en el moment oportú (per exemple, la germinació o la inducció de la floració). Per a les plantes, la llum serveix, doncs, no solament com a font d'energia per fer la fotosíntesi, sinó també com a inductora i moduladora del seu desenvolupament (Schafer i Nagy, 2006). La importància de la llum en la regulació del creixement de les plantes s'ha documentat des de

temps molt antics, amb unes primeres observacions de Teofrast d'Eresos (380-287 aC), que es refereix als avets crescuts en l'ombra com de fusta pobra però bons per fer llargs pals de vaixell, mentre que els que creixen en llocs assolats es poden utilitzar per fer pals curts més robustos. Sembla que allò que descrivia és l'efecte de l'ombra sobre el creixement de les plantes, ja que les que creixen en llocs ombrívols per la densitat de plantes veïnes s'allarguen per poder captar més llum solar. També Darwin, en un llibre escrit amb el seu fill Francis el 1880, detalla per primer cop els processos de desenvolupament que tenen lloc quan una plàntula etiolada (que ha germinat en foscor sota terra) emergeix a la superfície i entra en contacte amb la llum solar (vegeu la figura 2). Darwin també fa referència als moviments de les fulles o a la curvatura de les plantes cap a una font de llum lateral. Totes aquestes respostes reben el nom de *fotomorfogènesi*, que és la regulació del creixement amb els senyals de la llum, utilitzada no com a font d'energia sinó com a font d'informació.

### Els fotoreceptors fitocroms

Les plantes «veuen» la llum solar utilitzant diversos fotoreceptors especialitzats en longituds d'ona específiques (Chen *et al.*, 2004). Dels diferents fotoreceptors que tenen les plantes, els fitocroms són pigments que perceben llum de l'espectre vermell (V) (660 nm) i vermell llunyà (VL) (730 nm) de la llum solar. Els fitocroms tenen una funció crítica en la percepció de la quantitat, qualitat i periodicitat (durada del dia i la nit) de la llum en les plantes i passen aquesta informació a un gran nombre de vies de senyalització que regulen la fotomorfogènesi durant tota la vida de la

planta. Els fitocroms són reguladors de l'establiment de la plàntula (amb processos com la germinació de la llavor o la desetiolació, vegeu la figura 2), de la seva arquitectura (en la resposta a ombra, la regulació de l'àrea de la fulla i del nombre de branques, o el desenvolupament d'estomes), i de la reproducció (amb la inducció de la floració). El fitocrom existeix com a dímer, i cada monòmer és un polipèptid d'uns 125 kDa que té unit covalentment un cromòfor de bilina, que és l'antena que absorbeix la llum. Els fitocroms funcionen com un interruptor molecular que pot existir en dues conformacions: Pr i Pfr. Se sintetitzen en la foscor al citosol en la forma biològicament inactiva Pr, que pot absorbir llum V. L'activació biològica s'aconsegueix per l'absorció de llum V, que indueix la fotoconversió a la forma activa Pfr, que es transloca al nucli. Aquesta forma Pfr pot fotoconvertir-se de nou a Pr en absorbir llum VL, cosa que resulta en un fotoequilibri dinàmic entre Pr i Pfr en condicions de llum natural, que conté tant llum V com VL. El fitocrom canvia de «color» (és a dir, de propietats d'absorció) després d'absorbir llum. La forma Pr té un màxim d'absorció en llum V i té color blau turquesa, mentre que Pfr absorbeix preferentment llum VL i és de color verdós.

### Quants fitocroms té una planta i com funcionen? Algunes respostes (i preguntes) abans d'*Arabidopsis*

El fitocrom es va descobrir al final de la dècada de 1940 mitjançant experiments fisiològics de l'efecte de la llum V i VL que es van fer en plantes com l'enciam, l'ordi, el bròquil, el pèsol, la soia o el nap. De la dècada de 1930 a la de 1950 es va descriure que les llavors d'enciam germinaven quan els donàvem llum V però no ho feien si

la llum era VL. I si donàvem cicles de llum V i VL, la resposta depenia sempre de l'últim tractament de llum rebut. Aquests resultats suggerien que hi havia un fotoreceptor informacional que havia d'existir en dues formes, una amb un màxim d'acció

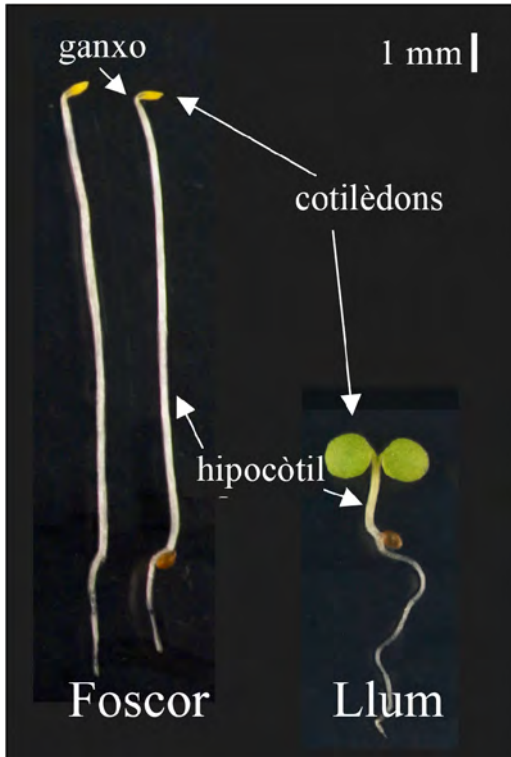


FIGURA 2. La desetiolació de la plàntula. Plàntules d'*Arabidopsis* quatre dies després de germinar. A l'esquerra, la plàntula ha crescut en foscor simulant les condicions que es trobaria quan la germinació és sota terra, utilitzant les reserves de la llavor. Segueix un patró de desenvolupament etiolat, en què la plàntula creix de manera ràpida per arribar a la superfície gràcies al gran allargament de l'hipocòtil (tija embrionària), alhora que protegeix de dany mecànic el meristem apical (les cèl·lules indiferenciades que donaran lloc a tots els òrgans aëris) amb el ganxo tancat i els cotilèdons (fulles embrionàries) junts. A la dreta es mostra una plàntula creixuda en llum. En aquest cas segueix un patró de desenvolupament desetiolat o fotomorfolgènic, amb hipocòtil curt, ganxo apical obert i cotilèdons separats. La plàntula acumula clorofil·la i és fotosintèticament activa.

en llum V i una altra en llum VL. Si eren dos pigments amb funcions antagoniques o un únic pigment fotoreversible entre V i VL, no es va poder resoldre fins a l'any 1959, quan W. L. Butler va purificar de plàntules de civada crescudes en foscor un pigment fotoreversible que va rebre el nom de fitocrom, per la seva característica de fotocromicitat. Ja que la majoria de respostes estudiades, com la germinació de llavors d'enciam, s'indueixen amb llum V i es reprimeixen amb llum VL, la forma Pfr es considera la forma biològicament activa, mentre que la forma Pr és la forma inactiva. Aquestes respostes reversibles per llum V i VL inclouen la germinació, la floració, el moviment de les fulles entre dia i nit o la tuberització en la patata, i són una indicació que el fitocrom és el fotoreceptor que percep la llum i mitjança en la resposta. Aquesta acció reversible dels fitocroms requereix una baixa intensitat de llum i es coneix com a LFR, de l'anglès *low fluence response*. Els fitocroms també estan implicats en dues respostes més: respostes d'alta irradiància (o HIR, de l'anglès *high irradiance responses*) amb intensitats de llum VL o V altes i temps d'irradiació prolongat, i respostes de molt baixa fluència (o VLFR, de l'anglès *very low fluence response*), en les quals uns pocs fotons, fins i tot uns segons de llum de les estrelles, són suficients per induir respostes. En resum, els experiments fisiològics i bioquímics van demostrar diferents funcions dels fitocroms en múltiples processos biològics, així com tres modes d'acció diferents, i també van demostrar que com a mínim hi havia dos tipus de fitocrom, un de làbil i un altre d'estable en llum. Malgrat tots aquests avenços, no va ser fins al començament de l'era molecular i l'ús de mutants d'*Arabidopsis* quan es van començar a resoldre moltes de les qüestions sobre els diferents tipus de fitocrom, les respostes de creixe-



ment que regulen, i la base molecular de la seva funció.

**L'entrada en l'era molecular amb *Arabidopsis*: clonatge de cinc gens de fitocrom i estudis de funció amb mutants**

L'evidència que hi havia diferents tipus de fitocrom en una mateixa espècie es va confirmar al final dels anys vuitanta i al començament dels noranta amb el clonatge i la seqüenciació de cinc gens d'*Arabidopsis*: *FITA*, *FITB*, *FITC*, *FITD* i *FITE*. Els estudis de detecció de proteïna amb anticossos específics per a cada fitocrom han determinat que tots estan presents en fosc en plàntules etiolades, però que el fitocrom A (*fitA*) és el més abundant en aquestes condicions. En irradiar aquestes plàntules amb llum, *fitA* es degrada molt ràpidament, mentre que *fitB*-*fitE* es degraden en menys mesura i romanen a nivells detectables. *FitA* correspon al que s'havia denominat *fitocrom de tipus I*, mentre que els fitocroms de tipus II engloben *fitB*-*fitE*. Per tal d'esbrinar la funció de cada membre de la família, va ser cabdal la identificació de mutants nuls en cadascun dels cinc fitocroms (Franklin i Quail, 2010). Els primers mutants deficients en fitocrom van ser una sèrie de mutants nuls d'*Arabidopsis* originàriament identificats mutagenitzant llavors d'*Arabidopsis* i fent-les créixer en llum contínua. La longitud de l'hipocòtil en aquestes condicions és un indicador de la capacitat de percebre i respondre a la llum: les plantes hiposensibles o cegues a la llum (a conseqüència de la disminució en la percepció) creixeran amb l'hipocòtil allargat com si ho fessin en fosc (vegeu la figura 3). Es van identificar entre aquests mutants plàntules amb hipocòtils llargs, anomenats mutants *hy*, i es va veure que *hy3* és un mutant defi-

cient en *fitB*, amb nivells molt reduïts de la proteïna *fitB* i mutacions en la seqüència del gen *FITB*. De manera semblant es van aïllar mutants deficients per als altres fitocroms, i l'estudi detallat ha aclarit que les respostes VLFR i HIR també resulten de la funció dels fitocroms i no d'altres fotoreceptors, i ha establert que els diversos fitocroms tenen funcions específiques: el fitocrom de tipus I *fitA* és el responsable de VLFR i de l'HIR en VL, mentre que les respostes fotoreversibles estan mitjançades pels fitocroms de tipus II *fitB*-*fitE*. Aquests estudis també han determinat que els cinc fitocroms d'*Arabidopsis* tenen funcions fotosensores o fisiològiques diferencials en diferents fases del cicle vital, però que a vegades s'encavalquen parcialment, i poden fins i tot ser antagoniques. Per entendre millor les relacions funcionals entre els diferents fitocroms, s'han generat mutants deficients en diverses combinacions de fitocroms. D'aquesta manera s'ha pogut establir que, en algunes respostes, diferents fitocroms actuen de manera additiva o parcialment redundants. Recentment s'ha descrit el mutant d'*Arabidopsis* deficient en tots cinc fitocroms, generat a partir dels mutants individuals (Strasser *et al.*, 2010). Aquest quintuple mutant deficient en *fitA*-*fitE* sobreviu en llum blanca (on hi ha altres fotoreceptors informacionals actius, com per exemple els de llum blava), però no sobreviu en llum V, en què els únics fotoreceptors actius són els fitocroms. Aquest quintuple mutant ha permès, doncs, separar la funció de la llum com a senyal informatiu de la seva funció com a font d'energia, i el fet que no sigui capaç de sobreviure en llum V (llum que permet activar la fotosíntesi) demostra que els senyals fotomorfogènics són necessaris per a la supervivència de la planta.

El clonatge dels gens de fitocrom en *Arabidopsis* combinat amb tècniques de genèti-

ca molecular també ha permès avançar en l'estudi de la base molecular de l'acció dels fitocroms. Diversos estudis de localització *in vivo* de fusions del fitocrom amb la proteïna verda fluorescent GFP (de l'anglès *green fluorescent protein*) expressada en plantes transgèniques d'*Arabidopsis* han determinat que tots cinc fitocroms es localitzen al citosol en la forma inactiva Pr, i que l'activació per fotoconversió a forma Pfr induïx la translocació al nucli. Com funciona el fitocrom actiu un cop és al nucli?

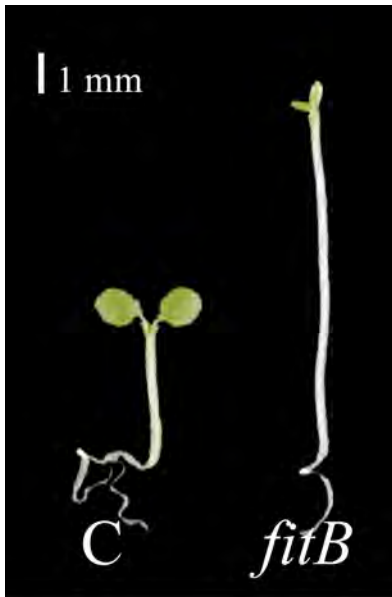


FIGURA 3. El fitocrom B és el fotoreceptor més important de llum vermella. Plàntules d'*Arabidopsis* crescudes sota llum vermella constant (670 nm) quatre dies després de germinar. A l'esquerra es mostra una plàntula silvestre (C) que segueix un patró desetioliat. A la dreta, un mutant deficient en fitocrom B (*fitB*) que és cec a la llum vermella i, per tant, creix allargat com si ho fes en foscor (compareu-ho amb la figura 2).

## Els fitocroms regulen canvis d'expressió gènica en resposta a llum

La percepció de canvis de llum en l'entorn de la planta per part dels fitocroms s'ha vist que inicia canvis ràpids en l'expressió gènica de gens diana. Aquests canvis d'expressió de gens regulats per llum són els responsables de dirigir les modificacions apropiades en el creixement i desenvolupament de la planta, que culminen amb l'adaptació al seu nou ambient lumínic. Per exemple, en la transició entre etiolació i desetiolació de la plàntula en la inducció de la fotomorfogènesi, els fitocroms induïxen l'expressió de gens relacionats amb la biogènesi del cloroplast i la fotosíntesi, com poden ser els gens implicats en l'acumulació de clorofil·les. Per tal d'identificar la xarxa transcripcional i de senyalització regulada per la família de fitocroms, s'ha combinat la disponibilitat de mutants d'*Arabidopsis* amb eines com els microxips de DNA, on es troben representats 22.000 gens d'*Arabidopsis*. Gràcies als microxips, s'ha pogut demostrar que la llum induïx canvis profunds en l'expressió dels gens en *Arabidopsis* (Lorrain *et al.*, 2006). En el cas més extrem, s'han comparat plàntules crescudes en foscor amb plàntules crescudes en llum, i s'han vist diferències de gran escala que reflecteixen les diferències morfològiques i metabòliques entre plàntules crescudes en llum i foscor (vegeu la figura 2). També s'han avaluat els efectes de la llum a curt termini tot transferint a llum V plàntules prèviament crescudes en foscor. Després d'una hora en llum V, aproximadament el 10 % dels transcrits d'*Arabidopsis* modifiquen els seus nivells. Comparant el perfil transcriptòmic de plàntules silvestres control amb el de mutants deficientes en fitocrom, s'ha vist que aquests canvis transcripcionals ràpids en llum V estan mitjançats pels fitocroms

majoritaris fitA i fitB. Entre els gens afectats, un percentatge molt elevat correspon a factors de transcripció, fet que suggereix que després de l'activació dels fitocroms s'inicia una cascada transcripcional que orquestra l'inici de la fotomorfogènesi. Aquests experiments demostren que els fitocroms actius regulen l'expressió gènica, i encara que el mecanisme no és clar, sembla que no ho fan de manera directa actuant ells mateixos com a reguladors de la transcripció. Quin pot ser, doncs, el mecanisme?

### Els PIF, factors de transcripció que interaccionen amb el fitocrom actiu

Mitjançant la recerca d'interactors del fitocrom per la tècnica del doble híbrid en llevat, es va identificar PIF3 (de l'anglès *phytochrome interacting factor 3*). PIF3 interacciona específicament amb la forma activa Pfr dels fitocroms, i és un factor de transcripció de la família de les bHLH (de l'anglès *basic helix-loop-helix*). La família de les proteïnes bHLH està formada per més de cent vuitanta membres en *Arabidopsis*, i PIF3 forma part d'una subfamília de quinze proteïnes que conté d'altres PIF, com PIF1, PIF4, PIF5 o PIF7, les quals també poden interactuar específicament amb el fitocrom actiu (Bae i Choi, 2008). L'estudi de mutants d'*Arabidopsis* deficientes en PIF3 i altres PIF n'ha permès determinar la funció. D'una banda, s'ha vist que els PIF són reguladors negatius de la senyalització de fitB en llum V, ja que els mutants són hipersensibles a llum V (amb hipocòtils més curts que els controls), a l'inrevés que els mutants deficientes en fitB. D'altra banda, els estudis d'estabilitat de proteïna han determinat que PIF3 i altres PIF s'acumulen en foscor i es degraden ràpidament en llum. Aquesta degradació depèn de la interacció amb els fitocroms actius i està

acompanyada de la fosforilació dels PIF. El fet que els PIF s'acumulin en foscor va fer pensar que potser també tenien una funció en absència de llum. Efectivament, si bé els mutants simples deficientes en PIF individuals només tenen un fenotip subtil en foscor, mutants quàdruples d'*Arabidopsis* deficientes en quatre PIF (PIF1, PIF3, PIF4 i PIF5) tenen un fenotip marcat: es desenvolupen en foscor com si creixessin en llum (vegeu la figura 4) (Leivar *et al.*, 2008). Aquests resultats indiquen que la planta té una sèrie de factors de transcripció —els

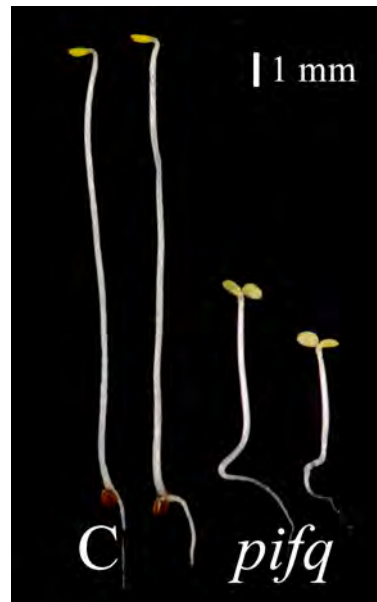


FIGURA 4. Els factors de transcripció PIF reprimeixen la fotomorfogènesi en foscor. Plàntules d'*Arabidopsis* crescudes en foscor quatre dies després de germinar. A l'esquerra es mostra una plàntula silvestre (c) que segueix un patró de creixement etiolat amb l'hipocòtil molt allargat i la regió apical tancada. A la dreta es mostra el quàdruple mutant deficient en 4 PIF (PIF1, 3, 4 i 5) (*pifq*), que es desenvolupa en foscor com si ho fes en llum, amb l'hipocòtil curt i els cotilèdons separats (compareu-ho amb la figura 2).

PIF— que, de manera conjunta, s'encarreguen de reprimir la fotomorfogènesi en foscor, evitant que la plàntula comenci a desenvolupar-se sota terra, cosa que en provocaria la mort. Els PIF, per tant, asseguren la supervivència de la plàntula després de la germinació en foscor, però també regulen l'inici de la fotomorfogènesi. En efecte, quan la plàntula emergeix a la superfície, la llum solar activa els fitocroms, per fotoconversió de forma Pr a forma Pfr, que es transloca al nucli i hi interactua amb els PIF. Aquesta interacció indueix la degradació ràpida dels PIF, cosa que permet a la plàntula desfer-se dels repressors de fotomorfogènesi i fer una transició ràpida entre etiolació i desetiolació. S'inicia així la fotomorfogènesi per adaptar-se amb èxit a les noves condicions lumíniques. Recentment, i també mitjançant la combinació de mutants d'*Arabidopsis* amb microxips, s'ha vist que els factors de transcripció PIF regulen l'expressió gènica en foscor. S'ha vist que el perfil d'expressió gènica en foscor del quàdruple mutant deficient en PIF se superposa amb el de plantes silvestres crescudes en llum, la qual cosa es correlaciona amb el fenotip morfològic del mutant, que creix en foscor com si creixés en llum (vegeu la figura 4). Així doncs, un possible mecanisme d'acció dels fitocroms com a reguladors de l'expressió gènica en llum seria mitjançant la interacció i degradació dels PIF, revertint la regulació gènica exercida pels PIF en foscor i iniciant, per tant, la fotomorfogènesi.

## CONCLUSIONS I PERSPECTIVES DE FUTUR

La planta model *Arabidopsis thaliana* ha contribuït de manera molt important a l'avanç del camp de la biologia de plantes en els últims trenta anys. La disponibilitat

d'eines i recursos han estimulat molt la recerca, i la seqüenciació del seu genoma l'any 2000 va representar un gran pas endavant i va establir les bases per a la caracterització funcional de tots els gens d'una planta. Un dels reptes actuals i de futur és precisament entendre la funció de cadascun dels aproximadament 28.000 gens d'*Arabidopsis*. En els propers anys, *Arabidopsis* continuarà tenint molta importància com a model biològic per aprofundir en el coneixement bàsic de molts aspectes de la biologia de plantes. El desenvolupament de noves eines permetrà abordar noves preguntes, com per exemple els microxips de proteïnes, que permetran fer estudis globals a escala posttranscripcional. Encara que hi ha aspectes particulars en cada espècie, *Arabidopsis* està considerada un model biològic excel·lent, ja que està íntimament relacionada amb centenars de milers d'espècies de plantes a causa de la recent expansió de les angiospermes a partir d'un ancestre comú. S'espera, doncs, que tot aquest coneixement que s'està adquirint gràcies a *Arabidopsis* facilitarà l'estudi d'altres espècies, incloent-hi les d'interès agronòmic. De fet, ja s'està avançant molt en l'estudi de plantes com l'arròs, el tomàquet, la vinya o el meló, moltes ara també amb els seus genomes seqüenciats i per a les quals s'estan generant col·leccions d'eines de recerca genòmica importants.

## AGRAÏMENTS

Voldríem donar gràcies a Maria Sentandreu, per les fotografies que acompanyen el text, al Ministeri de Ciència i Innovació (BIO2009-07675) i a la Generalitat de Catalunya (Xarxa de Recerca en Biotecnologia, 2009 SGR 206) pel finançament del laboratori.

## BIBLIOGRAFIA

- BAE, G.; CHOI, G. (2008). «Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins». *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 281-311.
- CHEN, M.; CHORY, J.; FANKHAUSER, C. (2004). «Light signal transduction in higher plants». *Annu. Rev. Genet.*, 38: 87-117.
- FRANKLIN, K. A.; QUAIL, P. H. (2010). «Phytochrome functions in *Arabidopsis* development». *J. Exp. Bot.*, 61: 11-24.
- LEIVAR, P.; MONTE, E.; OKA, Y.; LIU, T.; CARLE, C.; CASTILLON, A.; HUQ, E.; QUAIL, P. H. (2008). «Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness». *Curr. Biol.*, 18: 1815-1823.
- LORRAIN, S.; GENOUD, T.; FANKHAUSER, C. (2006). «Let there be light in the nucleus!» *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9: 509-514.
- SCHAFFER, E.; NAGY, F. (2006). *Photomorphogenesis in plants and bacteria*. 3a. ed. Països Baixos: Springer.
- SOMERVILLE, C.; KOORNNEEF, M. (2002). «A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant». *Nat. Rev. Genet.*, 3: 883-889.
- STRASSER, B.; SÁNCHEZ-LAMAS, M.; YANOVSKY, M. J.; CASAL, J. J.; CERDÁN, P. D. (2010). «*Arabidopsis thaliana* life without phytochromes». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107: 4776-4781.
- THE *Arabidopsis* GENOME INITIATIVE (2000). «Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*». *Nature*, 408: 796-815.
- WEIGEL, D.; MEYEROWITZ, E. M. (1994). «The ABCs of floral homeotic genes». *Cell*, 78: 203-209.