



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

*Efectos del ambiente lumínico sobre las interacciones
entre plantas e insectos herbívoros. Respuesta a
múltiples señales de estrés.*

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de
Ciencias Biológicas.

Lic. Miriam Mercedes Izaguirre

Director de tesis: Carlos Luis Ballaré
Consejero de estudios: Jorge Muschietti



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FISIOLÓGICAS Y
ECOLÓGICAS VINCULADAS A LA AGRICULTURA

Buenos Aires, 2005

*Efectos del ambiente lumínico sobre las interacciones
entre plantas e insectos herbívoros. Respuesta a
múltiples señales de estrés.*

Jurado de tesis

Jurado de tesis

Jurado de tesis

Efectos del ambiente lumínico sobre las interacciones entre plantas e insectos herbívoros. Respuesta a múltiples señales de estrés.

RESUMEN

En los experimentos descritos en esta tesis evalué los efectos del ambiente lumínico sobre las interacciones entre las plantas y sus insectos consumidores. Me concentré en dos rangos de longitudes de onda biológicamente significativas: el ultravioleta-B (UV-B) y la región del Rojo-Rojo Lejano (R-RL). El componente UV-B de la radiación solar puede inducir cambios en las plantas que resultan negativos sobre los insectos consumidores, aunque no se han aclarado los mecanismos a través de los cuales actuaría. En esta tesis he documentado que el UV-B solar reduce la herbivoría en tomate (*Lycopersicon esculentum*), efecto que es mediado por la vía de defensa dependiente del ácido jasmónico. También muestro la similitud entre las respuestas al UV-B y a la herbivoría en plantas de dos especies de *Nicotiana*. Esta similitud se manifiesta a nivel transcripcional (mayormente en genes relacionados con defensas) y a nivel de síntesis de fenilpropanoides con conocida función antiherbívoro. Por otro lado, la percepción de RL por las plantas desencadena respuestas de competencia, cuyas consecuencias sobre las defensas antiherbívoro no han sido estudiadas. Encontré que las señales de competencia reducen la resistencia de *N. longiflora* a insectos masticadores. Esta reducción se debería a la inhibición, provocada por el RL, de la acumulación de compuestos de defensa (fenilpropanoides).

Palabras clave: defensas, herbivoría, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana*, radiación UV-B, Rojo-Lejano, señales de competencia

Effects of light environment on plant-insect interactions. Responses to multiple stress signals.

ABSTRACT

The experiments presented in this thesis describe the effects of light environment on the interactions between plants and their consumers. Specifically, I focused on two biologically significant radiations bands: ultraviolet-B (UV-B) and Red-Far Red (R-FR) radiation. Solar UV-B can have a negative impact on consumers, but the underlying mechanisms are still unclear. Here, I documented that solar UV-B can reduce herbivory in tomato (*Lycopersicon esculentum*). This response is mediated by the jasmonic acid-dependant pathway. Moreover, results from experiments with two *Nicotiana* species shows that herbivory- and UV-B-induced responses are very similar. The similarities are at the transcriptional level (mainly defense-related genes) and in the accumulation of phenylpropanoids with known antiherbivory function. On the other hand, plants' perception of FR radiation triggers competition responses. The consequence of those responses on antiherbivory defenses has not been addressed. I found that competition signals can reduce *N. longiflora* resistance to herbivores, and that this reduction would be due to the FR-mediated inhibition of defense compounds accumulation (phenylpropanoids).

Key words: defense, Far-Red radiation, herbivory, signals of competition, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana*, plant-insect interactions, UV-B radiation.

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	6
La radiación solar y las plantas	6
La región ultravioleta del espectro solar	7
Impacto biológico de la radiación UV-B.....	8
Efectos del UVB en las interacciones planta-herbívoro.....	9
Mecanismos por los que el UV-B influye en las relaciones planta-herbívoro	10
La región del rojo y del rojo lejano del espectro lumínico.....	11
La resistencia de las plantas a estrés biótico y abiótico	12
Resistencia inducida por insectos masticadores	13
La vía de los octadecanoides.....	13
El peróxido de hidrógeno	15

La vía de los fenil propanoides y las defensas de las plantas.....	16
Funciones de los fenilpropanoides inducidos por estrés	17
OBJETIVOS	20
CAPÍTULO 2	21
Materiales y métodos Capítulo 3	21
Material vegetal	21
Cultivo de plantas.....	21
Tratamientos de UV-B	21
Extracción de ARN e hibridaciones de Northern-Blot.....	22
Cuantificaciones de herbivoría natural.....	23
Bioensayos de crecimiento de insectos.....	23
Materiales y métodos Capítulo 4	25
Fuentes de semillas y condiciones de germinación	25
Cultivo de las plantas en los experimentos de campo	25
Cultivo de las plantas para los experimentos de invernadero.....	25
Tratamientos de UV-B	26
Tratamientos de herbivoría simulada	27
Extracción de ARN.....	27
Microarreglos de cADN	27
Muestreo, hibridación del microarreglo, cuantificación y análisis.....	28
Determinación de la actividad de IP.....	29
Bioensayos de crecimiento de insectos.....	29
Materiales y métodos Capítulo 5	31
Cultivo de las plantas.....	31

Tratamiento de UV-B.....	31
Tratamientos de herbivoría simulada	31
Muestreos y extracción para análisis químicos	31
Mediciones por HPLC y espectrometría de masas.....	32
Materiales y Métodos Capítulo 6	33
Cultivo de plantas y diseño experimental.....	33
Tratamientos lumínicos	33
Tratamientos de herbivoría simulada	33
Bioensayos de crecimiento de insectos	34
Muestreos para análisis químicos.....	34
Determinaciones de Compuestos Fenólicos.....	34
Determinaciones de Carbono y Nitrógeno	34
Determinaciones de Actividad de IP	35
Extracciones de RNA	35
Muestreo, hibridación del microarreglo, cuantificación y análisis.....	35
CAPÍTULO 3	36
Introducción	36
Resultados	38
El UV-B solar reduce la incidencia de la herbivoría de insectos en plantas de tomate cultivadas en el campo.....	38
El UV-B solar afecta el crecimiento de las orugas de <i>Spodoptera eridania</i> en el campo.....	39
El UV-B solar incrementa las respuestas de defensa dependientes de JA	40
DEF1 y JAI1 son esenciales para la expresión del efecto antiherbívoro del UV-B.	41
Conclusiones.....	42

CAPÍTULO 4	44
Introducción	44
Resultados	45
Diseño experimental y aplicación de un microarreglo de cDNA para estudiar los impactos del UV-B sobre genes relacionados con defensa.	45
El UV-B solar regula negativamente la expresión de varios genes fotosintéticos y regula positivamente la expresión de genes implicados en respuestas de defensa bióticas.....	46
Reproducibilidad del efecto del UV-B	50
El UV-B y la herbivoría de <i>Manduca sexta</i> simulada tienen efectos similares sobre varios grupos funcionales de genes.	51
Efectos funcionales del UV-B sobre las defensas de las plantas.....	53
Conclusiones	55
CAPÍTULO 5	57
Introducción	57
Resultados	57
Conclusiones	60
CAPÍTULO 6	61
Introducción	61
Resultados	63
Efectividad del tratamiento lumínico	63
La percepción por las plantas de <i>N. longiflora</i> de bajas relaciones R:RL acelera el crecimiento de las orugas de <i>M. sexta</i>	64
La percepción de señales de competencia puede inhibir la acumulación de compuestos fenólicos disparada por la herbivoría.....	65

Tanto la herbivoría como el RL regulan la expresión de genes relacionados con defensa.....	69
Conclusiones:	71
CAPÍTULO 7	72
CONCLUSIONES GENERALES	72
DISCUSIÓN GENERAL	73
BIBLIOGRAFÍA	83

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

La radiación solar y las plantas

La radiación solar está formada por un conjunto de ondas electromagnéticas de distinta frecuencia (o longitud de onda) abarcando desde las ondas de mayor frecuencia y alta energía, como los rayos gamma y equis, hasta las de menor frecuencia y energía, como las ondas de radio y televisión (Fig. 1.1).

La radiación visible al ojo humano es sólo una pequeña fracción del espectro completo y abarca desde los 400 a los 700 nm, coincidente con el espectro de radiación fotosintéticamente activa (PAR) (Fig. 1.1). Esta banda de radiación es empleada por las plantas para la obtención de energía primaria, fijando dióxido de carbono mediante la fotosíntesis.

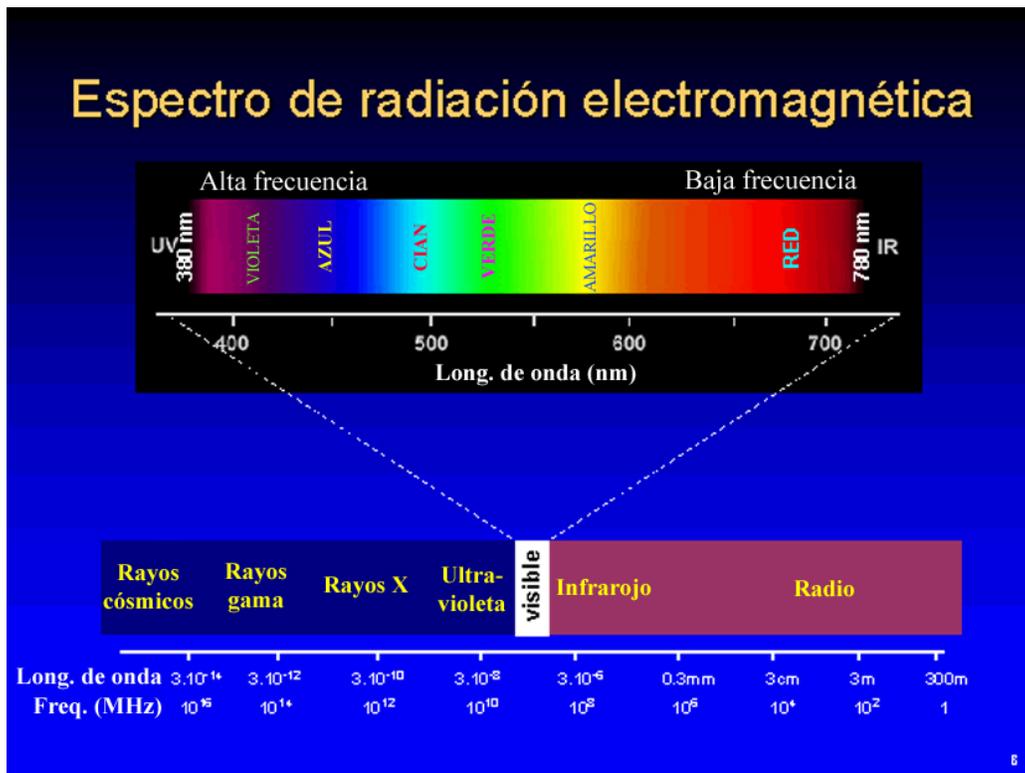


Figura 1.1: Espectro de radiación electromagnética

La radiación solar también constituye una fuente de información para las plantas. El ambiente luminoso varía en condiciones naturales. Así, la cantidad de luz incidente, la composición espectral, la dirección de incidencia y la duración diaria proveen información que la planta capta mediante sistemas específicos. Las plantas han perfeccionado un conjunto de fotorreceptores que les permite ajustar su crecimiento y desarrollo a las condiciones lumínicas ambientales. Las longitudes de onda correspondientes al rojo (R, 655-665 nm) y al rojo lejano (RL, 700-800 nm) son absorbidas por los fitocromos (Smith, 2000), el azul (A) y el UV-A (315-400 nm) por los criptocromos y fototropinas (Ahmad y Cashmore, 1996; Briggs y Christie, 2002). No han sido identificados aún fotorreceptores para el UV-B (280-315 nm), pero su existencia es apoyada por numerosas evidencias (Ballaré *et al.*, 1995a).

La región ultravioleta del espectro solar

Las longitudes de onda más cortas que las correspondientes a la luz visible (400-700 nm) son las más energéticas y constituyen la región espectral ultravioleta (UV, 100-400 nm). Esta región a su vez es dividida por sus efectos biológicos en tres sub-grupos: el UV-C ($200 \leq \lambda \leq 280$ nm), el UV-B ($280 \leq \lambda \leq 315$ nm) y el UV-A ($315 \leq \lambda \leq 400$ nm).

La penetración de estas longitudes de onda hacia la superficie terrestre es dependiente del contenido de ozono presente en el aire, siendo la capacidad de las moléculas de ozono para filtrar la radiación ultravioleta variable con respecto a la longitud de onda. A diferencia del UV-C que es completamente absorbido aún por bajos niveles de ozono, el UV-A puede atravesar casi completamente la estratosfera. La penetración del UV-B es fuertemente influenciada por el contenido de ozono atmosférico y algunos de los efectos sobre los sistemas biológicos pueden resultar nocivos.

Cerca del 90 % del ozono presente en la atmósfera se encuentra en la estratosfera, entre los 10 y 50 km sobre la superficie terrestre. Las mayores concentraciones se encuentran en la franja comprendida entre los 15 y 30 km. Durante el transcurso de los últimos veinticinco años, la capa de ozono estratosférica ha sufrido una erosión significativa como consecuencia de la liberación a la atmósfera de compuestos halogenados

de origen industrial (Albritton *et al.*, 1998). Varios modelos de simulación proyectan para los próximos años tendencias negativas en los niveles de ozono estratosférico a todas las latitudes, excepto en los trópicos (Madronich *et al.*, 1998). Esta erosión de la capa de ozono resulta en un incremento en la transmisión de la radiación solar ultravioleta-B (280-315 nm). En los últimos años se han documentado aumentos en el nivel de la radiación UV-B recibida a nivel del terreno en varios sitios de latitudes medias o altas como resultado de disminuciones en el contenido de ozono estratosférico (para una revisión ver Madronich *et al.*, 1998) y hasta el momento no es posible afirmar que los niveles de ozono global hayan alcanzado un mínimo (McKenzie *et al.*, 2003).

Impacto biológico de la radiación UV-B

La porción de radiación UV-B que alcanza la superficie terrestre representa sólo el 1% de la radiación solar incidente, pero al ser la más energética puede tener impactos biológicos importantes. El estudio de estos impactos está siendo abordado a distintas escalas, abarcando desde el nivel molecular hasta el ecosistémico. Los trabajos sobre plantas superiores de interés agronómico son los más abundantes y, en términos generales, los mayores esfuerzos han sido dirigidos a caracterizar los efectos del UV-B sobre la morfología y el crecimiento (Caldwell *et al.*, 1995; Rozema *et al.*, 1997). Estos estudios han demostrado que si bien la actividad fotosintética en plantas terrestres no es fuertemente afectada por el UV-B solar, otros atributos y procesos de las plantas pueden ser bastante sensibles a variaciones en el nivel de UV-B. Entre éstos se encuentran, a nivel celular, la integridad del ADN, la acumulación de compuestos secundarios con función fotoprotectora, la expresión de algunos mecanismos de defensa antioxidante y, a nivel de planta entera, el alargamiento de tallos, la expansión y el alargamiento foliar (ver Searles *et al.* 1995; Ballaré *et al.* 1996; Rousseaux *et al.* 1998; Mazza *et al.*, 1999a).

Los experimentos realizados en ambientes controlados aportaron la mayor parte de la información disponible hasta el presente sobre respuestas a nivel molecular. Sin embargo, este tipo de experimentos son fuertemente criticados, basándose en el hecho de la pérdida de realismo funcional y ecológico (Fiscus y Booker, 1995; Caldwell y Flint, 1997). Se ha demostrado claramente que los tratamientos con relaciones altas de UV-B respecto del PAR, que son las normalmente empleadas en las exposiciones en ambientes controlados,

tienden a mostrar efectos exagerados del UV-B sobre algunos procesos como la fotosíntesis y la inhibición del crecimiento. Debido a que estos efectos son difíciles de duplicar bajo condiciones de campo, no está muy claro hasta que punto los datos moleculares y mecanísticos que han sido obtenidos bajo condiciones espectrales desbalanceadas (las que comúnmente implican niveles de PAR menores que 1:10 de la radiación solar completa) contribuyen a la comprensión de las respuestas fisiológicas normales de las plantas al estrés por el UV-B ambiental. De hecho, se demostró claramente que el nivel de PAR modula fuertemente el efecto del UV-B sobre la transcripción de varios genes fotosintéticos: a mayor PAR se observó una menor alteración producida por el UV-B sobre la abundancia de mensajeros y, en algunos casos, no pudo ser detectada (Jordan *et al.*, 1992; Strid *et al.*, 1996).

La mayoría de los estudios realizados con cultivos de plantas a campo se han hecho simulando condiciones de hasta un 20 % de reducción en la capa de ozono. Recientemente Searles *et al.* (2001) realizaron un meta-análisis abarcativo de 20 años de experimentación. En él se consideraron estudios de campo en los cuales la radiación solar era suplementada con sistemas de lámparas. De este meta-análisis emergió que no se observan efectos mayores provocados por el UV-B en términos de reducciones en el crecimiento ni sobre las variables relacionadas con fotosíntesis. El único aspecto que parece ser consistente en todos los estudios es la acumulación de compuestos fenólicos en respuesta a los aumentos en las proporciones de UV-B ambiental. Una menor proporción de estudios se ha realizado atenuando los niveles ambientales de UV-B con filtros especiales. En estas aproximaciones más realistas se observó que el UV-B puede reducir el crecimiento en alguna proporción (Hunt y McNeil, 1999; Mazza *et al.*, 1999a; Ballaré *et al.*, 2001; Day *et al.*, 2001).

Efectos del UVB en las interacciones planta-herbívoro

Bajo condiciones de campo, el efecto inhibitorio del UV-B ambiental sobre el crecimiento de plantas terrestres herbáceas raramente excede el 20% (Ballaré *et al.*, 1996; Ballaré *et al.*, 2001; Krizek *et al.*, 1998; Rousseaux *et al.*, 2001). Se documentó, en cambio, un impacto mucho más importante del UV-B solar sobre las interacciones entre las plantas y sus herbívoros. Los experimentos a campo en un amplio espectro de ecosistemas muestran que la intensidad de la herbivoría por insectos frecuentemente aumenta cuanto el

componente UV-B de la radiación solar es experimentalmente atenuado usando filtros (Bothwell *et al.*, 1994; Ballaré *et al.*, 1996; Rousseaux *et al.*, 1998; Mazza *et al.*, 1999a; Zavala *et al.*, 2001). En algunos casos, al menos parte de este efecto del UV-B solar puede ser atribuido a respuestas comportamentales directas de los insectos a los fotones de UV-B (Mazza *et al.*, 2002). Sin embargo, el crecimiento de los insectos y ensayos de preferencia demostraron que los efectos del UV-B sobre la herbivoría son en muchos casos indirectos, es decir mediados por los cambios inducidos por el UV-B sobre los tejidos de las plantas, que en último término afecta el comportamiento de alimentación y el crecimiento del insecto (Ballaré *et al.*, 1996; Rousseaux *et al.*, 1998; Mazza *et al.*, 1999a; Zavala *et al.*, 2001; Rousseaux *et al.*, 2004).

Mecanismos por los que el UV-B influye en las relaciones planta-herbívoro

Si bien los efectos del UV-B sobre las interacciones planta-herbívoro están bien documentados, los mecanismos involucrados son aún poco claros. Entre las posibles explicaciones de la influencia del UV-B en estas interacciones se encuentran:

- cambios en aspectos físicos groseros de los tejidos (contenido de agua, dureza, etc.)
- cambios en el contenido de N
- inducción de compuestos secundarios de la familia de los fenilpropanoides
- inducción de proteínas de defensa, como los inhibidores de las proteasas insectiles (IP).

Con respecto a las características físicas de las hojas, el UV-B solar puede aumentar el peso foliar específico en algunas especies (Ballaré *et al.*, 1996), lo que posiblemente determine una mayor dureza de los tejidos. Sin embargo, se han documentado varios casos en los que las variaciones en el nivel de UV-B afectan la herbivoría sin que medien cambios detectables en el grosor o peso específico de las hojas (Rousseaux *et al.*, 1998).

Con referencia a los fenilpropanoides, algunas familias de plantas acumulan fototoxinas del grupo de las furanocumarinas. McCloud y Berenbaum (1994) demostraron que la exposición a dosis relativamente bajas de UV-B promueve la acumulación de estas fototoxinas y han sugerido que este efecto podría explicar la mayor mortalidad de larvas de lepidópteros en plantas expuestas a la radiación UV-B. Si bien las furanocumarinas están distribuidas en un número restringido de familias, existen evidencias que indican que cambios en otros fenilpropanoides (tales como distintos tipos de flavonoides) inducidos por

el UV-B podrían jugar roles importantes alterando las preferencias y supervivencia de insectos fitófagos en condiciones naturales (Paul *et al.* 1997; Lavola *et al.* 1998; Zavala *et al.* 2001).

Con relación a las proteínas de defensa, tema que será tratado con detalle en el Capítulo 3, se ha mostrado que, si bien la radiación UV-B no induce por sí misma la síntesis de proteínas defensivas en tomate, en el caso en que la planta haya sido dañada mecánicamente (previa o posteriormente a la irradiación con UV-B), se observa la inducción de una proteína defensiva mayor a la obtenida por el daño mecánico solamente (Stratmann *et al.* 2000). Esta evidencia sugiere que algunos de los efectos de la radiación UV-B sobre la interacción de niveles tróficos podrían estar mediados por cambios en la expresión de genes de las proteínas de defensa. Sin embargo no existen experimentos de campo o ensayos con dosis realistas de UV-B que hayan puesto a prueba esta hipótesis.

La región del rojo y del rojo lejano del espectro lumínico

La radiación proveniente del sol correspondiente a las longitudes de onda más largas es filtrada por el oxígeno (688 nm y 762 nm) y el vapor de agua (723 nm). Las longitudes de onda comprendidas entre los 600 nm y los 700 nm corresponden a la región del rojo (R). La región que abarca los 700 nm y 800 nm es la correspondiente al rojo lejano (RL). Resulta de particular interés que las relaciones entre el R y el RL (R:RL) en la luz diurna se ven poco afectadas por las condiciones climáticas y de nubosidad (Holmes y Smith, 1977), pero cuando la radiación solar penetra en un canopeo la composición espectral se afecta debido a que la clorofila absorbe PAR y refleja RL provocándose una reducción en las relaciones R:RL.

La variación ambiental en las relaciones R:RL es percibida por una familia de fotorreceptores, los fitocromos, los que cambian reversiblemente entre la forma que absorbe el R y la que absorbe el RL e interactúan con vías de transducción de la señal para producir una respuesta plástica sensible.

Las relaciones de R:RL bajas son típicas del sombreado por vegetación (Smith, 1982b; Smith, 1995) y las plantas han desarrollado estrategias para responder a esta situación. Una de ellas es la de “tolerancia del sombreado” que involucra tasas relativamente lentas de crecimiento, la conservación de energía y de recursos. Se

desarrollan también estructuras fotosintéticas especialmente eficientes a bajos niveles lumínicos. Otra estrategia es la llamada de “evitado del sombreado” ésta constituye un síndrome en el cual se producen cambios en el crecimiento y el desarrollo. Se favorece la elongación de entrenudos y pecíolos a expensas del desarrollo foliar. La dominancia apical adquiere mayor importancia, se acelera la formación de estructuras reproductivas y la distribución de asimilados cambia marcadamente.

La detección de las bajas relaciones R:RL se produce mucho antes de que las plantas estén realmente sombreadas por las plantas vecinas (Ballaré *et al.*, 1987; Ballaré *et al.*, 1990). Se ha postulado que la sensibilidad al R:FR mediada por los fitocromos es adaptativa porque le permite a las plantas anticipar y evitar la competencia por luz cuando crecen a altas densidades (Ballaré *et al.*, 1987; Casal y Smith, 1989; Ballaré *et al.*, 1990; Schmitt y Wulff, 1993).

La resistencia de las plantas a estrés biótico y abiótico

Las plantas han desarrollado mecanismos que le permiten mantener su vitalidad, longevidad y reproducción aún cuando reciben agresiones desde su medio ambiente.

Estos mecanismos incluyen barreras físicas que dificultan el acceso de patógenos y herbívoros a los tejidos y células vitales para las plantas. Algunos ejemplos de estas barreras son las paredes celulares, deposiciones de suberina, calosa y cutículas que hacen a los tejidos más difíciles de ser consumidos y digeridos. También encontramos aleloquímicos almacenados que pueden tener efectos antixenóticos, esto es que evitan la colonización de los herbívoros, o antibióticos evitando el crecimiento, reproducción, desarrollo o supervivencia de los insectos herbívoros (Referencias en Walling, 2000)

La resistencia puede ser generada continuamente por la planta sin necesidad de estímulos externos y es lo que se ha dado en llamar “resistencia constitutiva”; a diferencia de ésta existen otras que sólo se sintetizan en respuesta a un estímulo particular y son las llamadas “resistencias inducibles” (Karban y Myers, 1989).

Resistencia inducida por insectos masticadores

La vía de los octadecanoides

La respuesta de las plantas al daño producido por artrópodos herbívoros es compleja y varía entre los distintos géneros de plantas. El daño producido induce cambios en la expresión génica y la acumulación de metabolitos secundarios. En las plantas, se ha observado la activación de varias vías de señalización del daño (Reymond *et al.*, 2000; Rojo *et al.*, 1999; Ryan, 2000) que controlan los cambios en la bioquímica de las plantas que otorgan resistencia hacia los ataques presentes y futuros en el sitio en dónde se produjo el daño (respuesta local) y en regiones distantes (respuesta sistémica).

En solanáceas ha sido muy bien descrita la activación de la vía de los octadecanoides y las respuestas mediadas por ácido jasmónico (JA) (ver revisiones de Ryan, 2000; Gatehouse, 2002; Walling, 2000). En respuesta al daño mecánico y a los insectos masticadores se sintetizan una serie de proteínas que han sido clasificadas por Ryan (2000) de acuerdo a su función. Encontramos aquí tres grupos que incluyen: i) proteínas antinutricionales, tanto inhibidores de proteinasas insectiles (IPs) y polifenol oxidasas (PPO), ii) componentes de la vía de señalización y iii) proteinasas (Tabla 1.1). Se produce además la síntesis de otros genes que cumplen roles distintos a los tres propuestos pero cuyos roles en la defensa no son demasiado claros (Ryan 2000).

Tabla 1.1: genes que responden en forma sistémica al daño. Extraído de Ryan (2000).

Genes de defensa	Genes de vía de señalización	Genes de proteasas
Inhibidor de serín proteasas I	Prosistemina	Aminopeptidasas de leucina
Inhibidor de serín proteasas II	Lipoxigenasa (LOX)	Proteasas de aspártico
Inhibidor de cisteín proteasas	Alen oxido sintasa (AOS)	Proteasas de cisteína
Inhibidor de aspartico proteasas	Calmodulina	Carboxipeptidasas
Inhibidor de metalo-carboxipeptidasas	Poligalacturonasa	
Polifenol oxidasa (PPO)	ACC sintasa (etileno)	
	ACC oxidasa (etileno)	
	NADPH oxidasa	
	Peroxidasas	
	Receptor de sistemina	

Los estudios de cinética de activación de estos genes demuestran que su activación es secuencial, rápidamente se observa la activación de los genes de vías de señalización y por ello son denominados “genes tempranos”, luego se activarán los genes de defensa y de proteasas, razón por la cual se los denomina “genes tardíos” (Ryan 2000)

El daño producido mecánicamente o por un insecto deriva en la señal primaria para la activación de la vía de los octadecanoides; se produce el procesamiento de un precursor de 200 aminoácidos presente en la célula, la prosistemina (McGurl *et al.*, 1992) a sistemina (Pearce *et al.*, 1991), aún no se han identificado las enzimas responsables de este procesamiento. La sistemina, un péptido de 18 aminoácidos, es reconocida por un receptor de membrana plasmática (Scheer y Ryan, 1999).

La interacción de la sistemina con su receptor regula una cascada de eventos intracelulares que activan a la fosfolipasa A₂ via una MAP Kinasa (Usami *et al.*, 1995; Stratmann y Ryan, 1997) liberándose ácido linolénico (AL) de la membrana plasmática. La síntesis del JA se realiza a partir de AL luego de su liberación. Tras la acción de la 13-lipoxigenasa (LOX) y la alen óxido sintasa (AOS) y la alen óxido ciclasa se produce ácido oxofitodienoico (por sus siglas en inglés OPDA). La AOS, quien cataliza el paso intermedio, ha sido señalada como el punto más importante de regulación de la síntesis de OPDA y de JA (Laudert y Weiler, 1998; Sivasankar *et al.*, 2000). La importancia de estas dos fitoalexinas en la síntesis de las proteínas defensivas luego de la estimulación por daño ha sido demostrada mediante una mutante de tomate deficiente en esta conversión (*def1*), cuya mutación impide la síntesis de PIs haciendo a la planta más susceptible al ataque por insectos (Howe *et al.*, 1996).

En *Arabidopsis* se han identificado mutantes deficientes en la percepción del JA (*jin1*, *jar1*, *jar4* y *coi1*) que presentan problemas en su resistencia a varios patógenos (Staswick *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1998; Vijayan *et al.*, 1998). Recientemente Li y colaboradores (2002), mediante ensayos de injertos, demostraron que una mutante de tomate (*jai-1*) es deficiente en la percepción del JA, pero aún se desconoce como se realiza la transducción de la señal del JA, probablemente se produzca la activación de moléculas que reconozcan específicamente a los jasmonatos y/o al OPDA, sin embargo aún no se ha identificado ningún tipo de receptor.

Sin importar cómo se produzca el reconocimiento de estas moléculas derivadas de ácidos grasos, el resultado es la activación de la síntesis de los genes de señalización o “genes tempranos” (Ryan 2000).

El peróxido de hidrógeno

La participación de las especies reactivas de oxígeno en las respuestas de defensa de las plantas frente a los patógenos y a la herbivoría se halla muy bien documentada. La percepción por la planta de señales de avirulencia producidas por un patógeno genera rápidamente la producción de superóxidos y la acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Lamb y Dixon, 1997). Orozco-Cárdenas y colaboradores (1999) mostraron que, en hojas de tomate, se produce una acumulación local y sistémica de H_2O_2 en respuesta a la estimulación por daño mecánico, sistemina, polisacáridos y metil jasmonatos (MeJA); todos estos estímulos son inductores de la poligalacturonasa, enzima regulada por la vía de los octadecanoides (Bergey *et al.*, 1999) y que se encuentra dentro del grupo de genes que se activan tempranamente dentro del esquema propuesto por Ryan (2000). Estos trabajos sugieren una relación causal entre la respuesta al daño y la generación de H_2O_2 mediante la producción de JA y ácido galacturónico.

El mecanismo de generación de especies reactivas de oxígeno estaría mediado por la activación de una NADPH oxidasa ligada a membrana (Desikan *et al.*, 1996; Keller *et al.*, 1998) y de acuerdo al modelo propuesto por Orozco-Cárdenas y colaboradores (2001) y resumido en la Fig. 1.2, el H_2O_2 acumulado actuaría como segundo mensajero activador de la síntesis de los genes de defensa o “genes tardíos”.

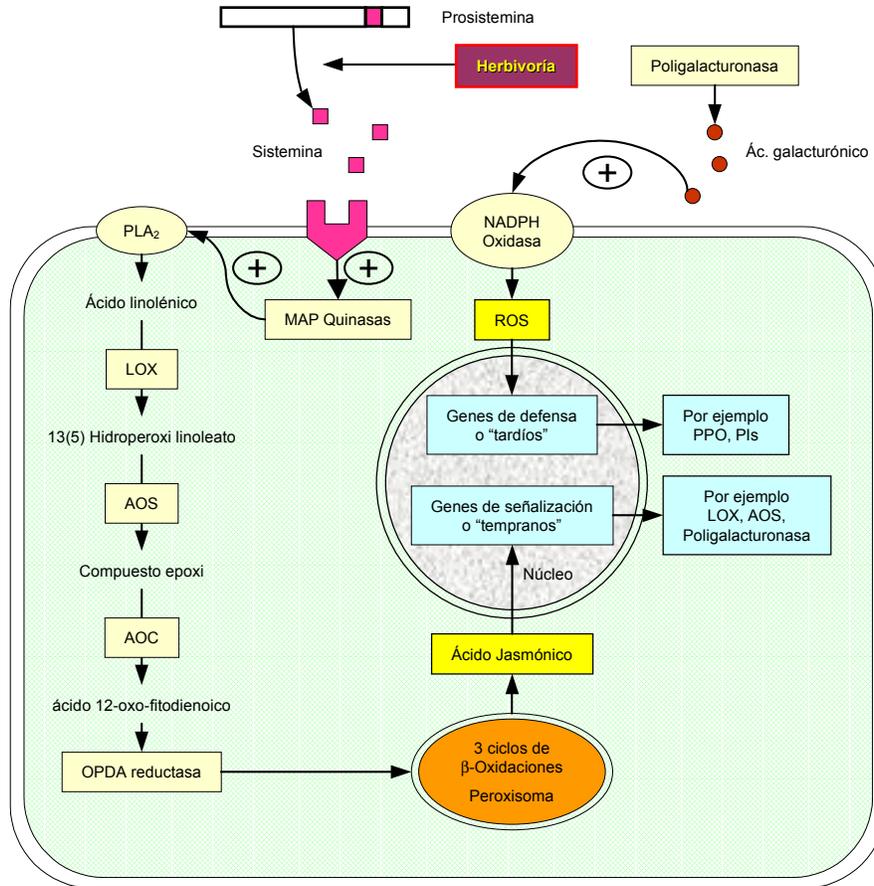


Figura 1.2: Diagrama esquemático de las vías de síntesis y señalización del ácido jasmónico. Adaptado de Gatehouse (2002).

La vía de los fenil propanoides y las defensas de las plantas

Los fenilpropanoides son productos naturales derivados del aminoácido fenil alanina por medio de una deaminación catalizada por la enzima fenil alanina amonio liasa (PAL). Esta enzima constituye el punto de ramificación entre el metabolismo primario (vía del Shiquimato) (Herman, 1995) y el secundario (fenilpropanoides) (Harborne, 1988; Hahlbrock y Scheel, 1989; Lewis y Yamamoto, 1990; Dixon *et al.*, 1992). Varios fenil propanoides simples se producen a partir del cinamato (producto de la reacción de la PAL), como por ejemplo los ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico y cumarinas simples. Los ácidos libres rara vez se acumulan en altos niveles dentro de las células de las plantas,

en cambio rápidamente son conjugados con azúcares, carbohidratos de pared o con ácidos orgánicos. Un gran número de fenilpropanoides inducidos por estrés son derivados del producto de reacción de la chalcona sintasa (CHS), éstos incluyen flavonoides, flavonoles, isoflavonas, isoflavanonas, antocianinas y taninos condensados (Fig. 1.3).

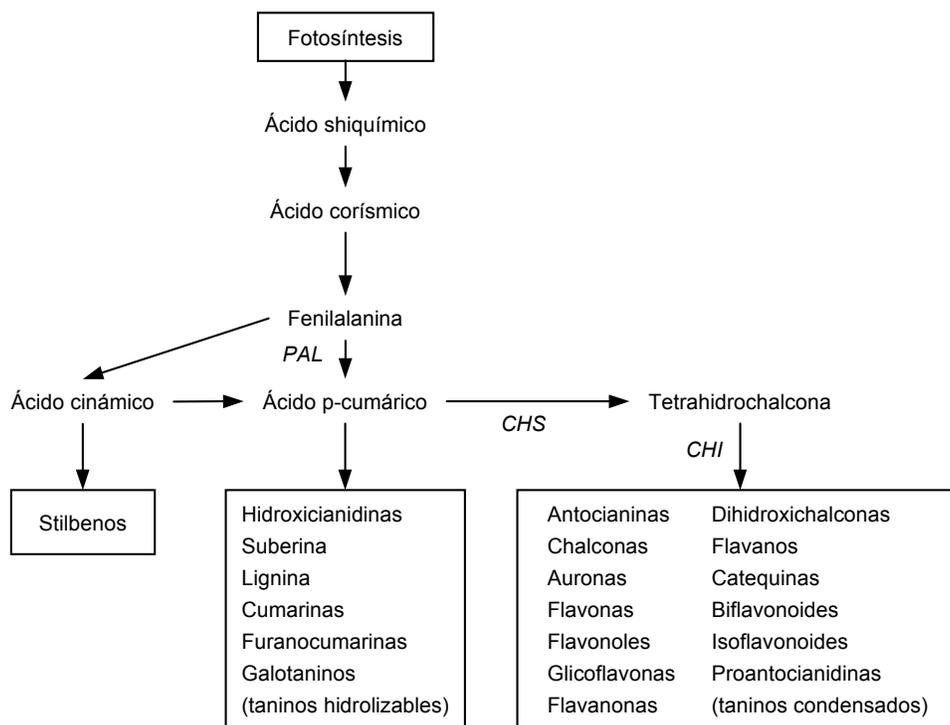


Figura 1.3: Representación esquemática de la vía de síntesis de los fenilpropanoides.

Funciones de los fenilpropanoides inducidos por estrés

Algunos de los fenilpropanoides se sintetizan continuamente en las células y cumplen funciones tales como componentes de la pared secundaria (Carpita y McCann, 2000), o la regulación del transporte de auxinas (Jacobs y Rubery, 1988). Otros en cambio son sintetizados en respuesta a distintos tipos de estrés (por una revisión ver Dixon y Paiva, 1995), algunos de ellos están ejemplificados en la Fig. 1.4.

La estimulación por la radiación UV de la síntesis de flavonoides y especialmente de antocianinas ha sido estudiada en diferentes sistemas (ver revisiones en Chalker-Scott, 1999 y Harborne y Williams, 2000).

Se ha documentado que en respuesta al daño mecánico y la herbivoría se producen aumentos en los niveles de cumestrol y cumarinas tóxicas (Smith, 1982a), también se han reportado inducciones en ácido clorogénico y ésteres de fenólicos unidos a pared que pueden actuar como defensas directas o servir como precursores de la síntesis de lignina, suberina y otras barreras polifenólicas (Hahlbrock y Scheel, 1989).

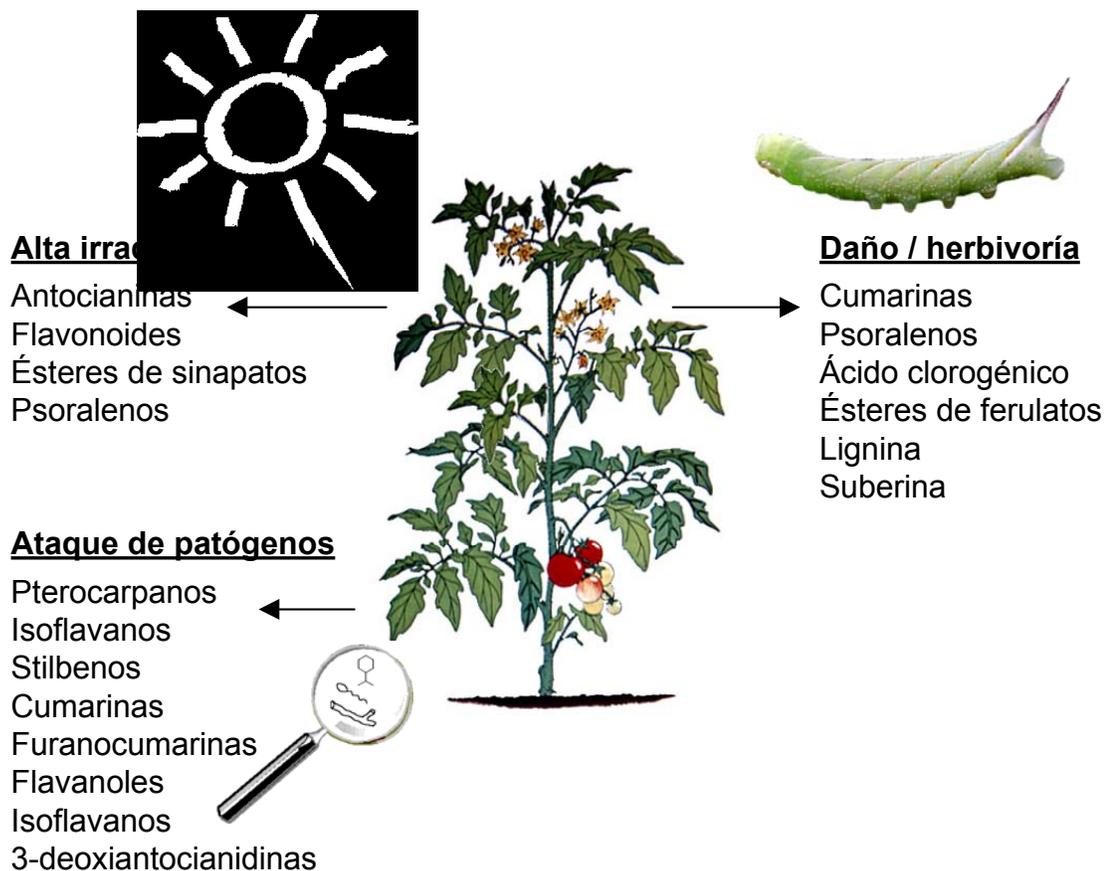


Figura 1.4: Ejemplos de fenilpropanoides inducidos por estrés (Modificado de Dixon y Paiva, 1995)

Voght y colaboradores observaron que el flavonoide kaempferol se acumula en el estigma en respuesta a la polinización o el daño y cumple una función esencial en fertilidad de la petunia y postulan que este flavonoide podría prevenir el ingreso de patógenos durante la germinación del tubo polínico que podrían infectar el ovario (Vogt *et al.*, 1994).

En la mayoría de los sistemas estudiados, la inducción de la síntesis de los fenilpropanoides, bajo condiciones de estrés, es el resultado de la transcripción aumentada de los genes de las enzimas clave en su ruta biosintética y en enzimas pertenecientes a vías

específicas derivadas de ella; algunos ejemplos pueden encontrarse en la respuesta de las suspensiones celulares de alfalfa (Oommen *et al.*, 1994), perejil (Hahlbrock *et al.*, 1995) y zanahoria (Glässgen *et al.*, 1998).

OBJETIVOS

Sobre la base de los antecedentes presentados en la sección anterior, los objetivos generales de esta tesis fueron:

- 1) Estudiar los efectos de la radiación UV-B y del sombreado causado por plantas vecinas sobre la expresión de mecanismos de defensa en plantas y en las interacciones planta-insecto.
- 2) Avanzar en el entendimiento de los mecanismos involucrados en la generación de los efectos mencionados.

Las preguntas que buscamos contestar en relación con los objetivos planteados son:

- 1.1) ¿En condiciones naturales, es el efecto del UV-B sobre la herbivoría dependiente de la “vía de señalización del daño”?
- 1.2) ¿Afecta el UV-B solar la expresión de genes codificantes para productos de defensa en condiciones naturales?
- 1.3) ¿Son similares las respuestas desencadenadas por el UV-B y por la herbivoría?
- 2.1) ¿Cuales son los efectos del sombreado por plantas vecinas sobre la expresión de mecanismos de defensa y sobre la calidad del tejido?
- 2.2) ¿Son opuestos los efectos del sombreado y los inducidos por herbívoros?
- 3.3) ¿Es el efecto del sombreado dependiente de la calidad de luz?

Los resultados, junto con una definición más precisa de las preguntas e hipótesis específicas abordadas, se presentarán en los siguientes capítulos.

CAPÍTULO 2

Materiales y métodos Capítulo 3

Material vegetal

Se empleó como variedad salvaje *Lycopersicon esculentum* cv. Castlemart para todos los experimentos y las mutantes *defl* (Howe *et al.*, 1996) y *jai1* (Li *et al.*, 2001). Todos los genotipos fueron colocados sobre papel húmedo a germinar en oscuridad a 25 °C. A los tres días cuando las raíces y el hipocotilo eran visibles se procedió a identificar a las mutantes *jai1* de acuerdo a como se describe en Li L. *et al.* (2002).

Cultivo de plantas.

Luego del transplante las plántulas se cultivaron durante una semana dentro de un invernáculo, luego se transfirieron a los sitios en el campo experimental del IFEVA y se asignaron los tratamientos de UV-B. Las macetas se enterraron en el suelo para facilitar el riego y evitar el sobrecalentamiento de la región radicular. Hubo tres grupos independientes de plantas (réplicas). Durante este período en el campo (tres semanas), se realizarán dos fertilizaciones con 0.5 g de N:P:K por maceta y se regó dos veces por día para mantener el suelo cerca de la capacidad de campo. Se protegieron las plantas con mallas de tul que impedían mecánicamente el acceso a los insectos naturales del campo experimental.

Tratamientos de UV-B

En el campo, las plantas se cultivaron en parcelas de 1 x 3 m cubiertas con filtros de plástico transparentes (Fig. 2.1). Los filtros eran de dos tipos: poliéster transparente (Oeste Aislante, Buenos Aires; 0.1 mm de espesor), éstos filtran más del 90% del componente UV-B de la radiación solar (tratamiento de atenuación del UV-B); y una lámina de “Stretch” (Bemis Co., Minneapolis; 0.025 mm de espesor), éstas tienen una transmitancia muy alta en la región UV-B (tratamiento de UV-B cercano al ambiental). Ambos plásticos tienen alta transmitancia en las regiones del espectro correspondientes al UV-A y PAR (para los barridos espectrales y detalles, ver Mazza *et al.*, 2000). Se emplearon tres filtros

por cada tratamiento experimental. Las exposiciones en el campo se realizaron durante el verano (Enero a Febrero).



Figura 2.1: Vista de las parcelas de un experimento con tomate a campo, donde se observan los dos tipos de plásticos (transparentes y opacos a la radiación UV-B) usados en los ensayos.

Extracción de ARN e hibridaciones de Northern-Blot

Se pulverizó en mortero con nitrógeno líquido 0.5g de tejido congelado. Luego se agregaron 5ml de buffer de extracción (0.18 M Tris-HCL [pH 8.2], 0.09 M LiCl, 4.5 Mm EDTA, y 1% [m/v] SDS) y 1.7 ml de fenol ácido:cloroformo (5:1 [v:v]). Se homogeneizó la suspensión y luego se centrifugó (12.000g por 20 min a 4° C). Se removió la fase acuosa y se precipitaron los ácidos nucleicos agregando LiCl (concentración final 2M). Las muestras se mezclaron bien y los ácidos nucleicos se dejaron precipitar durante toda la noche a 4°C. Luego del paso de precipitación las muestras fueron centrifugadas (12.000g por 20 min a 4° C). Se resuspendió el precipitado en 2ml de agua y 200 µl de AcONa seguido por el agregado de 5.5 ml de etanol 100 % (v/v) y se precipitó a -20° C por 2 h. Se realizó una nueva centrifugación (12.000g por 20 min a 4° C), y se lavaron los precipitados con 2 ml de etanol 70 % (v/v) y se centrifugó (12.000g por 20 min a 4° C). Se secaron los precipitados y se resuspendieron en agua miliQ.

El ARN total (10-20 µg) se separó en un gel de agarosa 1.4 % (m/v) con formaldehído y se transfirió a membranas de nylon (Hybond N, Amersham). Las membranas fueron hibridadas con sonda de PIN 2, marcada con RadPrime DNA labeling system kit (Gibco-BRL). Las membranas fueron expuestas luego de los lavados astringentes secuenciales a 65 °C. Se controló que la carga haya sido pareja mediante el teñido con bromuro de etidio en la electroforesis. Las cuantificaciones de los niveles de mRNA se realizaron en relación con la carga usando el Scion Image Software.

Cuantificaciones de herbivoría natural

Se analizó un cultivo de plantas de tomate del genotipo salvaje; éstas plantas fueron visitadas por una gran variedad de insectos, que incluían insectos chupadores tales como chinches (*Nezara viridula*, Hemiptera), mosca blanca (Homóptera: Aleyrodidae); raedores tales como arañuela roja (*Tetranychus sp.* Acarina: Tetranychidae), trips (*Frankliniella sp.* Thysanoptera: Thripidae); insectos masticadores como langostas (*Schistocerca sp.* Orthoptera), pulguilla (*Epitrix sp.* Coleoptera: Chrysomelidae), orugas de lepidópteros (*Spodoptera eridania*, Lepidoptera: Noctuidae) y minadores (*Liriomyza sp.* Diptera: Agromyzidae). Las lesiones más recurrentes y claramente identificables resultaron ser las provocadas por trips, razón por la cual fueron seleccionadas para caracterizar la intensidad del ataque de los insectos, se tomaron 5 plantas al azar por tratamiento de UV-B y se contó el número de insectos por hojas, el número de folíolos dañados por planta y se estimó el daño producido teniendo en cuenta el porcentaje del área raída. Las mediciones fueron realizadas al cabo de tres semanas del transplante de los tomates en el campo bajo los niveles contrastantes de UV-B.

Bioensayos de crecimiento de insectos.

Los bioensayos se realizaron con neonatos de *Spodoptera eridania* provenientes de una cría propia originada a partir de ejemplares colectados en el campo experimental del IFEVA. La identificación de *S. eridania* fue realizada por el Dr. Fernando Navarro del Instituto Superior de Entomología “Dr. Abraham Willink” (INSUE), Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán.

Se colocaron dos larvas neonatas sobre cada una de las plantas de tomate. Las dos larvas fueron dispuestas en la misma hoja. La mitad de las plantas de cada genotipo había recibido UV-B solar por al menos dos semanas antes de que las orugas fuesen colocadas sobre ellas, y la otra mitad no recibió UV-B conformando el grupo de las plantas control. El tratamiento de UV-B continuó durante el período de alimentación (1 semana). Para impedir la exposición directa de las orugas al UV-B, la hoja huésped de cada planta se encerró en una bolsa de tela de algodón que tenía la parte superior cubierta de papel de aluminio. Estas bolsas se emplearon tanto en las plantas expuesta al UV-B como en las que no lo fueron. Las orugas se pesaron al final del experimento.

Materiales y métodos Capítulo 4

Fuentes de semillas y condiciones de germinación

Se recogieron las semillas de la planta nativa *Nicotiana longiflora* Cav. de los especímenes que crecen cerca del lago La Falda, en el Valle de Punilla (Córdoba, Argentina central) y se pusieron a germinar directamente en placas con agar. Las semillas de *Nicotiana attenuata* Torr. Ex W. (líneas autofecundadas siete veces a partir de semillas recolectadas del DI Ranch, Section T40S R19W, Utah) fueron sumergidas por una hora en una solución de GA₃ (100 mM) + una solución de humo (House of Herbs, Passaic, NJ; Baldwin *et al.*, 1994) y luego colocadas sobre placas de plástico conteniendo agar-agua (0.8 %). Las plántulas se transplantaron a macetas individuales de 0.5 L que contenían suelo standard.

Cultivo de las plantas en los experimentos de campo

Nuestros experimentos de campo estaban emplazados en el Jardín Botánico Dr. Miguel Culaciati en Huerta Grande (31° sur, Córdoba, Argentina central, dentro de los 5 km del sitio de recolección de las semillas de *N. longiflora*). Luego del trasplante las plántulas se cultivaron durante una semana dentro de un invernáculo, luego se transfirieron a los sitios en el campo y se asignaron los tratamientos de UV-B. Las macetas se enterraron en el suelo para facilitar el riego y evitar el sobrecalentamiento de la región radicular. Hubo tres grupos independientes de plantas (réplicas). Durante este período en el campo (tres semanas), se realizaron dos fertilizaciones con 0.5 g de N:P:K por maceta y se regó dos veces por día para mantener el suelo cerca de la capacidad de campo. Las plantas experimentales de *N. longiflora* tenían una apariencia similar a la de sus parientes silvestres hallados en las áreas húmedas cercanas a los ríos o en los campos abandonados.

Cultivo de las plantas para los experimentos de invernadero.

Se cultivaron plántulas (en macetas individuales de 0.5 L.) durante 4 semanas en un invernadero en Buenos Aires (34° S), recibiendo sólo la radiación natural, luego se transfirieron a los tratamientos experimentales de UV-B dentro del mismo invernáculo. Hubo tres grupos independientes de plantas (réplicas). Durante el período en que las plantas

permanecieron bajo las lámparas de UV-B (tres semanas), se fertilizó una vez con 0.5 g de N:P:K y se regó diariamente para mantener el suelo cerca de la capacidad de campo. El pico de PAR en el invernadero fue de $1.400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; el fotoperíodo varió entre 12.5 y 13.5 h.

Tratamientos de UV-B

En el campo, las plantas se cultivaron en parcelas de 1 x 1.4 m cubiertas con filtros de plástico transparentes. Los filtros eran de dos tipos: poliéster transparente (Oeste Aislante, Buenos Aires; 0.1 mm de espesor), éstos filtran más del 90% del componente UV-B de la radiación solar (tratamiento de atenuación del UV-B); y una lámina de “Stretch” (Bemis Co., Minneapolis; 0.025 mm de espesor), éstas tienen una transmitancia muy alta en la región UV-B (tratamiento de UV-B cercano al ambiental). Ambos plásticos tienen alta transmitancia en las regiones del espectro correspondientes al UV-A y PAR (para los barridos espectrales y detalles, ver Mazza *et al.*, 2000). Se emplearon tres filtros por cada tratamiento experimental. Las exposiciones en el campo se realizaron durante el verano (Enero a Febrero) coincidentemente con el pico de crecimiento en las poblaciones naturales. Para minimizar la herbivoría natural sobre las plantas experimentales, se rodearon las parcelas con tul.

En el invernadero, se asignaron al azar las plantas en cada uno de los dos tratamientos: UV-B ambiental simulado y sin UV-B. La radiación UV-B se obtuvo con tres lámparas fluorescentes UV-B 313 (Q-Panel) filtrada a través de una capa de di-acetato de celulosa (JVC Plastics, Lemirada, CA) de 0.13 mm de espesor para remover los fotones de UV-C. En el tratamiento sin UV-B, se reemplazó la capa de di-acetato de celulosa por una hoja de poliéster transparente de 0.1 mm de espesor (ésta filtra tanto el UV-C como el UV-B). El di-acetato de celulosa se reemplazó cada 4 d. Se irradiaron las plantas durante 6 h. por día con el período de irradiación centrado en el mediodía solar. La dosis diaria biológicamente efectiva de UV, calculada el espectro de acción generalizado para plantas de Caldwell (Caldwell, 1971) normalizado a 300 nm, resultó de 9.9 kJ m^{-2} . Esta dosis es comparable con las dosis naturales de UV-B que recibieron las plantas de *N longiflora* y *N. attenuata* reciben en el solsticio de verano en sus áreas naturales de distribución en Argentina central y en el sudoeste de los Estados Unidos, respectivamente. Sin embargo es

difícil de establecer una comparación directa debido a que la salida de nuestras lámparas no se moduló para seguir las variaciones naturales del PAR en el invernáculo; consecuentemente, las relaciones UV-B a PAR probablemente hayan excedido los valores naturales durante los días nublados y /o en los extremos del período de irradiación de 6 h. Una inspección de las plantas al final del período de irradiación indicó que el tratamiento resultó efectivo en la inducción significativa de la acumulación de pigmentos fotoprotectores que absorben UV en la epidermis sin causar una marcada inhibición del crecimiento (18% de reducción en la altura de la planta; no hubo diferencias obvias en el área foliar; datos no mostrados). Así, el tratamiento de UV-B ambiental simulado puede ser visto como una aproximación razonable a la exposición natural al UV-B.

Tratamientos de herbivoría simulada

Para simular el daño por herbivoría (en los experimentos de microarreglos y de determinación de IP), se trataron tres hojas (de la tercera a la quinta) completamente expandidas de plantas en el estadio de roseta en todos los casos. Se practicaron tres filas de heridas puntuales con una ruedita metálica a cada lado de la nervadura central y se colocaron 20 μ l por hoja de una dilución 1:6 (v/v) de regurgitado de *M. sexta* recolectado de orugas del cuarto estadio sobre las heridas recién provocadas (tratamiento de herbivoría simulada).

Extracción de ARN

Ver sección de Materiales y Métodos del Capítulo 3 de esta tesis.

Microarreglos de cADN

El método usado para inmovilizar los genes que responden a *M. sexta* y a regurgitado y siete genes control de *N. attenuata* muy bien caracterizados (*IP*, *HAPL*, *PMT1*, *AOS*, *XET*, *WRKY*, la región 3' y 5' de *LOX*) sobre portaobjetos recubiertos de epoxy se describió en Halitschke *et al.* (2003). Para cada cADN se sintetizaron por PCR dos fragmentos para cada hebra, con una modificación C6 5-aminolink (Sigma-ARK, Darmstadt, Germany). Los fragmentos con número par (ver Tabla 1 suplementaria en CD correspondiente a esta tesis) llevan la modificación Aminolink en los primers TOP9-22, SMA4-23, o ASV6-22, mientras que los impares llevan la modificación en los primers TOP10-24, SMA3-22, o

ASV5-21. Todas las muestras de cADN, incluyendo los siete genes bien caracterizados inducibles por *M. sexta* como controles, se inmovilizaron comercialmente cuatro veces por Quantifoil Micro Tools GmbH de acuerdo a procedimientos estándar sobre los portaobjetos usando un robot equipado con seis puntas de impresión (Biorobotics MicroGrid II Microarrayer: Genemachine, Apogent Discoveries, Hudson, NH). Además cada gen estaba representado en el microarreglo por dos fragmentos de PCR independientes que subsecuentemente se inmovilizaron en cuadruplicado. Se puede encontrar una lista completa de las identidades de los productos de PCR inmovilizados en el microarreglo en Halitschke *et al.* (2003).

Muestreo, hibridación del microarreglo, cuantificación y análisis.

Se cosecharon las tres hojas tratadas de cada planta de los tratamientos de herbivoría simulada, tres hojas por planta de posiciones nodales equivalentes de cada planta sin dañar de los tratamientos de UV-B y tres hojas por plantas de las plantas no dañadas de los tratamientos de UV-B atenuado se cosecharon 24 h. después de aplicar el tratamiento de herbivoría simulada y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido. En cada experimento se emplearon 12 plantas individuales para cada tratamiento (cuatro de cada parcela replicada), y se agruparon las hojas provenientes de los mismos tratamientos para realizar las extracciones de ARN. Las muestras de UV-B y las muestras tratadas con herbivoría simulada se emplearon como tratamiento (Cy3) y las que no recibieron daño y las que no fueron expuestas al UV-B se marcaron e hibridaron como controles (Cy5). El aislamiento del mRNA, el marcado, la determinación de la eficiencia de marcado y la hibridación de los microarreglos se realizaron de la forma descrita en Halitschke *et al.* (2003). Los microarreglos hibridados se leyeron con un Affymetrix 428 Array Scanner (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA). El barrido, análisis de las imágenes, la corrección del ruido de fondo, la normalización específica de cada portaobjeto se llevó a cabo de la forma explicada en Halitschke *et al.* (2003). Las razones de las fluorescencias normalizadas para Cy3 y Cy5 de cada mancha individual (ER) y se calculó el promedio de las cuatro réplicas de cada cADN (dos por cada gen, ER1 y ER2). Las transformaciones logarítmicas de los ERs se sometieron a un test *t* de Student de una cola contra la hipótesis de no-efectividad del tratamiento (e.g. $ER_b = 1$).

Nuestro criterio para establecer la significancia en los cambios de expresión para un gen dado fue: (a) un valor significativo en el test de *t* Student en la comparación contra un ER = 1 ($n = 4$ spots replicados; $P < 0.05$), (b) una desviación de al menos ± 0.25 de ER = 1, y (c) la verificación de que los criterios (a) y (b) se cumplieran por los ERs obtenidos para ambos fragmentos de PCR (e.g. ER1 y ER2). Se empleó un umbral arbitrario por dos razones: primero, para dar cuenta de la normalización de los errores; y segundo, para dar cuenta del hecho de que los datos replicados no resultan de hibridaciones repetidas con los mismos ARNs sino de sondas inmovilizadas repetidas. Un ER calculado como el promedio de los ERs replicados y el uso de criterios estadísticos rigurosos para evaluar la varianza dentro de cada arreglo nos permite bajar los umbrales con este microarreglo de poliepóxido en comparación con los microarreglos de poly-Lys empleados en un estudio previo (Hui et al., 2003). Para evaluar nuestros criterios, se hibridaron dos arreglos con los mismos dos grupos de cADN (R. Halitschke y I. T. Baldwin, datos no publicados). Encontraron que 210 de 241 genes (87%) tenían la misma regulación identificados por los criterios descritos antes. De los 31 genes que no mostraron regulación consistente entre las dos hibridaciones repetidas, 24 tuvieron la misma dirección en el ER promedio, pero no cumplieron con los requerimientos estadísticos para considerar un cambio significativo.

Determinación de la actividad de IP

Los tratamientos de UV-B y de herbivoría simulada y los procedimientos de cosecha se realizaron como ya se describió para los experimentos de microarreglos. Los tratamientos de herbivoría simulada se aplicaron al principio de la tarde, y las hojas se cosecharon antes y varias veces luego de la estimulación, fueron congeladas en nitrógeno líquido. Se realizaron tres réplicas (tres plantas individuales) por tratamiento y por tiempo. Se determinó la actividad de IP en los extractos de hojas usando el método de Jongsma et al. (Jongsma *et al.*, 1993, Jongsma *et al.*, 1994; van Dam *et al.*, 2001). Los niveles de proteínas se determinando de acuerdo a Bradford (Bradford, 1976).

Bioensayos de crecimiento de insectos.

Los huevos de *M. sexta* se obtuvieron del departamento de entomología de la North Carolina State University (Raleigh). Se colocaron dos larvas neonatas sobre cada una de las 16 plantas de *N. longiflora*, y 20 plantas de *N. attenuata* cultivadas en condiciones de

invernadero (ver antes). Se colocaron las dos orugas en la misma hoja (cuarta-quinta hoja completamente expandida de las plantas en estadio de roseta). La mitad de las plantas de cada especie había recibido suplementación con UV-B por al menos dos semanas antes de que las orugas fuesen colocadas sobre ellas, y la otra mitad no recibió UV-B siendo las plantas control. El tratamiento de UV-B continuó durante el período de alimentación (1 semana). Para impedir la exposición directa de las orugas al UV-B, la hoja huésped de cada planta se encerró en una bolsa de tela de algodón que tenía la parte superior cubierta de papel de aluminio. Estas bolsas se emplearon tanto en las plantas expuesta al UV-B como en las que no lo fueron. Las orugas se pesaron al final del experimento.

Materiales y métodos Capítulo 5

Cultivo de las plantas

Se cultivaron plántulas (en macetas individuales de 0.5 L.) durante 4 semanas en un invernadero en Buenos Aires (34° S), recibiendo sólo la radiación natural, luego se transfirieron a los tratamientos experimentales de UV-B dentro del mismo invernáculo. Hubo tres grupos independientes de plantas (réplicas). Durante el período en que las plantas permanecieron bajo las lámparas de UV-B (tres semanas), se fertilizó una vez con 0.5 g de N:P:K y se regó diariamente para mantener el suelo cerca de la capacidad de campo. El pico de PAR en el invernadero fue de $1.400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; el fotoperíodo varió entre 12.5 y 13.5 h.

Tratamiento de UV-B

Se realizaron de acuerdo a lo detallado en Materiales y Métodos del Capítulo 4 correspondiente a los tratamientos de invernáculo.

Tratamientos de herbivoría simulada

Se realizaron de acuerdo a lo detallado en Materiales y Métodos del Capítulo 4.

Muestreos y extracción para análisis químicos

Se cosecharon las hojas dañadas de las plantas que recibieron herbivoría simulada y las hojas sin dañar de los controles respectivos correspondientes a posiciones nodales equivalentes. Las hojas fueron divididas en mitades y la nervadura central fue removida. El tejido fue inmediatamente congelado en nitrógeno líquido.

El material vegetal fue pulverizado en nitrógeno líquido y colocado en un tubo de centrífuga. Las muestras se extrajeron agitando vigorosamente durante dos horas con 1.5 mL de MeOH acuoso 40 % conteniendo 0.5 % de ácido acético. Luego de la centrifugación (12 min, 13.000 r.p.m.) se recuperó el sobrenadante y fue empleado para la determinación de los compuestos fenólicos.

Mediciones por HPLC y espectrometría de masas.

La separación e identificación de los compuestos se realizó de acuerdo a Roda *et al.* (Roda *et al.*, 2003).

Se registró el espectro de masas ESI positivo y la fragmentación de los compuestos llevó a la determinación de la estructura de la dicafeilespermidina, para el ácido clorogénico y rutina, además se compararon los tiempos de retención y los espectros UV determinados por Keinänen *et al.* (Keinänen *et al.*, 2001).

Materiales y Métodos Capítulo 6

Cultivo de plantas y diseño experimental

Se obtuvieron semillas de *Nicotiana Longiflora* a partir de poblaciones salvajes que crecían cerca del lago La Falda, en el Valle de Punilla (Córdoba, Argentina central). Las semillas fueron puestas a germinar en placas de agar (0.8% W/W), bajo luz blanca. Se transfirieron las plantas de una semana de edad a macetas de 1.5 L conteniendo una mezcla de suelo estándar y perlita (3:1). Las plantas fueron cultivadas en invernadero durante cuatro semanas. Luego fueron transferidas a los tratamientos lumínicos correspondientes.

Para la mayoría de las determinaciones, se usó un diseño experimental factorial, con dos niveles del factor “Luz” (Ambiente y RL, ver más abajo) y dos niveles del factor “Herbivoría simulada” (Daño + Regurgitado y control, ver más adelante).

Tratamientos lumínicos

Las plantas fueron mantenidas en el invernadero con luz natural ambiental. Fueron alineadas frente a un banco de lámparas incandescentes (se colocaron recipientes de vidrio abiertos conteniendo agua para absorber el calor proveniente de las lámparas). Frente a las lámparas se colocaron filtros opacos (tratamiento Ambiente) o bien una combinación de filtros de acrílico azules y rojos (2 mm cada uno, Paolini 2031, Buenos Aires, Argentina) para el tratamiento de radiación RL suplementaria (tratamiento RL) (Fig. 6.1A). Los arreglos de lámparas fueron efectivos en modular las relaciones R:RL (Fig. 6.1B). Se usó un radiómetro Skye SKR100/SKR110 (Skye Instruments, Ltd., UK) para medir las relaciones R:RL. No se registraron diferencias en la temperatura del aire asociadas a los tratamientos lumínicos. La eficiencia de los tratamientos luminosos se estimó midiendo los ángulos de las hojas (Fig. 6.1A y Fig. 6.1C).

Tratamientos de herbivoría simulada

Se realizaron de la misma forma que en la sección Materiales y Métodos correspondiente al Capítulo 4 de la presente tesis.

Bioensayos de crecimiento de insectos

Se obtuvieron larvas de *Manduca sexta* de poblaciones naturales del campo experimental del IFEVA. La colonia fue mantenida en dieta artificial. Para los bioensayos se colocaron tres neonatos en las plantas provenientes de los dos tratamientos (seis plantas por tratamiento); se midió la ganancia de peso luego de seis días de alimentación continua sobre las plantas que continuaban recibiendo los tratamientos lumínicos.

Muestreos para análisis químicos

Se tomaron muestras de discos de hoja (28 mm² cada uno) de las cuatro combinaciones de tratamientos (12 días bajo los tratamientos lumínicos y cuatro días después del tratamiento de herbivoría simulada) para la medición de los compuestos fenólicos totales (A₃₀₅). El tejido remanente de las hojas se dividió en dos mitades y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Una mitad se usó para las determinaciones de fenólicos por HPLC, mientras que la otra mitad fue empleada para las determinaciones de carbono y nitrógeno.

Determinaciones de Compuestos Fenólicos

El grueso de los fenólicos se estimó a partir de su absorbancia a 305 nm en extractos metanólicos acidificados. Cada disco de hoja se extrajo durante tres días en 1.4 mL de metanol:HCl (99:1) a -20 °C. Se midió la absorbancia de los extractos crudos.

La extracción de los compuestos fenólicos para los análisis de HPLC se realizó de acuerdo a Keinänen *et al.* (2001). La separación e identificación de los compuestos se realizó de acuerdo a Roda *et al.* (2003). La confirmación de los compuestos rutina y ácido clorogénico se obtuvo comparando los tiempos de retención y el espectro UV de compuestos de referencia puros (Sigma). A través del espectro de masas ESI positivo de uno de los picos y su patrón de fragmentación se determinó que el compuesto es un conjugado del kaempferol.

Determinaciones de Carbono y Nitrógeno

Las concentraciones totales de Carbono (C) y Nitrógeno (N) del material vegetal se

determinaron por combustión seca de Dumas (Sollins *et al.*, 1999), usando un analizador elemental Carlo-Erba (CE Elantech NC 2100, ThermoQuest, Italia, Milano). Antes del análisis las muestras fueron secadas a 60°C durante 48 h y fueron molidas finamente para que pasen por un tamiz de 40 micrones.

Determinaciones de Actividad de IP

Se realizaron de la misma forma que la descrita en Materiales y Métodos correspondiente al Capítulo 4.

Extracciones de RNA

Fueron realizadas de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos correspondiente al Capítulo 3.

Muestreo, hibridación del microarreglo, cuantificación y análisis.

Se cosecharon hojas de 10 plantas que recibieron radiación RL suplementaria y de 10 plantas control ubicadas en posiciones nodales equivalentes a las del experimento de herbivoría. La cosecha se realizó a los seis días de iniciado el tratamiento luminoso. En un experimento independiente se cosecharon las dos hojas tratadas de cada planta de los tratamientos de herbivoría simulada, dos hojas por planta de posiciones nodales equivalentes de cada planta sin dañar. La cosecha se realizó a las 24 hs. de la aplicación del tratamiento de herbivoría simulada. Se emplearon 12 plantas por tratamiento.

Luego de cosechadas las hojas de cada tratamiento se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Para las extracciones de ARN se agruparon todas las hojas provenientes del mismo tratamiento. Las muestras de RL y de herbivoría simulada se emplearon como tratamiento, siendo marcadas con Cy3 y los controles respectivos se marcaron con Cy5. El aislamiento del mRNA, el marcado, la determinación de la eficiencia de marcado y la hibridación de los microarreglos se realizaron como se describió en Halitschke *et al.* (2003). La selección de genes, el diseño de los arreglos y los criterios para considerar a un gen como regulado se describen en Heidel y Baldwin (Heidel y Baldwin, 2004).

CAPÍTULO 3

Introducción

La radiación UV-B solar puede tener múltiples efectos sobre las plantas y ecosistemas terrestres (Caldwell *et al.*, 2003). Estudios de campo han mostrado que una de las influencias más notorias del UV-B solar se da en el plano de las interacciones entre plantas e insectos. Las plantas que crecen expuestas al UV-B solar son frecuentemente menos atacadas por insectos masticadores que las que crecen bajo niveles atenuados de UV-B, habiéndose documentado efectos similares en ecosistemas nativos de Tierra del Fuego (Rousseaux *et al.*, 1998; Rousseaux *et al.*, 2001) y en cultivos de diversas especies en Buenos Aires (Ballaré *et al.*, 1996; Mazza *et al.*, 1999a; Zavala *et al.*, 2001). Otros autores han detectado efectos comparables del UV-B solar en sistemas acuáticos (i.g., Bothwell *et al.*, 1994; Williamson *et al.*, 1994; Helbling y Zagarese, 2003).

La influencia del UV-B solar reduciendo los niveles de herbivoría por insectos masticadores podría estar causada al menos por dos tipos de mecanismos: (1) efectos directos del UV-B solar sobre la biología o conducta de los insectos, y (2), efectos del UV-B solar sobre atributos de las plantas, que indirectamente afectan la conducta o crecimiento de los insectos. Existen evidencias que demuestran que los efectos directos juegan un rol en condiciones naturales (Bothwell *et al.*, 1994; Mazza *et al.*, 1999b; Mazza *et al.*, 2002). Por otro lado, la existencia de efectos indirectos también ha sido documentada a través de bioensayos en los que se emplearon plantas tratadas con o sin UV-B como fuente de alimento para distintas especies de insectos masticadores. En experimentos en los que se emplearon fuentes artificiales de UV-B para irradiar las plantas, se han observado efectos positivos y negativos del tratamiento UV-B sobre el crecimiento de los insectos (e.g., Hatcher y Paul, 1994; McCloud y Berenbaum, 1994). En los experimentos en los que se estudió la influencia del UV-B solar, los resultados han mostrado efectos predominantemente negativos del UV-B solar sobre la intensidad de la herbivoría (Ballaré *et al.*, 1996; Rousseaux *et al.*, 1998; Mazza *et al.*, 1999b) y el ritmo de crecimiento de los insectos (Zavala *et al.*, 2001).

La naturaleza de los cambios que el UV-B solar induce en las plantas y que a su vez afectan a los insectos es por el momento desconocida. En algunos casos se ha atribuido el efecto negativo del UV-B sobre el crecimiento de los insectos a una potenciación en la acumulación de furanocumarinas (McCloud y Berenbaum, 1994). Sin embargo, esta explicación sería aplicable solamente a aquellas especies de plantas capaces de producir estas fototoxinas. También se ha especulado con la idea de que cambios en el contenido de N de las hojas, causados por la exposición al UV-B, podrían jugar algún rol (Hatcher y Paul, 1994). Esta explicación tampoco podría generalizarse ya que el nivel de N foliar es poco afectado por dosis naturales de UV-B. Estudios más recientes con cultivos celulares y plántulas de tomate han mostrado que el UV, al menos en dosis elevadas, puede promover la expresión de genes de inhibidores de proteinasas insectiles (IPs) (Conconi *et al.*, 1996; Stratmann *et al.*, 2000). Estos inhibidores son normalmente sintetizados por las plantas en respuesta al ataque de insectos a través de una cadena de señalización que involucra al ácido jasmónico (JA, por sus siglas en inglés) (Ryan, 2000). Los IPs tendrían por función inhibir las proteasas digestivas de los insectos, reduciendo el ritmo de crecimiento y aumentando la mortalidad de los animales. Estos resultados sugieren que una de las acciones del UV-B sería la de potenciar mecanismos de defensa que son normalmente activados por el daño mecánico y por estimulantes insectiles. No se cuenta por el momento con resultados de experimentos de campo que permitan evaluar el significado de estos mecanismos en condiciones naturales, y tampoco está claro en qué punto/s se producen las interacciones entre las cadenas de señalización disparadas por el ataque de insectos y las activadas en respuesta al UV-B.

Los experimentos de campo que se detallan en la sección siguiente fueron diseñados para evaluar el impacto del UV-B sobre el crecimiento de un insecto masticador en un cultivo de tomate. El tomate (*Lycopersicon esculentum*) resulta un modelo interesante porque se dispone de mutantes deficientes tanto en la biosíntesis (*def1*) (Lightner *et al.*, 1993; Howe *et al.*, 1996) como en la percepción (*jai1*) (Li *et al.*, 2001) de JA. La mutante *def1* sintetiza pocas cantidades de JA, pero algunas veces esto alcanza para observar una acumulación pequeña de proteínas de defensa (Ryan y Pearce, 1998), mientras que en la mutante *jai1* es incapaz de sintetizarlas (Li *et al.*, 2001). La variedad salvaje (Castlemart) utilizada en estos experimentos es la línea madre de los mutantes mencionados.

Los Materiales y Métodos empleados en esta sección se describen en detalle en la sección de Materiales y Métodos correspondientes al Capítulo 3.

Resultados

El UV-B solar reduce la incidencia de la herbivoría de insectos en plantas de tomate cultivadas en el campo

En el campo experimental del IFEVA, establecimos un cultivo de tomate del tipo salvaje (Castlemart), en parcelas replicadas con niveles de UV-B cercanos a los ambientales (tratamiento UV-B +) o con el componente UV-B de la radiación solar excluido por filtros especiales (tratamiento UV-B -, por detalles ver Materiales y Métodos). Las plantas fueron naturalmente colonizadas por los insectos que normalmente se encuentran en la zona. De las especies encontradas sobre las plantas de tomate (ver Materiales y Métodos) decidimos tomar a los trips (*Frankliniella sp.* Thysanoptera: Thripidae) como organismo de estudio debido a su ubicuidad y el daño característico que provocan en las hojas. Se contó el número de insectos y se estimó el daño que éstos provocaron. La densidad de trips resultó menor en las plantas que recibieron radiación UV-B solar que en las plantas en donde el componente UV-B de la radiación solar fue excluido (Fig. 3.1A). En experimentos realizados con otro género de trips (*Caliothrips phaseoli*, Thysanoptera: Thripidae) se mostró que éstos insectos son capaces de percibir la radiación UV-B y reaccionar comportamentalmente evitando los sitios expuestos a este tipo de radiación (Mazza *et al.*, 2000). Es interesante notar que en nuestro sistema, estudiando otro género de trips, observamos una preferencia marcada por los ambientes en donde el UV-B no está presente. Por nuestro diseño experimental no nos fue posible discriminar si el efecto sobre la conducta de los insectos estuvo dominado por la percepción directa del UV-B, o por los cambios experimentados por la planta en respuesta a la radiación. El número de folíolos dañados (Fig. 3.1B) y el área consumida (Fig. 3.1C) resultaron mayores en las plantas que recibieron radiación solar con el componente UV-B atenuado. Los resultados obtenidos que muestran que el UV-B solar puede reducir la herbivoría en tomate

concuerdan con los publicados para otras especies vegetales (Ballaré *et al.*, 1996; Mazza *et al.*, 1999).

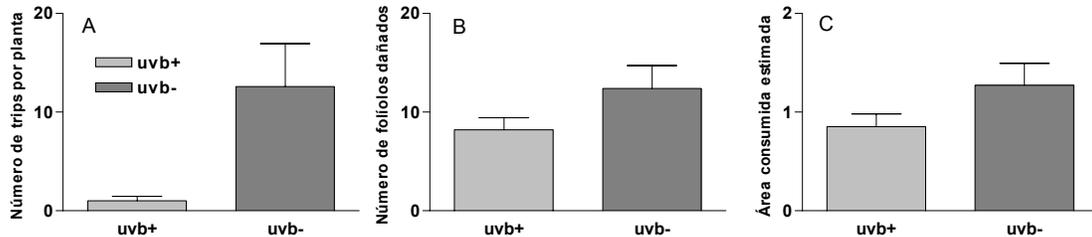


Figura 3.1: Efecto del UV-B solar en plantas del genotipo salvaje sobre A) comportamiento de los trips, B) distribución del daño en la planta, y C) consumo de tejido.

El UV-B solar afecta el crecimiento de las orugas de *Spodoptera eridania* en el campo

Diseñamos un bioensayo con el propósito de estudiar si el UV-B puede afectar el crecimiento de insectos masticadores. Cultivamos plantas de tomate de la variedad salvaje en el campo de la misma forma que la descrita en la sección anterior. Colocamos dos orugas neonatas sobre una hoja de cada planta de los dos tratamientos lumínicos. Cubrimos la hoja con una bolsa de tela (por detalles ver Materiales y Métodos) para evitar los efectos directos que pudiese tener la radiación UV-B sobre los insectos. Al cabo de siete días las orugas fueron pesadas. La figura 3.2 muestra que el crecimiento de *S. eridania* se ve retardado cuando las orugas se alimentan con plantas que han sido expuestas al UV-B solar.

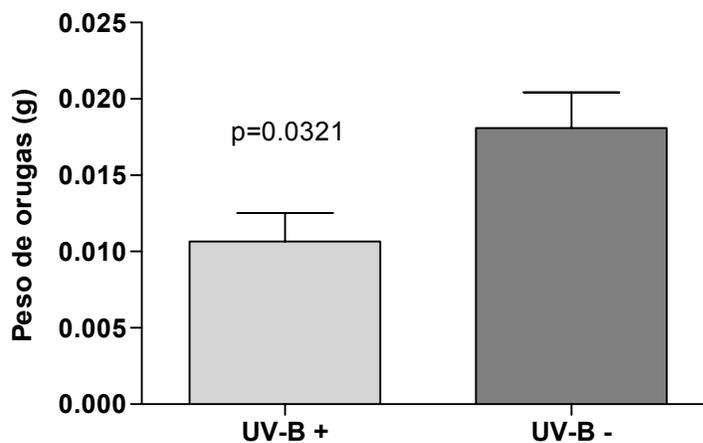


Figura 3.2: Efecto del UV-B solar sobre el crecimiento de *S. eridania* en el genotipo salvaje.

El UV-B solar incrementa las respuestas de defensa dependientes de JA

Algunos experimentos de laboratorio indican que las dosis altas de UV-B pueden activar componentes de la vía de señalización de la sistemina, llevando a la expresión incrementada de los IPs inducibles por daño (Stratmann *et al.*, 2000). Examinamos entonces los efectos de la herbivoría y del UV-B solar sobre la acumulación de los transcritos de IP. En las plantas salvajes, los niveles de mRNA de IP se vieron fuertemente aumentados por la alimentación de *S. eridania* (Fig. 3.3). El UV-B no pudo provocar esta respuesta por sí mismo, pero se observó un efecto sinérgico cuando se aplicó concomitantemente con la alimentación de *S. eridania* (Fig. 3.3). El efecto del UV-B potenciando la respuesta de daño se pudo detectar en dos de tres experimentos realizados (experimentos #1 y #2), mientras que en el experimento restante (experimento #3) el UV-B causó una disminución marginal en la acumulación del mRNA de IP II (Fig. 3.3).

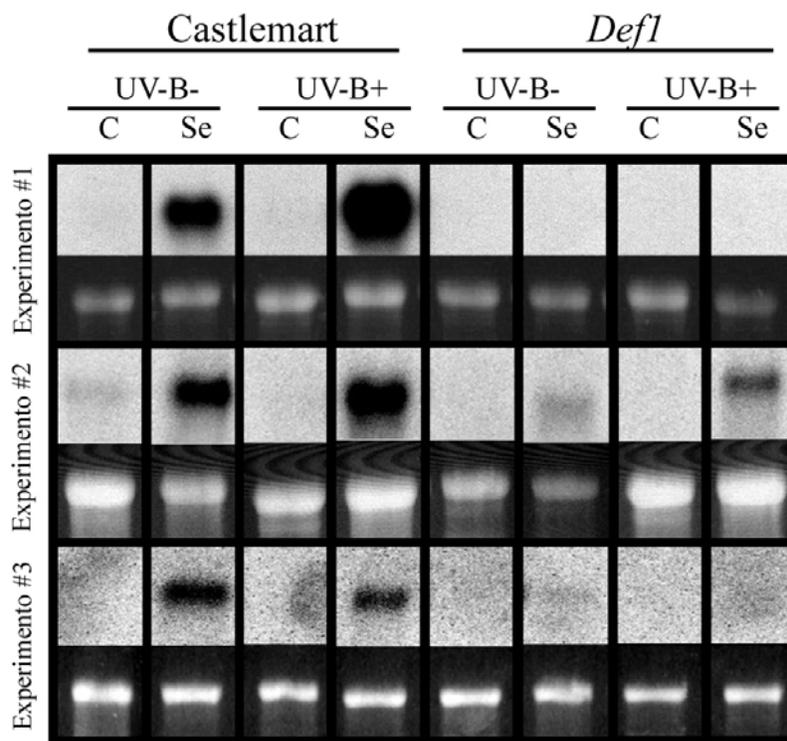


Figura 3.3: Efecto de la herbivoría y la radiación UV-B sobre la expresión de mensajeros de IP II en plantas de tomate del genotipo salvaje y del mutante *defl*. Se: herbivoría por *S. eridania*; C: control.

En algunos de los experimentos realizados detectamos la presencia de niveles muy reducidos del mensajero de IP II en la mutante *def1* en respuesta a la herbivoría, en donde se observa también la potenciación por UV-B.

DEF1 y JAI1 son esenciales para la expresión del efecto antiherbívoro del UV-B

La observación de que la exposición de las plantas al UV-B solar potencia la expresión del gen de IP II podría proveer una explicación funcional para el efecto antiherbívoro del UV-B. Los experimentos mostrados en la figura 3.3 señalan que la mutante *def1* es capaz de sintetizar mensajeros de IP II en respuesta a la herbivoría y, al igual que en las plantas salvajes, el UV-B potencia la acumulación de mensajero de IP II. La mutante *jai1* no sintetiza mensajeros de IP en respuesta a la herbivoría o a la radiación UV-B (datos no mostrados). El hecho de que la mutante *def1* retenga en parte su capacidad de responder a la herbivoría y al UV-B, podría estar implicando que los bajos niveles remanentes de JA en esta planta sean suficientes para señalar la inducción de mensajeros de proteínas defensivas. Otra posibilidad es que el efecto del UV-B sea canalizado por otra vía. Pusimos a prueba esta hipótesis mediante un bioensayo del mismo tipo del que se describió anteriormente. Empleamos el genotipo salvaje, la mutante *def1* y la mutante *jai1*. El crecimiento de las orugas fue más rápido cuando las orugas se alimentaron con plantas *def1* y *jai1* que cuando lo hicieron con plantas salvajes, confirmando el rol fundamental de las defensas dependientes de JA en el control de la herbivoría de insectos (Fig. 3.4).

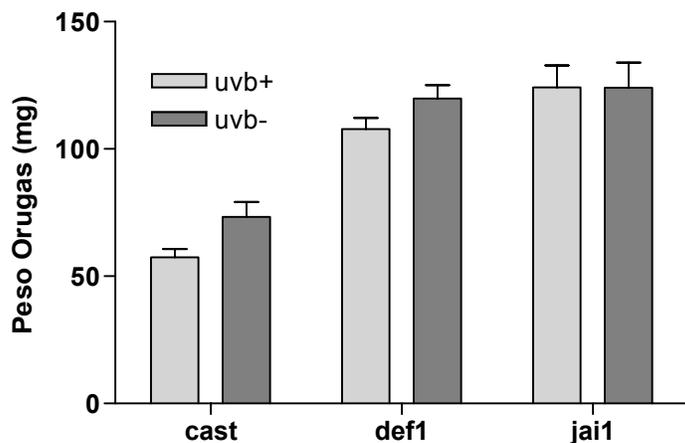


Figura 3.4: Efecto del UV-B y de tres genotipos de tomate sobre el crecimiento de *S. eridania*.

El efecto del UV-B disminuyendo el crecimiento de las orugas puede verse claramente en el genotipo salvaje; mientras que en la mutante *defl* este efecto es menos marcado y en la mutante *jail* desaparece por completo (Fig. 3.4).

Cuantificamos los niveles de mensajeros de IP II presentes en cada genotipo en respuesta a los tratamientos de herbivoría y UV-B y realizamos una correlación con el peso ganado por las larvas de *S. eridania*. El resultado, que se grafica en la figura 3.5, muestra que a medida que aumenta la concentración de mensajeros de IP II disminuye la ganancia de peso obtenida por *S. eridania*. Estos hallazgos estarían indicando que el UV-B podría estar actuando a través de la vía de defensa dependiente de jasmónico.

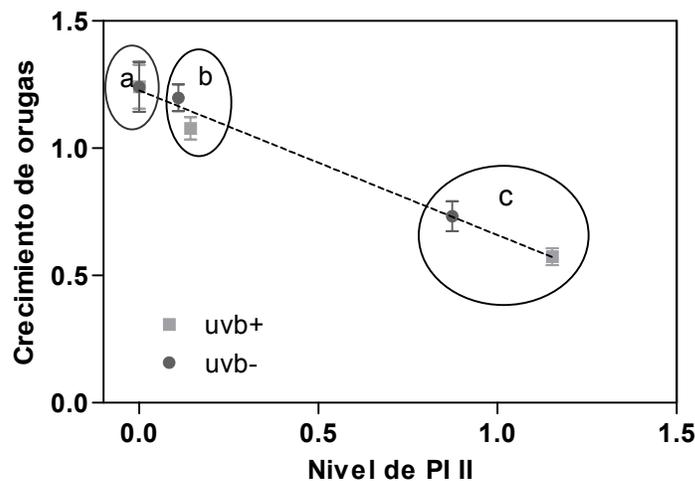


Figura 2.5: Correlación entre los niveles de mRNA de IP II y el crecimiento de orugas de *S. eridania*. Las letras a, b y c representan los valores obtenidos para *jail*, *defl* y el genotipo salvaje respectivamente.

Conclusiones

Los resultados de los experimentos mostrados en este capítulo sugieren que la exposición de las plantas al UV-B solar reduce la herbivoría por insectos. En los ensayos aquí presentados se puede ver que cuando los insectos pueden moverse libremente, como fue el caso de los trips, eligen las plantas protegidas del componente UV-B de la radiación solar. En los experimentos manipulativos realizados con *S. eridania* documentamos que,

cuando las plantas de tomate fueron expuestas al UV-B solar, el crecimiento de las larvas se vio retrasado. Este efecto, aunque de manera menos notoria, se mantuvo en la mutante *defl* y se perdió por completo en la mutante *jail*. Estos resultados sugieren que el la acción antiherbívoro del UV-B estaría mediada por la vía de defensa dependiente del JA. El mecanismo mediante el cual el UV-B estaría ejerciendo su efecto sería mediante la potenciación de la expresión de proteínas defensivas desencadenada por la herbivoría.

CAPÍTULO 4

Introducción

El UV-B induce respuestas múltiples en las plantas terrestres. Estas respuestas se estudiaron usando una variedad de aproximaciones experimentales, desde experimentos en ambientes controlados hasta ensayos a gran escala en campo, cubriendo un amplio espectro de escalas, desde el nivel molecular hasta procesos a nivel del ecosistema.

La naturaleza de estos cambios es desconocida. En bioensayos funcionales se detectaron efectos significativos del UV-B sobre la calidad de los tejidos de las plantas en ausencia de cualquier efecto del UV-B sobre el crecimiento general de la planta, en el nitrógeno total (N), en el grosor del tejido, o en el contenido de lignina (Ballaré *et al.*, 1999; Zavala *et al.*, 2001).

Las plantas a menudo activan una batería de mecanismos de defensa en respuesta al ataque por herbívoros, las que aumentan sus posibilidades de sobrevivir futuros ataques por la misma o por otra especie de herbívoros (Karban y Baldwin, 1997). Las moléculas usadas en la defensa de las plantas varían ampliamente entre los distintos taxones de plantas pero frecuentemente incluyen compuestos secundarios tales como los fenilpropanoides, alcaloides, terpenos y proteínas de defensa tales como los inhibidores de proteinasas (PIs; ver revisión de Gatehouse, 2002). Se sabe que las oxilipinas, incluyendo al ácido jasmónico (JA), producidas a través de la vía de los octadecanoides (Weber, 2002), juegan un papel central como moléculas de señalización mediadoras de las respuestas de la planta a los insectos herbívoros, incluyendo la producción de IP y de metabolitos secundarios relacionados con defensa (Ryan, 2000; Walling, 2000; Gatehouse, 2002). Resulta interesante que, los estudios en ambientes controlados con *Arabidopsis* mostraron que el UV-B provisto contra un fondo de bajo PAR (aproximadamente 1:10 del solar), puede desencadenar la acumulación de JA (A.-H.-Mackerness *et al.*, 1999b). En tomate (*Lycopersicon esculentum*), los tratamientos de UV-B no aumentan los niveles de JA (Stratmann *et al.*, 2000), pero sí se reportó la acumulación de IP en respuestas a tratamientos con UV-C germicida (Conconi *et al.*, 1996). Stratmann y colaboradores.

(2000) concluyeron que en tomate los tratamientos con UV-B/A no inducen IP por sí mismos, pero pueden incrementar la inducción de IP producida por el daño mecánico.

Quisimos determinar si los efectos del UV-B solar sobre la resistencia de plantas cultivadas en el campo están mediadas por la estimulación de respuestas de defensa similares a las inducidas por el ataque de un insecto. Como primera aproximación en esta dirección, intentamos identificar los genes involucrados en la respuesta de plantas de *Nicotiana longiflora* cultivadas en el campo al UV-B solar usando microarreglos de ADN diseñados especialmente, que contenían aproximadamente 250 genes de los cuales se sabe que son regulados en respuesta al ataque por larvas masticadoras de *Manduca sexta* (Halitschke *et al.*, 2003). En principio estudiamos las diferencias transcripcionales entre las plantas expuestas al UV-B ambiental y las plantas que crecieron bajo filtros que atenúan selectivamente el componente UV-B de la radiación solar. Luego comparamos la respuesta transcripcional al UV-B con la provocada por un tratamiento que simulaba la herbivoría por *M. sexta*.

Resultados

Diseño experimental y aplicación de un microarreglo de cDNA para estudiar los impactos del UV-B sobre genes relacionados con defensa.

El método usado para fijar los fragmentos de PCR de los genes de *N. attenuata* que responden al ataque de insectos sobre portaobjetos cubiertos de epoxy fue descrito en Halitschke *et al.* (2003).

Los microarreglos contenían genes de *N. attenuata* conocidos por su expresión diferencial en respuesta a: (a) la herbivoría por *M. sexta* (plantas atacadas por *M. sexta* versus controles intactos, cosechados 24 hs. después del comienzo de la ingesta) identificados por “differential display reverse transcription-PCR” y por la técnica de hibridación substractiva (Hermsmeier *et al.*, 2001; Hui *et al.*, 2003), y (b) secreciones orales de *M. sexta* y regurgitados (heridas tratadas con regurgitado versus un control dañado, cosechados 24 hs. luego de la producción del daño) por análisis de cDNA amplified fragment length polymorphism (Halitschke *et al.*, 2003). Además los microarreglos contenían sondas para genes controles muy bien caracterizados para *N.*

attenuata implicados en la defensa de la planta: *IP* (inhibidor de serín proteinasas), *HPL* (hidroperóxido liasa), *PMTI* (putrescina metil transferasa), *AOS* (alen óxido sintasa), *XET-B1* (xiloglucano endo-transglicosilasa B1), y *WRKY-2* (factor de transcripción *WRKY*; Halitschke *et al.*, 2003). Estudios independientes de estos microarreglos que comparaban el efecto del daño versus daño + regurgitado (Halitschke *et al.*, 2003) y plantas atacadas por *M. sexta* versus plantas intactas (Voelckel y Baldwin, 2003) mostraron que los patrones de expresión de los genes son altamente consistentes con los detectados usando otras técnicas de expresión diferencial, estableciendo de esta manera la confiabilidad del sistema.

Para nuestros experimentos de campo, usamos plantas de cinco semanas de edad de *N. longiflora*, una especie salvaje nativa de la región central de Argentina que está emparentada con *N. attenuata*. Se cultivaron las plantas en parcelas replicadas durante 3 semanas en un sitio de estudio en Córdoba, bajo radiación UV-B solar cercana a la ambiental o atenuada (ver en materiales y métodos la descripción completa del diseño experimental y las condiciones de cultivo). En el momento de la cosecha las plantas estaban aún en el estadio de roseta, y no se observaron diferencias entre los tratamientos de UV-B sobre el crecimiento y morfología de las plantas, estas observaciones son consistentes con los resultados obtenidos en el campo para otras especies de Solanáceas expuestas por períodos cortos a tratamientos de UV-B similares (Ballaré *et al.*, 1996). La mitad de las plantas se expusieron a un tratamiento de herbivoría simulada, en el cual las hojas se dañaron y las heridas se trataron con regurgitado de *M. sexta*. Se sabe que este tratamiento (por detalles ver materiales y métodos) provoca respuestas transcripcionales que son similares a las inducidas por la herbivoría de *M. sexta* (Hermsmeier *et al.*, 2001; Schittko *et al.*, 2001). Se cosecharon muestras de hojas a las 24 hs del tratamiento de herbivoría simulada.

El UV-B solar regula negativamente la expresión de varios genes fotosintéticos y regula positivamente la expresión de genes implicados en respuestas de defensa bióticas.

De los 241 genes que responden a *M. sexta*, regurgitado y controles incluidos en el microarreglo, 48 revelaron una expresión diferencial en respuesta al UV-B solar en las plantas de *N. longiflora* que crecieron en el campo (Fig. 4.1; Tabla 4.I). Los genes incluidos en el arreglo se agruparon en grupos funcionales basados en la función conocida o deducida

Tabla I: Resumen de los efectos significativos de la exposición al UV-B solar sobre la expresión de genes en *N. longiflora* (ver Materiales y Métodos por una explicación de los criterios usados para obtener la significancia de los cambios en la expresión). En breve, se muestra el promedio de las relaciones de expresión obtenidas con las dos sondas para cada gen. La lista completa está disponible como Tabla adicional disponible en la versión electrónica de esta tesis.

ID #	Descripción (nombre o similaridad de secuencia)	Clon	# de Acceso	Media
	Fotosíntesis			
1406/7	<i>L. esculentum</i> lhbc1 gen para LHCII tipo III	61_1	AW191826	0.55
1414/5	<i>N. silvestris</i> mRNA para la subunidad de la ribulosa bisfosfate carboxilasa	64_7	AW191829	0.61
1548/9	<i>H. brasiliensis</i> latex plastidic aldolase-like protein mRNA	RE234	CA591767	0.68
1552/3	<i>N. tabacum</i> photosystem II oxygen evolving complex 23 kDa polypeptide	RE283	CA591769	1.80
1562/3	<i>S. oleracea</i> mRNA for 6.1 kDa polypeptide of photosystem II	RN032	CA591774	0.65
1584/5	Tobacco ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit pseudogene	RF071	CA591784	0.55
1608/9	<i>N. tabacum</i> photosystem II (NtP110/ 11)	DH108	CA591793	0.51
1612/3	Tobacco ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit pseudogene	DH120	CA591795	0.52
1615	<i>N. tabacum</i> GapC mRNA for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	DH123	CA591796	0.64
	Metabolismo del nitrógeno			
2400/1	<i>S. oleracea</i> ferredoxin-dependent glutamate synthase precursor	55_2	AW191824	1.87
2403	<i>N. plumbaginifolia</i> molybdopterín synthase sulphurylase gene	55_7	AW191825	1.38
2560/1	<i>L. esculentum</i> mRNA for beta-alanine synthase	RN021	CA591773	0.71
	Metabolismo de carbohidratos y pared celular			
3446/7	<i>L. esculentum</i> xyloglucan endo-transglycosylase B1 mRNA (XET)	RB271	CA591719	1.28
	Transporte de membrana			
4774/5	<i>P. sativum</i> mRNA for pore protein	DH47	CA591865	0.60
	Factores de transcripción			
5556/7	<i>N. tabacum</i> mRNA for transcription factor NtWRKY2	RE322	CA591771	1.90
5678/9	<i>N. attenuata</i> WRKY (NtWRKY2)	WRKY	CA591771	2.20
	Síntesis de oxilipinas			
8382	<i>N. attenuata</i> (DIOX_NICAT) pathogen-inducible alpha-dioxygenase	DH54	CA591872	1.45
8668/9	<i>N. attenuata</i> HPL	HPL	AJ414400	1.53
8672/3	<i>N. attenuata</i> LOX	LOX	AY184822	2.32
8674/5	<i>N. attenuata</i> AOS	AOS	AJ295274	1.72
	Inhibidores de proteinasas			
9666/7	<i>N. attenuata</i> proteinase inhibitor (IP)	IP	AY184823	0.60
	Genes de respuesta a patógenos			
10652/3	<i>N. tabacum</i> gene for basic form of pathogenesis-related protein	DH099	CA591812	0.41
	Genes de respuesta a <i>M. sexta</i> de función desconocida			
11330/1	<i>C. annuum</i> (Yolo Wonder) Sn-1 gene	6_1	AW191805	1.39
11340/1	unknown	11_1/5	AW191807	1.33
11398/9	unknown	54_4		0.64
11426/7	unknown	75_7		1.32
11450/1	unknown	RB332		1.63
11496/7	unknown	RC131		1.57
11500/1	unknown	RC173		1.77
11518/9	unknown	RD105		1.33
11524/5	unknown	RD151		0.66
11534/5	unknown	RE065		1.32
11544/5	unknown	RE214		1.47
11590/1	unknown	RF101		0.73
11616/7	unknown	DH135		1.36
11620/1	<i>A. thaliana</i> putative 60S ribosomal protein (At3g49910) mRNA	DH138		0.60
	Genes de respuesta a regurgitado de función desconocida			
12730/1	<i>N. tabacum</i> mRNA C-7	DH25	CA591843	1.35
12736/7	unknown	DH28		1.91
12750/1	unknown	DH35		0.64
12776/7	<i>N. tabacum</i> chloroplast genome DNA	DH48	CA591866	1.81
12786/7	unknown	DH53		0.59
12798/9	unknown	DH59		0.72
	Otros			
13412/3	<i>M. zapota</i> 18S ribosomal RNA gene	64_4	AW191828	1.32
13464/5	<i>N. aromaticovorans</i> Saro_115	RB493	CA591728	2.07
13582/3	<i>Smilax bona-nox</i> large subunit ribosomal RNA gene	RF064	CA591783	1.41
13626/7	Tobacco RNA-binding glycine-rich protein (RGP-1a) mRNA	DH162	CA591801	0.62
13656/7	<i>N. tabacum</i> GTP-binding protein (Ran-A1) mRNA	DH124	CA591814	0.70
13728/9	<i>N. tabacum</i> chloroplast genome DNA	DH24	CA591842	1.51

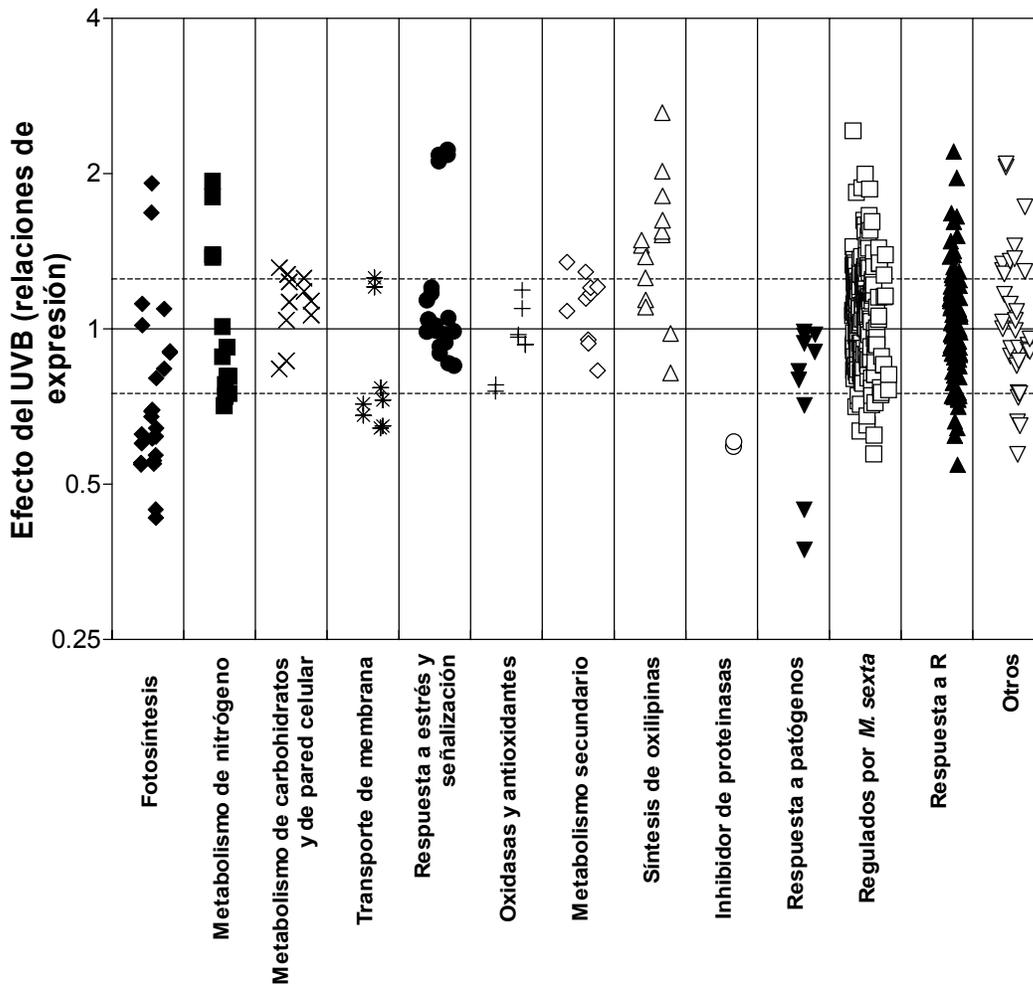


Figura 4.1: Efecto de la exposición crónica al UV-B ambiental sobre la abundancia de transcritos de los genes que responden a insectos en plantas de *N. longiflora*. La relación de expresión (RE) indica la abundancia de transcritos en el tratamiento de UV-B cercano al ambiental relativo al tratamiento de UV-B atenuado. Los genes incluidos en el chip se agruparon en 13 grupos funcionales de acuerdo a la supuesta función del producto del gen. Para una lista de los genes que responden a UV-B, ver Tabla I. La lista completa de las respuestas de los genes incluidos en el arreglo está disponible como Tabla Suplementaria I en la versión electrónica de esta tesis.

de sus productos. Para muchas de las secuencias incluidas no hay información funcional disponible más que la abundancia de sus transcritos está regulada en respuesta a la herbivoría por *M. sexta* o por el tratamiento de regurgitado; consecuentemente, es probable que cumplan algún papel en la reconfiguración metabólica luego del ataque por un insecto. Estos genes se incluyeron en dos categorías separadas: genes que responden a *M. sexta* y que responden a regurgitado (por detalles ver materiales y métodos).

Las respuestas de expresión más consistentes en respuesta al UV-B solar se encontraron en el grupo de genes relacionados con fotosíntesis y el metabolismo de ácidos grasos (Fig. 4.1; Tabla 4.I). La mayoría de las sondas incluidas en el arreglo para los genes que codifican para componentes del aparato fotosintético mostraron una abundancia reducida de transcritos en las plantas crónicamente expuestas al UV-B solar respecto de las plantas control. Entre estos genes se encuentran algunas enzimas del ciclo de Calvin, tales como la subunidad pequeña de la Rubisco, y algunos genes que codifican para polipéptidos del PSII (por ejemplo genes con similaridad al gen *hbc1* tipo III de tomate, al polipéptido de 6.1 kD de espinaca, y el NtP110). Es interesante remarcar que uno de los genes relacionado con fotosíntesis, que codifica para un polipéptido de 23-kD del PSII-O₂ evolving complex se reguló positivamente en las plantas expuestas al UV-B ambiental (Tabla 4.I).

En contraposición a la respuesta mostrada por los transcritos relacionados con fotosíntesis, la mayoría de las sondas para los genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos y en la síntesis de oxilipinas mostraron una abundancia de transcritos incrementada en las plantas expuestas al UV-B solar. Entre estos genes regulados positivamente se encontraron α -DIOX, HPL, LOX y AOS (Fig. 4.1; Tabla 4.I).

Se encontró un incremento similar inducido por el UV-B para genes que codifican enzimas directa o indirectamente involucradas en el metabolismo del nitrógeno (tales como la glutamina sintetasa dependiente de ferredoxina [FDGS] y una sintetasa sulfurilasa de molibdopterina) y en los genes que codifican para factores de transcripción del tipo WRKY (*WRKY-2*). De manera opuesta, la exposición al UV-B solar redujo la abundancia de transcritos de *IP* y de transcritos con similaridad a la proteína relacionada con patogénesis PR1 de tabaco. El UV-B solar también afectó la abundancia de varios transcritos de función desconocida que habían sido descritos como regulados por la herbivoría natural o simulada de *M. sexta* y/o por el tratamiento de daño más regurgitado (Fig. 4.1; Tabla 4.I).

Reproducibilidad del efecto del UV-B

Pusimos a prueba la generalidad del impacto del UV-B comparando las respuestas transcripcionales mostradas en la Fig. 4.1 con las desencadenadas en *N. attenuata* por niveles realistas de UV-B provistos contra alto PAR en un experimento independiente bajo condiciones de invernáculo (ver Materiales y Métodos).

Los dos experimentos mostraron un patrón similar de respuesta al UV-B (Fig. 4.2). Los paralelos más obvios fueron: (a) efectos muy similares sobre la abundancia de

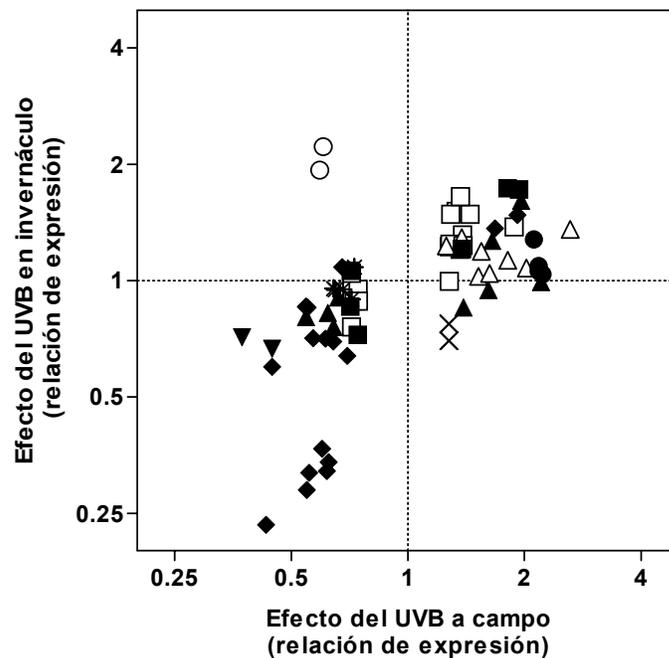


Figura 4.2: Comparación entre los efectos del UV-B solar en *N. longiflora* y UV-B ambiental simulado en *N. attenuata* sobre la expresión de los genes que responden a los insectos. Los datos para *N. longiflora* se obtuvieron de la Figura 1. Los datos para *N. attenuata* se obtuvieron de forma completamente independiente en un experimento de invernáculo bajo UV-B simulado (ver “Materiales y Métodos”). El gráfico muestra las respuestas al UV-B en *N. attenuata* de todos aquellos genes que estuvieron significativamente afectados por UV-B en *N. longiflora*: genes relacionados con fotosíntesis (◆), metabolismo de nitrógeno (■), metabolismo de carbohidratos y de pared celular (x), transporte de membrana(*), respuesta y señalización del estrés (●), síntesis de oxilipinas (Δ), IP (○), respuesta a patógenos (▼), genes de respuesta a *M. sexta* de función desconocida (□), y genes de respuesta a regurgitado de función desconocida (▲). La lista completa de las respuestas de todos los genes incluidos en el arreglo está disponible como Tabla Suplementaria I

transcriptos relacionados con fotosíntesis, y (b) una regulación positiva similar para los genes involucrados en el metabolismo de ácidos grasos y en la síntesis de oxilipinas y se observaron también efectos consistentes sobre *FDGS* (regulación positiva) y *PRI* (regulación negativa). La única diferencia remarcable entre los patrones de expresión detectados en estos experimentos fue el efecto positivo del UV-B artificial sobre la expresión de *IP* en *N. attenuata*, hecho contrastante con la reducción en la abundancia de transcriptos en las plantas de *N. longiflora* expuestas al UV-B ambiental (Fig. 4.2; ver Tabla Suplementaria I). El análisis de los datos presentados en la Fig. 4.2 muestra una correlación altamente significativa entre los grupos de datos ($P < 0.0001$ para un modelo lineal; $R^2 = 0.29$; o $R^2 = 0.5$ si los datos de *IP* son removidos). Esta regulación similar en dos especies de *Nicotiana*, puestas a prueba en experimentos completamente independientes, provee una fuerte evidencia de que los resultados presentados en las Figuras 4.1 y 4.2 reflejan un patrón general de respuesta transcripcional a las dosis de UV-B ambientales o cercanas a las ambientales.

El UV-B y la herbivoría de *Manduca sexta* simulada tienen efectos similares sobre varios grupos funcionales de genes.

Para comparar los efectos del UV-B solar y la herbivoría por un insecto, aplicamos un tratamiento de herbivoría simulada a plantas de *N. longiflora*. Para el tratamiento, dañamos las hojas con un instrumento metálico y aplicamos el regurgitado recolectado de larvas del cuarto estadio de *M. sexta*. Veinticuatro horas luego de la estimulación, cosechamos las hojas y extrajimos el RNA para su análisis.

Las respuestas de expresión observadas para genes muy bien caracterizados (los genes y pseudo genes para la subunidad pequeña de la Rubisco, *AOS*, *HPL*, α -*DIOX*, *IP* y *WRKY-2*; ver Tabla Suplementaria), que han sido previamente evaluados por numerosos análisis de northern-blot y microarreglos de poly-Lys (Hermsmeier *et al.*, 2001; Ziegler *et al.*, 2001; Hui *et al.*, 2003; Voelckel y Baldwin, 2003), se mostraron consistentes con los resultados previos. Los cambios en la expresión que se observaron resultaron también consistentes con las respuestas detectadas con microarreglos de poliepóxido usados en este estudio en plantas de *N. attenuata* expuestas al consumo por *M. sexta* durante 24 hs. (C. Voelckel & I. T. Baldwin, datos no publicados). Estas similitudes indicaron que las

respuestas de expresión a la herbivoría simulada medida en nuestro experimento pueden ser vista como general y reproducible para las especies de *Nicotiana*.

La Figura 4.3 muestra una comparación directa de la expresión de genes en respuesta al UV-B solar y a la herbivoría simulada en *N. Longiflora*. Los tratamientos tienen efectos similares sobre varios grupos funcionales de genes (Fig. 4.3A). En el grupo de genes relacionados con fotosíntesis, se observa que los mismos genes que codifican para polipéptidos del fotosistema II (PSII) son reprimidos tanto por el UV-B como por la herbivoría simulada. Las sondas para Rubisco también mostraron una reducción en la abundancia de transcritos en ambos tratamientos. Los dos tratamientos aumentaron la abundancia de transcritos de los genes involucrados en el metabolismo de ácidos grasos (α -DIOX, HPL y AOS), sin embargo el tratamiento de herbivoría simulada tuvo un efecto más marcado sobre los dos primeros genes que la exposición al UV-B.

La herbivoría simulada, como el UV-B solar, aumentó la abundancia de los transcritos de *WRKY-2*. También, como era esperable a partir de experimentos previos con herbívoros (Hermesmeier *et al.*, 2001) y consistente con el efecto del UV-B, nuestros tratamientos de herbivoría simulada aumentaron la abundancia de transcritos para *FDGS* y para la sintasa sulfurilada de molibdopterina. Los efectos del UV-B y de la herbivoría simulada resultaron también similares en cuanto a la abundancia de transcritos de *PRI*, que se vio reducida en ambos tratamientos (Fig. 4.3A; ver Tabla Suplementaria). El análisis de los datos mostrados en la Fig. 4.3A muestra una correlación significativa entre las respuestas al UV-B solar y a la herbivoría simulada ($P < 0.001$ para un modelo lineal; $R^2 = 0.22$ cuando se eliminan los datos correspondientes a *IP*). También hubo correspondencia entre los efectos del UV-B solar y la herbivoría en los casos de genes definidos como de función desconocida y los regulados por *M. sexta* (Fig. 3B; $P = 0.004$ para un modelo lineal).

Pocos genes resultaron afectados en direcciones opuestas por el UV-B solar y la herbivoría simulada. Esto está indicado por los pocos puntos ubicados en los cuadrantes noroeste y sudoeste de la Fig. 4.3, A y B. Un caso llamativo de respuesta opuestas es el de *IP*, que resulta fuertemente regulado de manera positiva por la herbivoría simulada (como se espera) y regulado negativamente por el UV-B solar en *N. longiflora*. Encontramos más

casos de regulaciones opuestas entre los genes que son regulados específicamente por los componentes de las secreciones orales de *M. sexta* y por los regurgitados (Fig. 4.3C).

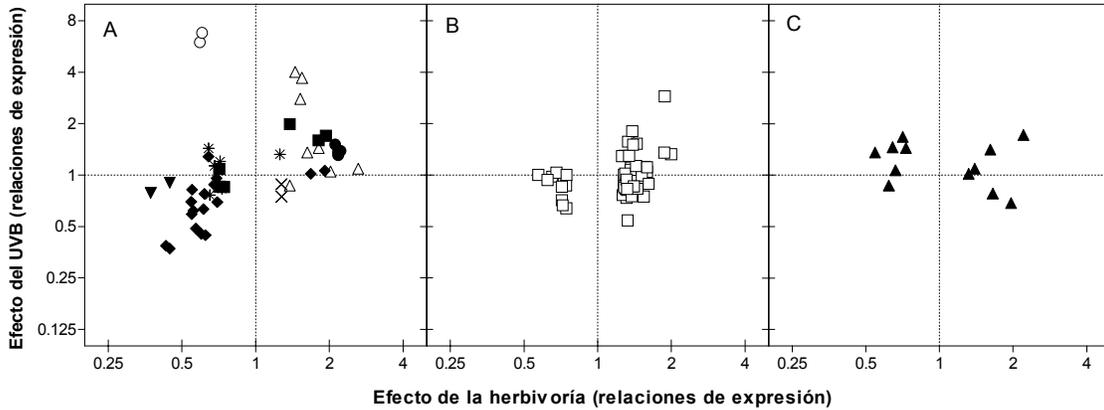


Figura 4.3: Comparación entre los efectos del UV-B solar y el tratamiento de simulación de oruga en *N. longiflora* (ver “Materiales y Métodos”). El gráfico muestra las respuestas al tratamiento de simulación de oruga (daño + regurgitado de *M. sexta* relativo al control intacto, ambos bajo UV-B atenuado) de los genes que fueron significativamente afectados por UV-B en plantas cultivadas en el campo. **A**, Respuestas en las categorías funcionales 1 a 10: genes relacionados con fotosíntesis (\blacklozenge), metabolismo de nitrógeno (\blacksquare), metabolismo de carbohidratos y de pared celular (*XET*; \times), transporte de membrana (*), respuesta y señalización del estrés (*WRKY-2*; \bullet), síntesis de oxilipinas (Δ), IP (\circ), respuesta a patógenos (*PR1*; \blacktriangledown). **B**, Categoría funcional 12, genes que responden al regurgitado de función desconocida (\blacktriangle). La lista completa de los genes incluidos en el arreglo está disponible como Tabla Suplementaria I

Efectos funcionales del UV-B sobre las defensas de las plantas

La estimulación por un insecto comúnmente resulta en un aumento en la resistencia de las plantas a ataques subsecuentes por herbívoros. Estas resistencias incrementadas pueden ser medidas empleando bioensayos de crecimiento de los insectos, y en el caso particular de *M. sexta* y *N. attenuata*, la inducción de las defensas de las plantas por parte del ataque de una oruga se ha detectado con bioensayos dentro de las 24 hs. luego de la estimulación con JA (Pohlon y Baldwin, 2001) y por la alimentación de un insecto (A. Kessler & Baldwin, datos no publicados). Debido a que detectamos similitudes en las respuestas transcripcionales provocadas por el UV-B solar y la herbivoría simulada de *M. sexta* (Fig. 4.3), nos preguntamos si la reorganización transcripcional inducida por el UV-B solar tenía consecuencias a nivel funcional. Expusimos plantas de *N. longiflora* y de *N. attenuata* a condiciones simuladas de UV-B ambiental en un invernadero y medimos el

impacto del UV-B sobre: (a) la cinética de inducción de IP por un tratamiento de daño + regurgitado, y (b) el crecimiento de orugas de primer estadio de *M. sexta* usando un bioensayo.

La herbivoría simulada indujo actividades mayores de IP en *N. attenuata*, como era esperable (Pohlon y Baldwin, 2001; van Dam y Baldwin, 2001). Interesantemente, esta inducción fue significativamente aumentada por la exposición al UV-B (Fig. 4.4). Esto es consistente con el hecho de que tanto el UV-B como la herbivoría simulada regularon

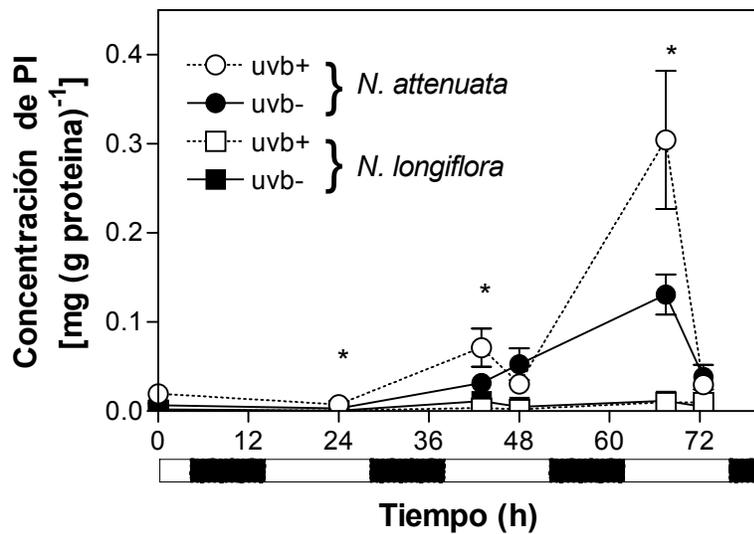


Figura 4.4: Efecto del UV-B ambiental simulado (experimento de invernáculo) sobre la cinética de los cambios en la actividad de IP en respuesta al tratamiento de simulación de la oruga (daño + regurgitado de *M. sexta*) aplicado en el tiempo 0 para plantas de *N. longiflora* y *N. attenuata*. Los niveles de actividad de IP en los controles sin dañar siempre estuvieron por debajo de 0.0008 mg por miligramo de proteína y no se muestran por claridad. El efecto significativo del UV-B sobre los niveles de IP (en *N. attenuata*) está marcado con asteriscos ($P < 0.05$); las barras indican ± 1 ER ($n = 3$ plantas por muestra). *N. longiflora* produjo niveles muy bajos de IP, y se observó una tendencia a la reducción de la actividad de IP en las plantas expuestas al UV-B ($P = 0.3$ en el tiempo = 48 h). Los segmentos vacíos y los rayados ubicados debajo del eje x representan el día y la noche, respectivamente.

positivamente el gen de IP en esta especie (Fig. 4.1). En *N. longiflora*, la actividad de IP resultó aproximadamente 10 veces menor que en *N. attenuata*, y a pesar de que los análisis detallados revelaron que hubo un sutil aumento en el tratamiento de daño + regurgitado (datos no mostrados), no pudimos detectar un efecto significativo del UV-B en la

promoción de los niveles de actividad de IP (Fig. 4.4). De hecho, hubo una reducción (no significativa) en los niveles de IP en las plantas expuestas al UV-B. Nuevamente, esto resultó consistente con los datos de los microarreglos, que mostraron una regulación negativa de IP en respuesta al UV-B ambiental en *N. longiflora* (Fig. 4.1).

En los bioensayos con ambas especies de *Nicotiana*, los insectos alimentados con plantas que estuvieron expuestas a UV-B ambiental simulado, antes y durante los experimentos, crecieron más lentamente que sus contrapartes alimentados con plantas controles (Fig. 4.5). Debido a que los insectos no estuvieron expuestos directamente al UV-B durante los ensayos de alimentación, resulta claro que las diferencias en el crecimiento reflejan cambios en la calidad de los tejidos de las plantas inducidos por el UV-B.

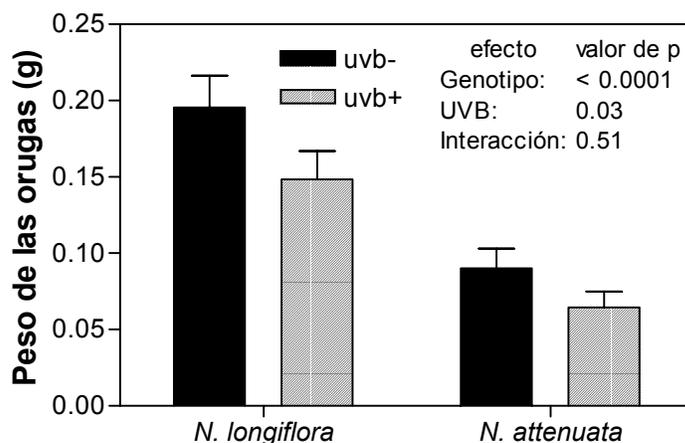


Figura 4.5: Efectos del UV-B ambiental simulado (experimento de invernáculo) sobre el crecimiento (ganancia de peso) de orugas de *M. sexta*. El experimento duró una semana. Las barras indican ± 1 ER ($n = 10$ [*N. attenuata*] y 8 [*N. longiflora*] plantas por muestra, cada una con dos orugas).

Conclusiones

Nuestros datos proveen una primera aproximación a los cambios transcripcionales activados por el UV-B solar en plantas que crecieron en el campo. Las comparaciones de la Fig. 4.3 indican que el UV-B ambiental induce una reorganización transcripcional en *N. longiflora* que tiene paralelos con la respuesta inducida por la herbivoría de una oruga. Estos resultados sugieren que el UV-B y los insectos masticadores activan elementos

regulatorios comunes y que esta convergencia de señales en última instancia lleva a un aumento en la resistencia al ataque por un herbívoro de las plantas que crecieron expuestas a la radiación UV-B solar (Fig. 4.5).

CAPÍTULO 5

Introducción

Como se ha mencionado en la introducción general, el UV-B puede tener una influencia notable sobre la interacción entre las plantas y sus organismos consumidores, generalmente reduciendo el nivel de herbivoría causada por insectos en condiciones de campo (Bothwell *et al.*, 1994; Ballaré *et al.*, 1996; Rousseaux *et al.*, 1998; Mazza *et al.*, 1999a; Zavala *et al.*, 2001).

Parte de este efecto puede estar mediado por modificaciones en el comportamiento de los insectos (Mazza *et al.*, 1999b; Mazza *et al.*, 2002) o por alteraciones en la calidad del tejido vegetal (ver introducción general). Con respecto a estos últimos, uno de los mecanismos posibles involucrados es la activación de la vía de los fenilpropanoides. La primer enzima de esta vía es la fenil alanina amonio liasa (PAL) y es la responsable del metabolismo de los fenilpropanoides en general. Otra enzima clave es la chalcona sintasa (CHS), quien cataliza el primer paso de la ruta biosintética de los flavonoides. Ambas son transcripcionalmente activadas en respuesta al UV-B (Chappell y Hahlbrock, 1984) y al daño mecánico (Reymond *et al.*, 2000; Richard *et al.*, 2000), por lo tanto la vía de los fenilpropanoides surge como un firme candidato para explicar el efecto antiherbívoro de la radiación UV-B.

En este capítulo mostraré y discutiré los resultados de experimentos realizados en invernáculo y en campo, donde buscamos comparar los efectos del UV-B y la herbivoría simulada sobre la abundancia de compuestos fenólicos foliares en *Nicotiana attenuata* y *N. longiflora*.

Resultados

Cultivamos plantas de *N. longiflora* en parcelas replicadas en un campo experimental en Córdoba, las cuales fueron divididas en dos grupos. Un grupo recibió radiación UV-B cercana a la ambiental y el otro recibió radiación UV-B atenuada (los detalles del

experimento pueden verse en la sección de Materiales y Métodos). Al cabo de tres semanas aplicamos el tratamiento de herbivoría simulada, dañando la mitad de las plantas de cada tratamiento lumínico y aplicando en las heridas regurgitado de *M. sexta*. En un experimento paralelo, cultivamos plantas de *N. attenuata* en invernáculo bajo dosis de radiación PAR cercanas a las naturales. Suplementando la radiación PAR, la mitad de las plantas fue irradiada con dosis realistas de UV-B, mientras que las plantas restantes formaron el tratamiento control (ver detalles en Materiales y Métodos). A la mitad de las plantas de cada tratamiento lumínico se le realizaron tratamientos de herbivoría simulada.

En ambas especies, luego de 24 hs de la aplicación de herbivoría simulada se cosecharon hojas de tres ejemplares de cada combinación de tratamientos para las determinaciones de compuestos fenólicos.

El perfil de compuestos detectados por HPLC en las dos especies de *Nicotiana*, medidos a través de la absorbancia a 320 nm, mostró nueve picos con inducción diferencial en respuesta a la radiación UV-B y a la herbivoría simulada. Se realizó la identificación de esos picos mediante espectrometría de masas y los resultados evidenciaron la presencia de tres isómeros del ácido clorogénico, tres isómeros de la dicafeílespermidina, dos isómeros de un compuesto desconocido pero cercanamente relacionado con la dicafeílespermidina y el flavonoide rutina (Tabla 5.I). En promedio, *N. attenuata* acumuló 2 veces más fenólicos

Tabla 5.I: Abundancia de compuestos fenólicos en plantas de *Nicotiana* en los distintos tratamientos, según las determinaciones por HPLC.

	<i>N. attenuata</i>			<i>N. longiflora</i>		
	control	regurgitado	UV-B	control	regurgitado	UV-B
ACL1	15.4 (12.9)	21.0	28.4	14.0 (16.6)	19.6	16.6
ACL2	34.0 (28.5)	58.0	71.2	42.8 (50.7)	64.4	65.3
ACL3	3.0 (2.50)	4.9	6.0	4.4 (5.20)	7.0	6.0
DCE1	1.0 (0.90)	7.5	5.1	0.5 (0.60)	0.3	0.8
DCE2	4.1 (3.40)	25.0	24.0	0.8 (1.00)	1.2	2.3
DCE3	5.2 (4.30)	37.0	25.9	1.3 (1.50)	4.5	2.9
D1	4.8 (4.00)	25.0	11.8	1.2 (1.40)	2.7	3.3
D2	10.1 (8.50)	41.4	29.0	2.5 (3.00)	6.1	4.5
Rutina	41.8 (35.0)	51.7	106.0	16.9 (20.2)	21.5	37.4
Total	119.4	271.4	307.5	84.3	127.2	139.1

que *N. longiflora* (p: 0.0184, Tabla 5.I), aunque este resultado puede deberse a las diferentes condiciones en que se realizaron los experimentos. Las dosis de UV-B recibidas por las plantas de *N. attenuata*, si bien son similares a las encontradas en verano en Córdoba, fueron aplicadas en forma continua y no hubo corrección durante los días nublados, por ende las dosis acumuladas pudieron ser mayores que las recibidas por *N. longiflora*.

En *N. attenuata* se observa que los compuestos más abundantes son el ácido clorogénico y la rutina (43.9% y 35.0% respectivamente, Tabla 5.I). En *N. longiflora* el ácido clorogénico da cuenta del 72% de la absorbancia observada, mientras que la rutina aporta el 20% (Tabla 5.I).

Calculamos la relación entre los valores de abundancia de cada compuesto con respecto al control y observamos que tanto el UV-B como la herbivoría simulada aumentaron las concentraciones de los fenólicos medidos. La respuesta de las plantas a ambos tratamientos fue muy similar tanto cualitativa como cuantitativamente (Fig. 5.1; r^2 : 0.73). La similitud de las respuestas encontradas es muy llamativa, ya que se trata de dos

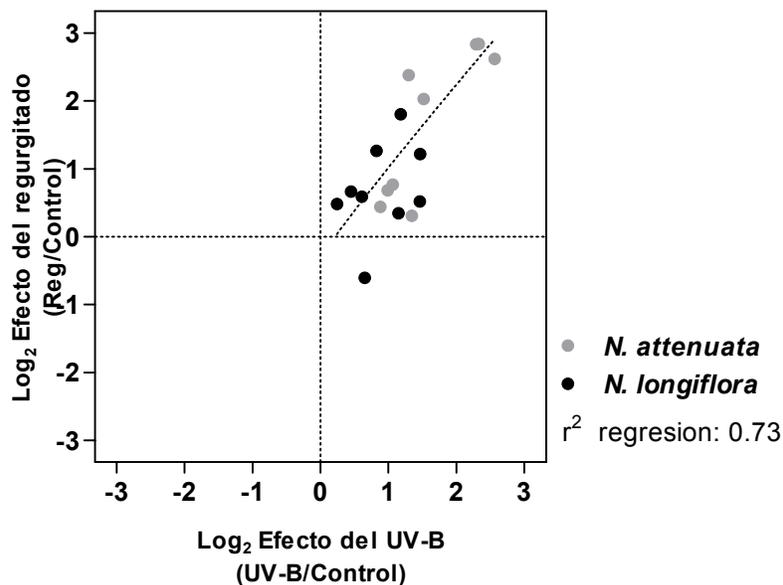


Figura 5.1: Efecto del UV-B y de la herbivoría simulada en dos especies de *Nicotiana*.

especies de *Nicotiana*, en dos experimentos independientes, bajo condiciones de irradiación de UV-B diferentes. Estos resultados proveen una fuerte evidencia de la existencia de un patrón general convergente en la inducción por la radiación UV-B y la herbivoría de la síntesis de compuestos derivados de la vía de los fenilpropanoides.

Conclusiones

Existe convergencia entre las respuestas de las plantas de *Nicotiana* frente al ataque de insectos herbívoros y en respuesta a la radiación UV-B. Esta convergencia ocurre al menos en la acumulación de compuestos de la vía de los fenilpropanoides y permitiría explicar, al menos en parte, el menor nivel de herbivoría que sufren las plantas expuestas a la radiación UV-B.

CAPÍTULO 6

Introducción

Como todos organismos, las plantas necesitan balancear la disponibilidad de recursos limitados con los requerimientos de supervivencia y reproducción. Es un lugar común entre los biólogos de plantas dividir los procesos metabólicos entre metabolismo primario y metabolismo secundario. El metabolismo primario se asocia con los procesos “principales” de crecimiento y reproducción mientras que el metabolismo secundario se relaciona con los procesos “subalternos” de coordinación, señalización y defensa. El metabolismo secundario incluye una miríada de pequeñas moléculas que aumentan la aptitud de un organismo (Firn y Jones, 2000). Muchos de estos compuestos son inducidos en respuesta a señales bióticas y abióticas. Las defensas antiherbívoro están ampliamente distribuidas en el reino vegetal y los compuestos involucrados pertenecen a varias familias químicas. Los más abundantes son los fenilpropanoides, una gran familia de compuestos con actividades biológicas múltiples (por una revisión ver Harborne y Williams, 2000). Las propiedades antiherbívoro de los fenilpropanoides y sus derivados incluyen cambios en las propiedades físicas del tejido vegetal (síntesis de ligninas y taninos). Algunos fenilpropanoides pueden funcionar como atractores o repelentes de la alimentación. También se han observado efectos tóxicos de compuestos individuales sobre los consumidores. Entre éstos, el ácido clorogénico (AC) y la rutina están ampliamente distribuidos en plantas (Mølgaard y Ravn, 1988) y se ha documentado su actividad modulando las relaciones intertróficas (Felton *et al.*, 1989a; Ikonen *et al.*, 2001). En la familia de las solanáceas se han detectado tres isómeros comunmente agrupados bajo el nombre de ácido clorogénico y dos parientes cercanos (isómeros del ácido isoclorogénico). El efecto de la acumulación de AC sobre los consumidores depende de los insectos y las plantas que se estén estudiando. Algunos reportes indican una influencia del AC sobre las decisiones de alimentación de los herbívoros, el desempeño de las larvas o mortalidad (Traugott y Stamp, 1997; Mallikarjuna *et al.*, 2004), mientras que otros trabajos indican que no hay actividad biológica alguna sobre las interacciones planta-insecto. Sin tener en cuenta su impacto biológico, existen

muchos reportes sobre la acumulación de AC en respuesta a los herbívoros; esto implica para la planta un costo energético y de recursos.

Las respuestas a la competencia y sus señales han sido extensamente estudiadas, particularmente aquéllas asociadas con los cambios en las relaciones R:RL (R: 660 nm; RL: 730 nm). La relación entre las radiaciones R y RL, percibida por los fitocromos, es indicadora de la densidad de plantas que rodea a un individuo (Ballaré *et al.*, 1990; Ballaré, 1999). Los tejidos vegetales transmiten y reflejan principalmente en la región del RL, reduciendo las relaciones R:RL a medida que aumenta la densidad de plantas. Esta señal de competencia estimula la partición de recursos hacia la elongación del tallo, de manera de obtener la mejor posición para la intercepción de luz. Varios autores han sugerido que este “síndrome de evitado del sombreado” puede restringir, debido a la disponibilidad de recursos, la expresión de respuestas de defensa inducidas (Herms y Mattson, 1992). De hecho, hay mucha evidencia en la literatura que apoya esta idea (Jansen y Stamp, 1997; Baldwin y Hamilton, 2000; Cipollini y Bergelson, 2001; Cipollini, 2002; Cipollini y Bergelson, 2002). La mayoría de estos experimentos fueron realizados en condiciones de competencia real, esto es, manipulando la densidad de plantas (Cipollini y Bergelson, 2001; Cipollini, 2002) o la población de malezas circundantes (Cipollini y Bergelson, 2002) creciendo en el mismo sustrato. También se han estudiado las limitaciones de nitrógeno (Baldwin y Hamilton, 2000) y la disponibilidad de luz (Jansen y Stamp, 1997). Casi no ha habido reportes que documenten el efecto de las señales de competencia sobre las defensas inducidas. Un trabajo reciente de Kurashige y Agrawal (2005) muestra que un hábitat con sombreado simulado, obtenido por la reducción de la irradiancia total y las relaciones R:RL, puede obstaculizar las respuestas antiherbívoro. Ningún trabajo previo ha investigado si los cambios en la calidad de luz *per se*, similares a los provocados por plantas que aún no producen sombreado, pueden restringir la acumulación de productos de defensa. En este trabajo, describimos la reducción de respuestas inducidas por herbivoría (acumulación de fenólicos) en plantas sujetas a señales de competencia (bajas relaciones R:RL). Nuestros resultados apoyan la hipótesis de un conflicto en la partición de recursos entre competencia y defensa. Este conflicto no estaría basado en la disponibilidad de recursos sino más bien en reareglos metabólicos que anticipan competencia futura.

Resultados

Efectividad del tratamiento lumínico

Las plantas de *N. longiflora* fueron expuestas a dos tratamientos lumínicos. Un grupo de plantas recibió radiación natural suplementada con radiación RL proveniente de uno de los lados (Fig. 6.1A). El otro grupo de plantas recibió sólo radiación natural, ya que la luz proveniente de las lámparas fue interceptada por una pantalla opaca (Fig.6.1A; por detalles ver Materiales y Métodos). La calidad del ambiente lumínico se determinó por las relaciones establecidas entre la luz R y RL aportada a las plantas (Fig. 6.1B; por detalles ver Materiales y Métodos). La efectividad de los tratamientos lumínicos se estimó midiendo el ángulo formado por las hojas de la roseta de *N. longiflora* y la base de la planta. Puede observarse en las Figs. 6.1A y 6.1C la posición erecta de las hojas de las plantas que percibieron bajas relaciones R:RL. En contraste, las plantas que percibieron relaciones R:RL altas mantienen sus hojas en posición horizontal.

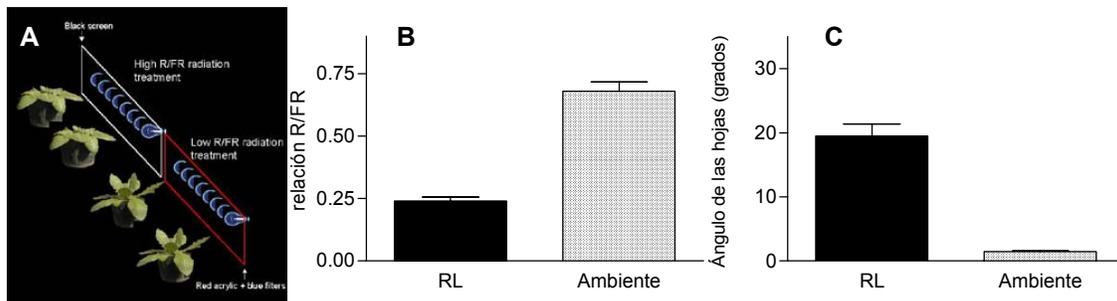


Figura 6.1: Diseño experimental y eficiencia del tratamiento lumínico. A) Representación esquemática del banco de luces y la distribución de las plantas, mostrando fotografías representativas de plantas pertenecientes a cada tratamiento. B) Relación R:FR de ambos tratamientos lumínicos. Las mediciones fueron tomadas en los dos bancos de lámparas (tratamientos FR y Ambiente) con el sensor apuntando hacia los bancos de lámparas a la altura de las plantas. C) Eficiencia del tratamiento: ángulo de las hojas de las plantas. Se midió el ángulo de todas las hojas de cada planta y se calcularon los valores medios para cada planta. Los datos presentados corresponden a la media de siete plantas por tratamiento lumínico.

La percepción por las plantas de *N. longiflora* de bajas relaciones R:RL acelera el crecimiento de las orugas de *M. sexta*.

Realizamos bioensayos con el propósito de determinar si las respuestas mediadas por RL están involucradas en las interacciones con otros niveles tróficos. Colocamos neonatos de *M. sexta* sobre plantas de *N. longiflora* sometidas a los tratamientos lumínicos descritos anteriormente. Se mantuvieron tanto las plantas como las orugas bajo los tratamientos lumínicos. Se observa que el peso de las larvas alimentadas con plantas que perciben dosis mayores de RL aumentó significativamente ~30 % (Fig. 6.2) respecto de las larvas alimentadas con plantas Ambiente.

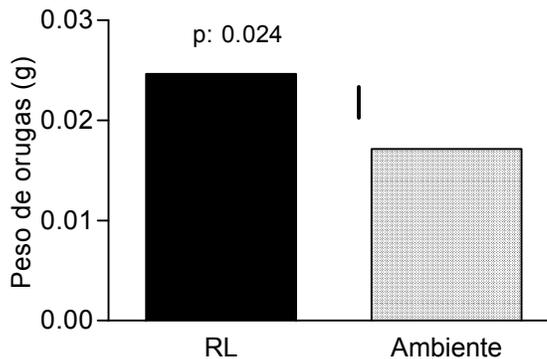


Figura 6.2: Peso de las larvas en respuesta a los tratamientos lumínicos. Las larvas de *M. sexta* se alimentaron durante cuatro días de las plantas expuestas a los tratamientos lumínicos. Al finalizar ese período las larvas fueron pesadas.

Estas diferencias en el peso de las orugas podrían ser explicadas por diferencias en el contenido de agua de las hojas. Sin embargo, no encontramos diferencias en el peso foliar específico (PFE) entre los tratamientos (Tabla 6.I). El contenido proteico resultó menor en las plantas RL que en las plantas Ambiente. Este resultado establece una relación inversa entre el contenido proteico y el peso ganado por las larvas. Observamos un efecto marginal sobre la herbivoría simulada reduciendo el contenido de proteínas (Tabla 6.I). Las relaciones carbono/nitrógeno (C:N) fueron similares en todos los tratamientos; no se observaron diferencias significativas en respuesta a la luz o el tratamiento de herbivoría simulada. En resumen, los parámetros morfológicos y bioquímicos groseros no fueron

responsables de los resultados de los bioensayos; por lo tanto se desprende que un rearrreglo metabólico más sutil debe estar involucrado.

Tabla 6.I: Valores de media (\pm ES) de las características de las hojas en las cuatro combinaciones de tratamientos, y resultados del análisis de ANOVA de dos vías.

Tratamiento de herbivoría simulada →	Regurgitado		Control		valores de p del ANOVA de dos vías		
	RL	Ambiente	RL	Ambiente	Luz	Herb	Interacción
PFE (mg cm^{-2})	3.17 (\pm 0.42)	3.20 (\pm 0.16)	3.36 (\pm 0.10)	2.93 (\pm 0.11)	0.22	0.81	0.16
Contenido de proteínas [mg prot (g PF) ⁻¹]	8.26 (\pm 1.26)	15.95 (\pm 1.66)	11.26 (\pm 1.86)	21.47 (\pm 3.33)	0.0014	0.074	0.57
C:N	10.67 (\pm 1.40)	11.06 (\pm 1.69)	8.46 (\pm 1.45)	7.97 (\pm 1.01)	0.98	0.79	0.79

Nos preguntamos si las proteínas de defensa estarían involucradas en esta respuesta y medimos la presencia de serín proteasas. En el Capítulo 4 mostramos que *N. longiflora* acumula pocas cantidades de IP II. En los ensayos de este capítulo, no logramos siquiera detectar la presencia de IP II. Estos resultados indican que las serín proteasas no están involucradas en la respuesta antiherbívoro montada por *N. longiflora*. No se puede descartar la presencia y/o acción de otras proteinasas porque no fueron medidas en estos experimentos.

La percepción de señales de competencia puede inhibir la acumulación de compuestos fenólicos disparada por la herbivoría.

La absorbancia a 305 nm de los extractos metanólicos crudos de las hojas, suele ser empleada como un estimador del contenido de compuestos fenólicos solubles presentes en el tejido vegetal. Determinamos la A_{305} de hojas de *N. longiflora* de plantas FR y Ambiente sometidas o no a tratamientos de herbivoría simulada. Se dañaron las hojas con una ruedita metálica y se aplicó regurgitado de *M. sexta* sobre las heridas (ver Materiales y Métodos por detalles). Cuatro días después se separaron discos de hoja que fueron extraídos en metano acidificado. El RL suplementario por sí mismo no tuvo efecto sobre la acumulación de fenólicos extractables, pero disminuyó marcadamente la respuesta de los fenólicos a la herbivoría simulada (Fig. 6.3). Bajo el tratamiento Ambiente, el regurgitado pudo duplicar

casi el contenido de fenólicos de las hojas, mientras que en el tratamiento RL (la situación esperada cuando hay plantas vecinas próximas), el regurgitado fue incapaz de estimular la acumulación de fenólicos (Fig.6.3).

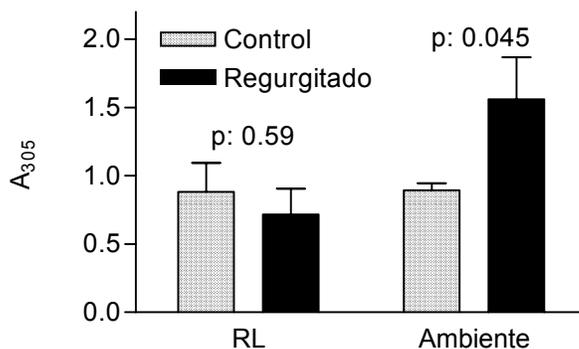


Figura 6.3: Determinaciones de fenólicos totales.

Las A₃₀₅ no permiten identificar compuestos individuales, siendo para ello preciso refinar el análisis con el empleo de técnicas sensibles y específicas. Los compuestos fenólicos fueron separados e identificados mediante HPLC/MS. En la figura 6.4 se muestra un perfil de elución típico obtenido para *N. longiflora*. Todos los picos detectados estuvieron presentes en todos los tratamientos, indicando que la respuesta observada es una cuestión de modulación cuantitativa más que diferencias en la composición de fenólicos entre los tratamientos. Se detectaron nueve picos que presentaban diferencias entre los tratamientos. Cinco de ellos fueron identificados como isómeros del AC. Un pico correspondió a Rutina y otros dos picos fueron identificados por sus patrones de ruptura en el espectrómetro de masas como conjugados de kaempferol. La comparación de sus tiempos de retención y espectros de absorción UV con compuestos de referencia puros, nos permitió descartar que se tratara del kaempferol-3-O-rutinósido o el kaempferol-3-glucósido, pero no nos fue posible determinar los grupos conjugados a este flavonoide.

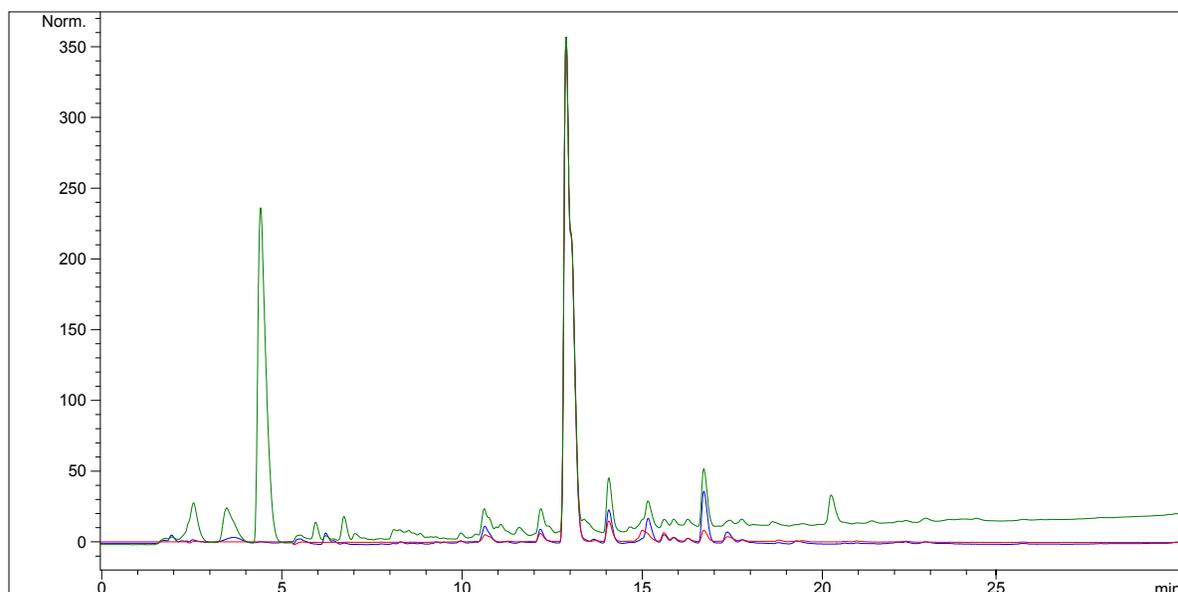


Figura 6.4: Cromatograma representativo de los datos de HPLC, mostrando el perfil de absorbancias a 210 nm, 254 nm y 320 nm. El pico principal corresponde al ácido clorogénico. Las flechas indican la localización esperada aproximada de la Nicotina (254 nm) y DTGs (210 nm), indicando la ausencia o escasa acumulación de estos compuestos en *N. longiflora*.

De los compuestos identificados, el pico más abundante (~80 %) correspondió al AC (Tabla 6.II). En la Fig. 6.5 puede observarse que uno de los isómeros del AC refleja el patrón observado para los compuestos fenólicos totales observado en la figura 3. Este hecho no es sorprendente debido a que es el compuesto más abundante y está explicando gran parte de la absorbancia a 305 nm.

Tabla 6.II: HPLC datos de fenólicos de *N. longiflora*, y resultados del análisis de ANOVA.

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Abundancia relativa ^(a) (%)	valores de p del ANOVA de dos vías ^(b)		
			RL	Regurgitado	Interacción
Ácido clorogénico	12.863	79.12	0.021	0.006	0.048
Rutina	16.713	4.25	0.174	0.175	0.514
Ácido criptoclorogénico1	14.973	3.35	0.652	0.019 (↑)	0.184
Ácido clorogénico2	12.132	3.23	0.338	0.048 (↑)	0.106
Ácido criptoclorogénico3	15.861	2.05	0.863	0.470	0.817
Ácido criptoclorogénico2	15.587	1.64	0.370	0.105	0.299
Derivado de kaempferol1	17.457	1.56	0.988	0.223	0.819
Derivado de kaempferol2	17.808	1.21	0.133	0.002 (↑)	0.546

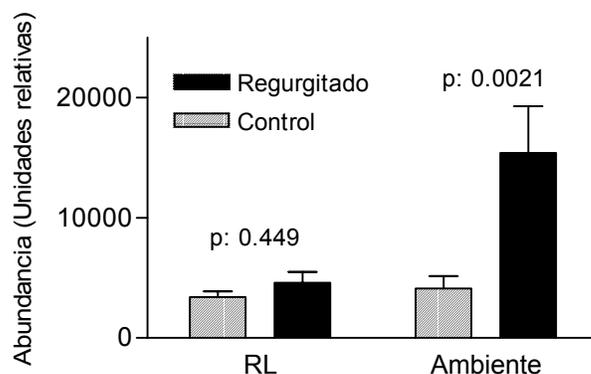


Figura 6.5: Acumulación de ácido clorogénico en respuesta a los tratamientos de luz y herbivoría simulada.

En todos los casos, excepto para rutina, el tratamiento de herbivoría simulada tendió a aumentar la acumulación del compuesto dado. El RL tendió a reducir la acumulación de compuestos inducida por la herbivoría. La mayoría de estas respuestas son estadísticamente no significativas para cada pico individual, pero existe un patrón general en el cual la respuesta al regurgitado fue mucho mayor en el tratamiento Ambiente que en el RL (Fig. 6.5). Esto es particularmente cierto para el AC y sus isómeros, para los que el efecto del regurgitado sobre las plantas Ambiente resultó 2.6 veces mayor que el de las plantas RL (Fig. ; $p=0.0013$). La rutina y los derivados de kaempferol mostraron un nivel de inducción más débil (1.09 para la relación Ambiente:RL. Fig. 6.5; $p: 0.92$).

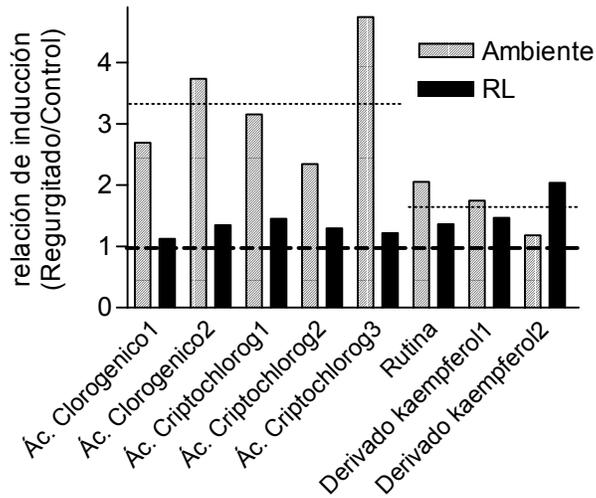


Figura 6.6: Relación de inducción por herbivoría simulada para todos los compuestos fenólicos identificados en ambos tratamientos lumínicos. Las barras muestran las relaciones de acumulación entre los valores medios de las plantas de herbivoría simulada y las plantas control. La línea punteada gruesa indica no inducción, mientras que las líneas punteadas delgadas representan la inducción media en el tratamiento Ambiente para los fenólicos relacionados con el ácido clorogénico y los derivados de flavonoides.

Tanto la herbivoría como el RL regulan la expresión de genes relacionados con defensa.

Nos preguntamos si los cambios metabólicos responsables de la reducción en las defensas de las plantas irradiadas con RL serían debidos a la expresión de genes relacionados con defensas. Particularmente nos interesamos por los genes que tenían regulación opuesta frente a los estímulos del RL y la herbivoría. Analizamos el patrón de expresión de genes en respuesta al RL suplementario comparándolas con las alteraciones provocadas en esos mismos genes por la herbivoría. Empleamos la técnica de microarreglos de ADN. El microchip del cual dispusimos contenía 789 oligonucleótidos representando en su mayoría a genes que responden al daño (Heidel y Baldwin, 2004). Los genes contenidos en el microarreglo fueron agrupados en categorías funcionales (Tabla Suplementaria 6.II) para facilitar el análisis de los resultados. La mayoría de los genes con regulación opuesta (24 de 27) estuvieron regulados negativamente por el RL y regulados positivamente por la herbivoría simulada (Tabla 6.III). Entre estos genes encontramos reguladores de la transcripción como los WRKY. Estos genes pertenecen a una gran familia de factores de transcripción que regulan elementos responsivos a patógenos y estimulantes (Eulgem *et al.*, 2000). También se ha demostrado que responden a herbivoría (Voelckel y Baldwin, 2004; Capítulo 2 de esta tesis) y a radiación UV-B (Capítulo 2 de esta tesis). Se observa también que cinco genes involucrados en la síntesis de terpenos son inhibidos por el RL y

estimulados por la herbivoría. Cuando una planta es dañada por un insecto herbívoro emite una serie de compuestos volátiles (e.g. mono y sesquiterpenos) que atraen predadores o parasitoides de herbívoros (Dicke *et al.*, 1990 Turlings *et al.*, 1990). Este tipo de defensas, llamadas “indirectas” han sido reportadas en más de 15 especies vegetales luego del daño por un artrópodo herbívoro (Dicke, 1999; Dicke y Van Loon, 2000 Kessler y Baldwin, 2001 Meiners y Hilker, 2000).

Tabla 6.III: Genes regulados en direcciones opuestas por FR y tratamientos de herbivoría simulada.

Categoría	Descripción del gen / homólogo a	RL	Regurgitado
		regulación	regulación
otros	terpeno sintetasa	0.46 negativa	2.19 Positiva
defensa patógenos	Nicotiana tabacum gen PR básica #1	0.58 negativa	1.75 Positiva
defensa patógenos	N.s. relacionado con patogénesis 3	0.39 negativa	3.17 Positiva
defensa patógenos	N.t. relacionado con patogénesis 8	0.41 negativa	4.43 Positiva
metabolismo primario	Solanum tuberosum alfa-amilasa (Amy21)	0.74 negativa	9.39 Positiva
regulación	N.t. WRKY2	0.28 negativa	1.28 Positiva
regulación	N.t. WRKY2	0.35 negativa	1.37 Positiva
regulación	N.t. WRKY6	0.51 negativa	1.33 Positiva
metabolismo secundario	N.sylvestris mRNA for S-adenosilmetionina decarboxilasa	0.71 negativa	1.48 Positiva
metabolismo secundario	N.t. cytochrome P450(makes capsdiol)	0.26 negativa	1.26 Positiva
metabolismo secundario	N.sylvestris mRNA for 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa	0.51 negativa	2.00 Positiva
metabolismo secundario	N. tabacum 5-epi-aristoloqueno sintasa mRNA	0.31 negativa	2.09 Positiva
metabolismo secundario	3-hydroxy-3-metilglutaril-CoA reductasa	0.56 negativa	2.13 Positiva
metabolismo secundario	A.t. S-adenosil-L-metionina:ácido jasmónico carboxil metiltransferase	0.67 negativa	1.63 Positiva
metabolismo secundario	S. tuberosum chalcona sintasa 2	2.64 Positiva	0.65 negativa
señalización	N.a. ACC oxidasa 1	0.70 negativa	1.37 Positiva
señalización	Nicotiana attenuata oxidasa alternativa (AOX)	0.43 negativa	1.43 Positiva
señalización	L.e. SNF-1 proteína de anclaje relacionado con kinasas SIP1	1.26 Positiva	0.75 negativa
respuesta a estrés	N.a. germina similar a S.t. germina	0.58 negativa	2.58 Positiva
respuesta a estrés	homólogo de germina	0.72 negativa	2.64 Positiva
respuesta a estrés	Avicennia marina aluminium induced protein	1.38 Positiva	0.53 negativa
desconocido	desconocido	0.67 negativa	1.63 Positiva
desconocido	desconocido	0.73 negativa	1.25 Positiva
desconocido	desconocido	0.61 negativa	1.75 Positiva
desconocido	desconocido	0.60 negativa	1.26 Positiva
desconocido	desconocido	0.73 negativa	1.30 Positiva
desconocido	desconocido	0.28 negativa	1.42 Positiva

Otro grupo de genes con regulación opuesta fue el de los genes involucrados en la vía de síntesis de los fenilpropanoides. La herbivoría simulada aumentó los niveles de expresión de los genes que producen fenólicos simples de esqueletos carbonados C6-C3, como el AC, pero no de los genes involucrados en la síntesis de fenólicos más complejos como flavonoides.

Conclusiones:

Las relaciones R:RL bajas permiten un crecimiento más rápido de *M. sexta*. Este efecto se debería a la inhibición, en condiciones de competencia, de la respuesta antiherbívoro de *N. longiflora*. En esta especie, una parte importante de esta respuesta se corresponde con la acumulación de fenilpropanoides de estructura sencilla (e.g. AC y derivados) pero parece ser independiente de fenilpropanoides más complejos (derivados de flavonoides). Nuestros resultados apoyan la idea de que la utilización de recursos a fin de mejorar la competencia, limita la posibilidad de acumular metabolitos secundarios de defensa frente a otros niveles tróficos. Esta reacomodación en la asignación de recursos a crecimiento o defensa es desencadenada por señales de presencia de vecinos mucho antes de que exista competencia real.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES GENERALES

En los experimentos detallados en las secciones anteriores de la presente tesis he descrito algunos de los efectos de factores del ambiente lumínico sobre la herbivoría por insectos masticadores. En particular estudiamos los efectos de dos rangos de longitudes de onda biológicamente significativas (UV-B y R-RL) sobre la expresión de mecanismos de defensas antiherbívoros y logramos documentar que:

- 1) El UV-B solar retarda el crecimiento de los estadios larvarios de insectos herbívoros.
- 2) Existen paralelos entre las respuestas transcripcionales inducidas por la herbivoría y el UV-B solar.
- 3) El UV-B solar potencia la expresión de proteínas defensivas inducidas por orugas.
- 4) El UV-B solar dispara cambios transcripcionales, siendo ésta la primera aproximación empleando estudios a campo.
- 5) Existe convergencia de respuestas al UV-B y a la herbivoría en la acumulación de fenólicos con actividad en relaciones planta-herbívoro.
- 6) En presencia de señales de competencia la resistencia de las plantas frente a los insectos fitófagos se ve disminuída.
- 7) Para algunos genes las respuestas transcripcionales a las señales de competencia y a la herbivoría son opuestas.
- 8) Las señales de competencia interfieren con la inducción de genes que codifican enzimas biosintéticas de fenilpropanoides. Esta inhibición se ve reflejada en la menor acumulación de fenilpropanoides con función defensiva en respuesta a la herbivoría.

DISCUSIÓN GENERAL

En esta tesis doctoral se plantearon experimentos con el objetivo de proveer información sobre los mecanismos subyacentes a la interacción entre señales provenientes del ambiente lumínico percibido por las plantas y la capacidad de las plantas para responder a los organismos que las atacan. El resultado que surge con mayor claridad de los experimentos descritos en los capítulos anteriores es que el nivel de defensas inducidas en las plantas por la herbivoría puede ser modulado por el ambiente lumínico al que están sometidas las mismas.

Discutiré primero los efectos del UV-B sobre las interacciones planta insecto, luego continuaré con un análisis sobre los resultados obtenidos para la influencia del RL sobre las defensas de las plantas.

Uno de los objetivos de la presente tesis fue el de aportar información sobre los mecanismos a través de los cuales el UV-B podría estar disminuyendo la herbivoría en un ambiente natural. Posiblemente sean varios los mecanismos involucrados en el aumento de la resistencia de las plantas a la herbivoría en presencia del UV-B. Durante el desarrollo de esta tesis estudié dos de los mecanismos probables. Por una lado, diseñé experimentos que me permitieron dilucidar si la calidad de la radiación incidente influye sobre la vía de defensa dependiente de JA. Por otro, investigué si la acumulación de compuestos de la vía de los fenilpropanoides, muchos de los cuales pueden tener actividad antiherbívoro.

En los Capítulos 3 y 4 se presentaron resultados que muestran que la radiación UV-B afecta al crecimiento de larvas de lepidópteros, y que este efecto está mediado, al menos en parte, por la vía de las oxilipinas, ya que a) En tomate la radiación UV-B potencia la acumulación en respuesta a la herbivoría de IP II (un gen cuya activación es dependiente de JA), y b) el efecto antiherbívoro de la radiación UV-B solar desaparece en mutantes deficientes en la percepción o síntesis del ácido jasmónico. En plantas de *Nicotiana* documentamos un aumento en la abundancia de transcritos de los genes de síntesis de oxilipinas en respuesta al UV-B (Fig. 4.1). Este efecto del UV-B parece resultar en una

acumulación aumentada de IP luego del ataque de un herbívoro en *N. attenuata* (Fig. 4.2). Sin embargo no sucede lo mismo en *N. longiflora* (Fig. 4.2). *N. longiflora* produce niveles muy bajos de IP, lo que sugiere que otros productos de defensa, y no los IP, están involucrados en las defensas inducidas por el UV-B (e insectos) en esta especie.

¿En qué punto convergen las cascadas de señalización inducidas por el UV-B y por las orugas? Un gran obstáculo en la búsqueda de respuestas a esta pregunta es nuestro limitado conocimiento de los mecanismos de percepción y señalización del UV-B. En plantas se han caracterizado muy bien los fotorreceptores específicos para las radiaciones correspondientes al R, RL, azul, y UV-A; en contraposición, no se han identificado receptores específicos para el UV-B. Basados en la evidencia aportada por estudios realizados en otros organismos, se cree que algunas respuestas de las plantas al UV-B son iniciadas por señales derivadas del daño al ADN (Beggs y Wellmann, 1994). Sin embargo, consideraciones espectrales (Ballaré *et al.*, 1995b; A.-H.-Mackerness *et al.*, 1996; Frohnmeyer *et al.*, 1999), experimentos de aclimatación (Kalbin *et al.*, 2001), y estudios realizados con mutantes en la reparación del ADN (Boccalandro *et al.*, 2001) sugieren que al menos algunas respuestas al UV-B están disparadas por la activación de otros blancos moleculares además del ADN. Se cree que en células animales la activación de receptores de membrana por el UV-B es el paso inicial en la cadena de eventos que llevan a la generación de algunas respuestas celulares al UV-B, tales como la apoptosis inducida por la exposición a altas dosis de UV-B. En forma análoga pero en sistemas vegetales, Yalamanchili y Stratmann (Yalamanchili y Stratmann, 2002) usando células cultivadas en suspensión de *Lycopersicon peruvianum*, pusieron a prueba la posibilidad de que el UV-B esté activando el receptor de membrana para la sistemina. Sus experimentos mostraron que los pulsos de UV-B son efectivos en desencadenar los componentes tempranos de la respuesta al daño: alcalinización del medio y fosforilación de MAP kinasas (Stratmann *et al.*, 2000). Experimentos farmacológicos posteriores indicaron que los efectos del UV-B sobre estas respuestas pueden ser inhibidos por tratamientos de la célula con suramina, un inhibidor del receptor de la sistemina, y sistemina-Ala-17, un análogo de la sistemina que inhibe competitivamente la unión de la sistemina a su receptor. Esta evidencia, conjuntamente con experimentos de desensibilización recíproca utilizando UV-B y sistemina, llevaron a Yalamanchili y Stratmann (2002) a sugerir que el receptor de la

sistemina y/o otros elementos de señalización que responden a la sistemina son los fotorreceptores que disparan las respuestas a los pulsos de UV-B en células de *L. peruvianum*. En principio, este modelo puede ser compatible con nuestros resultados de expresión global de genes en *Nicotiana* spp. y de IP II en tomate, lo que revela un efecto consistente de los niveles fisiológicos del UV-B en la activación de genes que se sabe que están activados en respuesta al daño (y sistemina en el modelo de tomate), tales como los que codifican enzimas involucradas en la síntesis de oxilipinas (Ryan, 2000). Resulta muy interesante la demostración reciente de que el receptor de la sistemina (SR 160) es idéntico al receptor de brasinoesteroides (tBRI1) (Montoya *et al.*, 2002). Este descubrimiento sugiere que también puede haber similitudes para explorar entre la señalización por el UV-B y la señalización de las hormonas esteroideas.

Otro punto potencial de superposición entre las respuestas de defensa inducidas por el UV-B y por los herbívoros puede ocurrir a nivel de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Existen antecedentes al respecto que derivan fundamentalmente de experimentos con plantas de tomate y *Arabidopsis*.

Trabajos con plántulas de tomate mostraron que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es generado sistémicamente en respuesta al daño y a la sistemina, y esta respuesta está ausente en plantas *def1*, deficientes en la síntesis de JA (Orozco-Cárdenas y Ryan, 1999). Experimentos de suplementación usando H_2O_2 , generadores de radicales libres, e inhibidores de NADPH-oxidasa sugirieron que la producción de H_2O_2 por una NADPH-oxidasa juega un rol preponderante en los eventos de señalización que llevan a la activación de genes de defensa tales como los *IP* y *PPO* (polifenol oxidasa; Orozco-Cárdenas *et al.*, 2001). El UV-B puede generar ROS en tejidos vegetales (Malanga y Puntarulo, 1995; Hideg *et al.*, 2000; Hideg *et al.*, 2002), y resulta tentador especular que esta producción incrementada de ROS activa elementos de señalización involucrados en las respuestas inducidas por herbívoros. De hecho, una convergencia a nivel transcripcional provocada por el UV-B artificial y los agentes oxidantes (tales como el ozono), inhibidores antioxidantes, y generadores artificiales de ROS se notó en experimentos realizados en ambientes controlados con otras especies vegetales (Willekens *et al.*, 1994; Green y Fluhr, 1995 Rao *et al.*, 1996; Surplus *et al.*, 1998, A.-H.-Mackerness *et al.*, 1999a, A.-H.-Mackerness *et al.*, 2001; Sävenstrand *et al.*, 2002).

En *Arabidopsis*, los trabajos realizados han aportado evidencias acerca de la naturaleza de la interacción entre el UV-B y la señalización por oxilipinas. Se mostró que el UV-B, provisto en un ambiente de baja intensidad PAR, induce la expresión del gen de la defensina (*PDF1.2*), un gen que puede ser activado por el daño y por JA (A.-H.-Mackerness *et al.*, 1999, 2001). Los efectos del UV-B sobre *PDF1.2* pueden ser cancelados por el pretratamiento de las plantas con un antioxidante como el ácido ascórbico. Además, los aumentos en la expresión de *PDF1.2* pueden ser desencadenados por la aplicación de 3-amino-1,2,4 triazol (un oxidante) en las plantas salvajes (Col4), pero no sucedió lo mismo en el mutante *jar-1*, que está disminuido en la sensibilidad al ácido jasmónico. Basados en esta evidencia, A.-H.-Mackerness *et al.* (1999) concluyeron que los efectos del UV-B sobre la expresión de *PDF1.2* están mediados por la producción de ROS inducida por el UV-B, lo cual, a diferencia con el modelo vigente para tomate (Orozco-Cárdenas *et al.* 2001), parecen jugar un rol en la señalización que *precede* a la síntesis del JA. Es notable también que el UV-B promueve la acumulación de JA en *Arabidopsis* (A.-H.-Mackerness *et al.* 1999), mientras que en tomate no se pudo detectar un aumento en la concentración de JA por efecto del UV-B (Stratmann *et al.*, 2000). Recientemente, en *Arabidopsis*, se ha caracterizado una familia de factores de transcripción que se unen a la calmodulina (AtSR1-6, por genes de *Arabidopsis* “signal-responsive”) que son inducidos por muchos reguladores internos (etileno y metil jasmonato) y factores externos (“heat shock”, frío, UV, NaCl y daño) (Yang y Poovaiah, 2002). Esta familia podría estar involucrada en la interacción entre las vías de señalización iniciadas por la herbivoría y el UV-B; sin embargo, ninguna de las técnicas de “differential display” usadas para detectar los transcritos regulados por la herbivoría de *Manduca sexta* en *N. attenuata* revelaron secuencias con similaridad a la familia *SR* de *Arabidopsis* (I. T. Baldwin, comunicación personal).

Sin embargo, existen reservas con la aplicación de los mecanismos mediados por ROS en los experimentos presentados en esta tesis. Primero, no se ha establecido que los niveles de UV-B en condiciones naturales induzcan niveles elevados de ROS en plantas cultivadas en el campo, aunque sí se han documentado incrementos en la actividad de las enzimas depuradoras de H₂O₂ (catalasa y ascorbato peroxidasa) debidos a la exposición al UV-B solar (Mazza *et al.*, 1999a). Segundo, los estudios de expresión de genes en el

modelo de tomate indican que, de los genes inducidos por el daño o por la sistemina, sólo la expresión de los genes “tardíos” (por ej. *IP* y *PPO*) es dependiente del H_2O_2 , mientras que la inducción de los genes “tempranos” (e.g. genes asociados con la vía de los octadecanoides, tales como *AOS* y *LOX*) es independiente del H_2O_2 (Orozco-Cárdenas *et al.*, 2001). En nuestros experimentos con tomate (Capítulo 1) no detectamos que el UV-B *per se* activara genes “tardíos” (IP II), mientras que en *N. longiflora* (Capítulo 4) el UV-B solar activa los genes “tempranos” pero no los productos de defensa “tardíos”. Es decir que nuestros resultados muestran que, en condiciones naturales de radiación, la acumulación de ROS no sería el principal mediador del efecto antiherbívoro del UV-B, sino que existiría otro sistema de señalización diferente. Sobre la base de nuestros resultados y de las consideraciones que anteceden, parece mucho más probable que la radiación UV-B influya sobre los genes de defensa a través del receptor de la sistemina que mediante la generación de ROS, aunque ambos mecanismos no son necesariamente excluyentes.

Hasta aquí hemos discutido el rol de la vía de las oxilipinas en la respuesta antiherbívoro de las plantas, y los posibles modos de interacción de la radiación UV-B sobre dicha vía. Sin embargo, las respuestas antiherbívoro de las plantas no se limitan a mecanismos dependientes del ácido jasmónico. La herbivoría, al igual que otros numerosos factores de estrés, es capaz de activar otras vías del metabolismo secundario. Entre ellas la vía de los fenilpropanoides. Los resultados del Capítulo 5 muestran la notable convergencia entre la respuesta a la radiación UV-B y a la herbivoría en la acumulación de algunos compuestos fenólicos (Fig. 5.1). Wilkens y colaboradores (Wilkens *et al.*, 1996) encontraron que las concentraciones de ácido clorogénico y rutina aumentan en plantas de tomate expuestas a la radiación solar completa, respecto de las plantas cultivadas a la sombra. Estos resultados son confirmados y ampliados por los resultados presentados en el Capítulo 5. Nuestros resultados muestran que el componente UV-B de la radiación solar es por sí sólo efectivo en provocar estas.

Algunos de los fenólicos identificados tienen actividad antiherbívoro conocida. Se ha demostrado que el ácido clorogénico inhibe el crecimiento de las larvas de lepidópteros cuando es incorporado a las dietas artificiales (Elliger *et al.*, 1981; Felton *et al.*, 1989b; Isman y Duffey, 1982; Stamp *et al.*, 1994, Yang *et al.*, 1996). Para este compuesto fenólico se ha propuesto que el mecanismo de acción sobre los insectos se basa en su interacción

con las proteínas. Cuando el insecto mastica las hojas de una planta la PPO, una enzima “tardía” cuyo gen es activado por JA, cataliza en el estómago del insecto la oxidación de los dihidrofenoles (e. g. ácido clorogénico) a la O-quinona correspondiente (Felton *et al.*, 1989b). Los dihidroxifenoles pueden también autooxidarse en el estómago del insecto (Summers y Felton, 1994). La alquilación de las proteínas por las quinonas puede alterar las propiedades de las proteínas interfiriendo con la solubilidad, digestión, absorción y asimilación (Stahmann *et al.*, 1977; Leatham *et al.*, 1980; Pierpoint, 1983; Hurrell y Finot, 1985). Se ha documentado que otro de los compuestos identificados en los experimentos de esta tesis (Capítulos 3 y 4), el derivado de flavonoide rutina, es tóxico para las larvas de lepidópteros (Lukefahr y Martin, 1966; Elliger *et al.*, 1981; Isman y Duffey, 1982). Los estudios realizados sobre el mecanismo de acción de la rutina mostraron que este fenólico puede retrasar el inicio del proceso de muda en *M. sexta* alargando la duración de los estadios (Stamp, 1990; Stamp y Horwath, 1992; Horwath y Stamp, 1993). Las consecuencias de la ingestión de tejido de poca calidad alimenticia sobre las larvas de lepidópteros son grandes. Además del retraso en el crecimiento larvario se observa una disminución en el tamaño de las pupas y en consecuencia un menor tamaño de adultos. Esto redundará en una menor cantidad de huevos dejados para la generación siguiente (Slansky Jr., 1982 y referencias allí citadas)

Como se ha indicado anteriormente, *N. longiflora* no acumula cantidades importantes de IP, es decir que las defensas contra los herbívoros deben ser canalizadas por una ruta metabólica independiente de la de las oxilipinas. Los resultados presentados en el Capítulo 3 sugieren que una parte importante del efecto antiherbívoro en esta especie podría ser debida a la acumulación de fenilpropanoides, y que la reducción en los niveles de herbivoría debidos a la radiación UV-B se debería a la inducción de una respuesta muy similar a la disparada por los insectos fitófagos.

Desde un punto de vista ecofisiológico, es hasta cierto punto intrigante que los efectos del UV-B y de la herbivoría por una oruga sean tan similares (Fig. 4.3). Una posibilidad es que estas similitudes sean sólo aparentes y que las diferencias sutiles en los tiempos en que esto ocurre y los cambios relativos en los niveles de expresión de genes cardinales sean de importancia central para definir la especificidad funcional de la reorganización transcripcional desencadenada por cada estímulo particular (por un

tratamiento del tema, ver Bowler and Fluhr, 2000). Sin embargo, el producto final de la respuesta al UV-B en *Nicotiana* sp., que de hecho resulta en una resistencia incrementada al ataque por un herbívoro, sugiere que la especificidad funcional puede ser en realidad un tanto limitada. Se puede argumentar que las plantas tienen sólo un número limitado de circuitos de señalización y moléculas disponibles, y, por ello, la redundancia o superposición en las respuestas iniciadas por diferentes señales sea en cierta medida inevitable. Es posible que tanto el UV-B y el ataque por herbívoros tiendan a ocurrir simultáneamente en los hábitats en los cuales estas especies han evolucionado y, como resultado, hayan sido seleccionadas vías de señalización compartidas. Por otro lado, también es posible que la convergencia transcripcional observada represente un compromiso evolutivo entre las respuestas altamente "estímulo específicas" y respuestas "multipropósito" que ayudan a las plantas a lidiar con los factores de estrés que, desde "el punto de vista de la planta", son más semejantes de lo que parecen desde nuestra perspectiva reduccionista. Por ejemplo, bajo condiciones naturales, la exposición al UV-B solar completo (e.g. en espacios abiertos dentro de un canopeo) y la exposición a insectos que se alimentan de hojas puede someter a limitaciones similares el crecimiento de la planta, lo cual subsecuentemente imponga reacomodaciones parecidas en su fisiología. Ejemplos de las respuestas morfológicas y bioquímicas que pueden aumentar la resistencia a la alta radiación UV-B, y al mismo tiempo reducir el daño impuesto por los insectos folívoros, pueden incluir la inversión reducida en área foliar, la producción de hojas gruesas, aumentos en los niveles de antioxidantes, y niveles aumentados de compuestos fenólicos. Estas respuestas implican un costo metabólico.

En el capítulo 6 de esta tesis se muestran los resultados de experimentos en donde las plantas fueron expuestas a situaciones en las cuáles presumiblemente existía un conflicto en la asignación de recursos. La percepción de señales de competencia, tales como las reducciones en las relaciones R:RL, pueden inducir mecanismos mediante los cuales las plantas reaccionan al sombreado, una respuesta conocida como "síndrome de evitado del sombreado". Esta respuesta involucra la elongación de tallos y pecíolos de manera de asegurar una óptima intercepción lumínica. La plasticidad fenotípica asociada con esta respuesta le permite a la planta captar luz en canopeos densos, pero previene que se invierta una excesiva cantidad de recursos en la elongación de tallos y pecíolos en condiciones de

canopeo abierto, donde no existe competencia por luz. Se ha mostrado que la manipulación de las relaciones R:RL reducen la aptitud cuando una planta aislada es expuesta a señales de alta densidad de vecinos, o en las plantas incapaces de percibir a los vecinos cultivadas a altas densidades. Estas evidencias subrayan el rol adaptativo de la redistribución de recursos inducida por las bajas relaciones R:RL en la competencia de las plantas. Otro tipo de señales están asociadas a las interacciones con niveles tróficos superiores. Como se ha comentado en párrafos anteriores, la generación de defensas inducidas por la herbivoría incurre en costos metabólicos al producirse la síntesis de varios metabolitos secundarios de protección, y se ha demostrado que estas respuestas pueden reducir la aptitud de la planta (por una revisión ver Cipollini *et al.* 2003). Naturalmente, de esto se desprende que ambas situaciones, competencia y herbivoría, al coexistir probablemente interactúen, aunque el resultado final de tales interacciones no es claramente predecible. Los resultados presentados en el Capítulo 4 muestran que los cambios inducidos por el RL sobre los tejidos de las plantas aumentan la ganancia de peso de las larvas de *M. sexta*, y que este incremento en la calidad forrajera del tejido no está relacionado con el contenido de proteínas o parámetros groseros de las hojas. Varios compuestos de conocida función antiherbívoro fueron ensayados con resultados negativos. No pudimos detectar nicotina ni glicósidos de diterpenoides (GDT) IP. Nuestros resultados coinciden con reportes previos en donde se señala que no hay casi acumulación de nicotina en *N. longiflora*. Tampoco pudimos detectar la acumulación de IP en *N. longiflora* que, a diferencia de *N. attenuata*, acumula muy pequeñas cantidades de IP, las que no fueron detectadas en estos experimentos. En el capítulo 2 de esta tesis se documentó que *N. longiflora* acumula cantidades casi imperceptibles de IP. Sinclair y colaboradores (2004) describieron que no existía efecto del daño en *N. alata*, un miembro de la misma sección del género *Nicotiana* (*Alatae*) que *N. longiflora*. La concentración de alcaloides también es extremadamente baja en *N. alata*, una característica que parece ser general de las especies de la sección *Alatae* (incluida *N. longiflora*), con las excepciones de *N. langsdorffii* y *N. sylvestris* (Sinclair *et al.*, 2004). En resumen, muchos de los grupos de compuestos de los que se sabe que tienen actividad antiherbívoro, tales como DTGs, nicotina, alcaloides o IP, no parecen jugar un papel muy importante en nuestro sistema de estudio.

En cambio, la acumulación de compuestos fenólicos sí podría ser central en las respuestas antiherbívoro en *N. longiflora*. El principal compuesto fenólico detectado fue el ácido clorogénico, del cual ya se han discutido sus propiedades como antiherbívoro. El ácido clorogénico representa casi el 80 % del total de fenólicos detectados. No resulta extraño entonces que su patrón de acumulación resulte muy similar al detectado a través de la A₃₀₅ (Figs. 3 y 5). Lo que resulta muy notorio en nuestros resultados es que, en las plantas del tratamiento Ambiente, la herbivoría simulada es capaz de inducir la acumulación de ácido clorogénico, pero esta capacidad se pierde en las plantas suplementadas con RL. Nuestra hipótesis es que, cuando la relación R:RL es alta (es decir, en ausencia de señales de competencia), la herbivoría es capaz de producir una redistribución de recursos de manera de aumentar las defensas de las plantas, mientras que cuando existen bajas relaciones R:RL pareciera haber un conflicto por el uso de recursos entre la competencia y la herbivoría y, al menos en *N. longiflora*, las señales de competencia impedirían la respuesta antiherbívoro, presumiblemente por la necesidad de utilizar los recursos para el crecimiento (Figs. 6.5 y 6.6). En el tratamiento de RL prácticamente no se detecta ninguna respuesta de los fenólicos a la herbivoría simulada, mientras que en el tratamiento Ambiente la inducción de fenólicos parece estar asociada con el ácido clorogénico y compuestos asociados, en lugar de estarlo con el derivado de kaempferol o la rutina (Fig. 6.6). Todos estos compuestos derivan del ácido p-cumárico, el lugar de divergencia de distintas rutas biosintéticas. Mientras que el ácido clorogénico y compuestos similares son el resultado de la esterificación del ácido cafeico (ácido hidroxip-cumárico) con el ácido quínico, el kaempferol y la rutina se obtienen luego de numerosas reacciones enzimáticas que incluyen la formación de chalcona (Fig. 6.7). Nuestros resultados sugieren que la acumulación de fenólicos inducida por la herbivoría en ausencia de competencia no es el resultado de un aumento general en la regulación de la vía de los fenilpropanoides, sino en una regulación específica de los compuestos relacionados con el ácido clorogénico, que por otro lado representan cerca del 90 % del total de fenólicos en *N. longiflora* (Tabla II). Esta tendencia es confirmada por los datos generales de expresión (Tabla IV). La herbivoría incrementa la expresión de varias enzimas de la vía de los fenilpropanoides “simple” como la isocorismato sintasa, PAL, ácido cafeico O-metiltransferasa, ácido cinámico 4-hidroxilasa, ferulato-5-hidroxilasa o 4-cumarato CoA

ligasa, muchos de cuyos productos pueden actuar como precursores del ácido clorogénico. Por otro lado los genes ensayados correspondientes a los compuestos derivados de la CHS (flavonoides de esqueleto carbonado C15) como el conjugado de kaempferol y la rutina, no mostraron ninguna regulación luego de la inducción por *M. sexta*. La CHS, la flavonol sintasa, la flavanona 3-beta-hidroxilasa y la UDP ramnosa:antocianidina-3-glucósido ramnosiltransferasa no cambió su expresión en respuesta a la herbivoría. Tomados en conjunto, los resultados de la acumulación de fenólicos en respuesta a la herbivoría (Figs. 6.3, 6.5 y 6.6) y la expresión de genes (Tabla IV) mostró una disminución de las respuestas antiherbívoro mediada por el RL. Bajo condiciones en las cuales no hay competencia, las respuestas antiherbívoro están dominadas por la activación de una rama específica de la vía de los fenilpropanoides que lleva a la síntesis de compuestos con el esqueleto básico de la fenilalanina. Son estas respuestas las afectadas por la detección del RL y su disminución no es el resultado de una cancelación de los efectos de la herbivoría simulada y el RL, dado que el FR *per se* no tuvo efecto sobre estos genes (Tabla IV). En cambio, el RL parece modular la acumulación de fenólicos provocada por la herbivoría.

Los resultados presentados en el Capítulo 6 sugieren fuertemente que las señales de competencia y la herbivoría producen un conflicto en la asignación de recursos. Las plantas de *N. longiflora* presentan una estrategia conservativa, priorizando la asignación de recursos a la competencia a expensas de las defensas inducidas contra herbívoros. Es importante notar que esta “decisión” es tomada antes de que exista una limitación real de recursos.

A modo de resumen final podemos decir que los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis han permitido ampliar el conocimiento existente hasta el comienzo de los mismos. Nuestro trabajo en el área de las relaciones entre el ambiente lumínico y la resistencia de las plantas a la herbivoría es uno de los primeros en mostrar un mecanismo posible para explicar genéticamente estas interacciones. En este sentido hemos sido pioneros en emplear tecnología de genómica para encarar problemas ecológicos.

Todavía queda un largo camino por recorrer hasta develar la intrincada red de mecanismos que gobiernan las respuestas de las plantas a los estímulos ambientales. El estudio de sus implicancias ecológicas abre posibilidades excitantes de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- A.-H.-Mackerness S., Butt P.J., Jordan B.R. y Thomas B. (1996). Amelioration of ultraviolet-B-induced down-regulation of mRNA levels for chloroplast proteins, by high irradiance, is mediated by photosynthesis. *J Plant Physiol*, **148**, 100-106.
- A.-H.-Mackerness S., Surplus S.L., Blake P., John C.F., Buchannan-Wollaston V., Jordan B.R. y Thomas B. (1999a). Ultraviolet-B-induced stress and changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*: role of signalling pathways controlled by jasmonic acid, ethylene and reactive oxygen species. *Plant Cell Environ*, **22**, 1413-1243.
- A.-H.-Mackerness S., John C.F., Jordan B. y Thomas B. (2001). Early signaling components in ultraviolet-B responses: Distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Lett*, **489**, 237-242.
- A.-H.-Mackerness S.A., Surplus S.L., Blake P., John C.F., Buchannan-Wollaston V., Jordan B.R. y Thomas B. (1999b). Ultraviolet-B-induced stress and changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*: role of signalling pathways controlled by jasmonic acid, ethylene and reactive oxygen species. *Plant Cell Environ*, **22**, 1413-1243.
- Ahmad M. y Cashmore A.R. (1996). Seeing blue: The discovery of cryptochrome. *Plant Mol Biol*, **30**, 851-861.
- Albritton D.L., Aucamp P.J., Megic G. y Watson R.T. (1998). Scientific assessment of ozone depletion: 1998. In: *Global ozone research monitoring project, World Meteorological Association* (eds. Albritton DL, Aucamp PJ, Megic G & Watson RT), Geneva.
- Baldwin I.T., Staszak-Kozinski L. y Davidson R. (1994). Up in smoke: I. Smoke-derived germination cues for post fire annual, *Nicotiana attenuata* Torr. Ex. Watson. *J Chem Ecol*, **20**, 2345-2371.
- Baldwin I.T. y Hamilton W. (2000). Jasmonate-induced responses of *Nicotiana sylvestris* results in fitness costs due to impaired competitive ability for nitrogen. *J Chem Ecol*, **26**, 915-952.
- Ballaré C.L., Sanchez R.A., Scopel A.L., Casal J.J. y Ghera C.M. (1987). Early detection of neighbour plants by phytochrome perception of spectral changes in reflected sunlight. *Plant Cell Environ*, **10**, 551-557.
- Ballaré C.L., Scopel A.L. y Sanchez R.A. (1990). Far-red radiation reflected from adjacent leaves: An early signal of competition in plant canopies. *Science*, **247**, 329-332.

- Ballaré C.L., Barnes P.W. y Flint S.D. (1995a). Inhibition of hypocotyl elongation by ultraviolet-B radiation in de-etiolating tomato seedlings. I. The photoreceptor. *Physiol Plant*, **93**, 584-592.
- Ballaré C.L., Scopel A.L., Roush M.L. y Radosevich S.R. (1995b). How plants find light in patchy canopies. A comparison between wild-type and phytochrome-B-deficient mutant plants of cucumber. *Funct Ecol*, **9**, 859-868.
- Ballaré C.L., Scopel A.L., Stapleton A.E. y Yanovsky M.J. (1996). Solar ultraviolet-B radiation affects seedling emergence, DNA integrity, plant morphology, growth rate, and attractiveness to herbivore insects in *Datura ferox*. *Plant Physiol*, **112**, 161-170.
- Ballaré C.L. (1999). Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signalling mechanisms. *Trends Plant Sci*, **4**, 97-102.
- Ballaré C.L., Scopel A.L. y Mazza C.A. (1999). Effects of solar UV-B radiation on terrestrial ecosystems: case studies from southern South America. In: *Stratospheric Ozone Depletion. The effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems* (ed. Rozema J). Backhuys Publishers, Leiden, pp. 293-311.
- Ballaré C.L., Rousseaux M.C., Searles P.S., Zaller J.G., Giordano C.V., Robson T.M., Caldwell M.M., Sala O.E. y Scopel A.L. (2001). Impacts of solar ultraviolet-B radiation on terrestrial ecosystems of Tierra del Fuego (southern Argentina). An overview of recent progress. *J Photochem Photobiol B: Biol*, **62**, 67-77.
- Beggs C. y Wellmann E. (1994). Photocontrol of flavonoid biosynthesis. In: *Photomorphogenesis in Plant* (eds. Kendrick R & Kronenberg G). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 733-751.
- Bergey D.R., Orozco-Cárdenas M.L., De Moura D.S. y Ryan C.A. (1999). A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 1756-1760.
- Boccalandro H.E., Mazza C.A., Mazzella M.A., Casal J.J. y Ballaré C.L. (2001). Ultraviolet B radiation enhances a phytochrome-B-mediated photomorphogenic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **126**, 780-788.
- Bothwell M.L., Sherbot D.M.J. y Pollock C.M. (1994). Ecosystem responses to solar ultraviolet-B radiation: influence of trophic-level interactions. *Science*, **265**, 97-100.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.

- Briggs W.R. y Christie J.M. (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci*, **7**, 204-210.
- Caldwell M.M. (1971). Solar UV irradiation and the growth and development of higher plants. In: *Photophysiology* (ed. Giese AC). Academic Press, New York, pp. 131-177.
- Caldwell M.M., Teramura A.H., Tevini M., Bornman J.F., Bjorn L.O. y Kulandaivelu G. (1995). Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial plants. *Ambio*, **24**, 166-173.
- Caldwell M.M. y Flint S.D. (1997). Uses of biological weighting functions and the need of scaling for the ozone reduction problem. *Plant Ecol*, **128**, 66-76.
- Caldwell M.M., Ballaré C.L., Bornman J.F., Flint S.D., Björn L.O., Teramura A.H., Kulandaivelu G. y Tevini M. (2003). Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochem Photobiol. Sci.*, **2**, 29-38.
- Carpita N. y McCann M. (2000). The cell wall. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (eds. Buchanan B, Gruissem W & R. Jones E). American Society of Plant Physiologistspp. 52-108.
- Casal J.J. y Smith H. (1989). The "end-of-day" phytochrome control of internode elongation in mustard. Kinetics, interaction with the previous fluence rate, and ecological implications. *Plant Cell Environ*, **12**, 511-520.
- Chalker-Scott L. (1999). Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem Photobiol*, **70**, 1-9.
- Chappell J. y Hahlbrock K. (1984). Transcription of plant defense genes in response to UV light or fungal elicitor. *Nature*, **311**, 76-78.
- Cipollini D.F. y Bergelson J. (2001). Plant density and nutrient availability constrain constitutive and wound-induced expression of trypsin inhibitors in *Brassica napus*. *J Chem Ecol*, **27**, 593-610.
- Cipollini D.F. (2002). Does competition magnify the fitness costs of induced responses in *Arabidopsis thaliana*? A manipulative approach. *Oecologia*, **131**, 514-520.
- Cipollini D.F. y Bergelson J. (2002). Interspecific competition affects growth and herbivore damage of *Brassica napus* in the field. *Plant Ecol*, **162**, 227-231.
- Conconi A., Smerdon M.J., Howe G.A. y Ryan C.A. (1996). The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature*, **383**, 826-829.

- Day T.A., Ruhland C.T. y Xiong F.S. (2001). Influence of solar ultraviolet-B radiation on Antarctic terrestrial plants: results from a four year field study. *J Photochem Photobiol B Biol*, **62**, 78-87.
- Desikan R., Hancock J.T., Coffey M.J. y Neill S.J. (1996). Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Lett*, **382**, 213-217.
- Dicke M., Van Beek T.A., Posthumus M.A., Ben-Dom N., Van Bokhoven H. y De Groot A.E. (1990). Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions. *J Chem Ecol*, **16**, 381-396.
- Dicke M. (1999). Evolution of induced indirect defense of plants. In: *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses* (eds. Harwell CD & Trolldenier R). Princeton University Press, Princeton, NJ, pp. 62-88.
- Dicke M. y Van Loon L.C. (2000). Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomol Exp Appl*, **97**, 237-249.
- Dixon R.A., Choudhary A.D., Dalkin D., Edwards R., Fahrendorf T., Gowri G., Harrison M.J., Lamb C.J., Loake G.J., Maxwell C.A., Orr J. y Paiva N.L. (1992). Molecular biology of stress-induced phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. In: *Phenolic Metabolism in Plants* (eds. Stafford HA & Ibrahim RK). Plenum Press, New York, pp. 91-138.
- Dixon R.A. y Paiva N.L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, **7**, 1085-1097.
- Elliger C.A., Wong Y., Chan B.G. y Waiss A.C.J. (1981). Growth inhibitor in tomato (*Lycopersicon*) to tomato fruitworm (*Heliothis zea*). *J Chem Ecol*, **5**, 753-758.
- Eulgem T., Rushton P.J., Robatzek S. y Somssich I.E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, **5**, 199-206.
- Felton G.W., Broadway M.R. y Duffey S.S. (1989a). Inactivation of protease inhibitor activity by plant-derived quinones: complications for host-plant resistance against noctuid herbivores. *J Insect Physiol*, **35**, 981-990.
- Felton G.W., Donato K.K., Del Vecchio R.J. y Duffey S.S. (1989b). Activation of plant polyphenol oxidases by insect feeding damage reduces the nutritive quality of foliage. *J Chem Ecol*, **15**, 2667-2694.

- Firn R.D. y Jones C.G. (2000). The evolution of secondary metabolism - a unifying model. *Mol Microbiol*, **37**, 989-994.
- Fiscus E.L. y Booker F.L. (1995). Is increased UV-B a threat to crop photosynthesis and productivity? *Photosynth Res*, **43**, 81-92.
- Frohnmeier H., Loyall L., Blatt M.R. y Grabov A. (1999). Millisecond UV-B irradiation evokes prolonged elevation of cytosolic-free Ca^{2+} and stimulates gene expression in transgenic parsley cell cultures. *Plant J*, **20**, 109-117.
- Gatehouse J.A. (2002). Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytol*, **156**, 145-169.
- Glässgen W.E., Rose A., Madlung J., Koch W., Gleitz J. y Seitz H.U. (1998). Regulation of enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in carrot cell cultures in response to treatment with ultraviolet light and fungal elicitors. *Planta*, **204**, 490-498.
- Green R. y Fluhr R. (1995). UV-B-induced PR-1 accumulation is mediated by active oxygen species. *Plant Cell*, **7**, 203-212.
- Hahlbrock K. y Scheel D. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **40**, 347-369.
- Hahlbrock K., Scheel D., Logemann E., Nurnberger T., Parniske M., Reinold S., Sacks W. y Schmelzer E. (1995). Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 4150-4157.
- Halitschke R., Gase K., Hui D., Schmidt D.D. y Baldwin I.T. (2003). Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VI. Microarray analysis reveals that most herbivore-specific transcriptional changes are mediated by fatty acid-amino acid conjugates. *Plant Physiol*, **131**, 1894-1902.
- Harborne J.B. (1988). *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*. Chapman & Hall, London.
- Harborne J.B. y Williams C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **22**, 481-504.
- Hatcher P.E. y Paul N.D. (1994). The effect of elevated UV-B radiation on herbivory of pea by *Autographa gamma*. *Entomol Exp Appl*, **71**, 227-233.

- Heidel A.J. y Baldwin I.T. (2004). Microarray analysis of salicylic acid- and jasmonic acid-signalling in responses of *Nicotiana attenuata* to attack by insects from multiple feeding guilds. *Plant Cell Environ*, **27**, 1362–1373.
- Helbling E. y Zagarese H.E. (2003). *UV effect in aquatic organisms and ecosystems*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Herman K.M. (1995). The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell*, **7**, 907–919.
- Hermes D.A. y Mattson W.J. (1992). The dilemma of plants: to grow or defend. *Q Rev Biol*, **67**, 283-335.
- Hermesmeier D., Schittko U. y Baldwin I.T. (2001). Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. *Plant Physiol*, **125**, 683-700.
- Hideg E., I. V., T. K. y K. H. (2000). Singlet oxygen detection with sterically hindered amine derivatives in plants under light stress. *Methods Enzymol*, **319**, 77-85.
- Hideg É., Barta C., Kálai T., Vass I., Hideg K. y Asada K. (2002). Detection of singlet oxygen and superoxide with fluorescent sensors in leaves under stress by photoinhibition or UV radiation. *Plant Cell Physiol*, **43**, 1154-1164.
- Holmes M.G. y Smith H. (1977). The function of phytochrome in the natural environment. I. Characterisation of daylight for studies in photomorphogenesis and photoperiodism. *Photochem Photobiol*, **25**, 533-538.
- Horwath K.L. y Stamp N.E. (1993). Use of dietary rutin to study molt initiation in *Manduca sexta* larvae. *J Insect Physiol*, **11**, 987-1000.
- Howe G.A., Lightner J., Browse J. y Ryan C.A. (1996). An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell*, **8**, 2067-2077.
- Hui D., Iqbal J., Lehmann K., Gase K., Saluz H.P. y Baldwin I.T. (2003). Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*: V. Microarray analysis and further characterization of large-scale changes in herbivore-induced mRNAs. *Plant Physiol*, **131**, 1877-1893.
- Hunt J.E. y McNeil D.L. (1999). The influence of present-day levels of ultraviolet-B radiation on seedlings of two southern hemisphere temperate tree species. *Plant Ecol*, **143**, 39-50.

- Hurrell R.F. y Finot P.A. (1985). Effects of food processing on protein digestibility and amino acid availability. In: *Digestibility and Amino Acid Availability in Cereals and Oilseeds* (eds. Finley JW & Hapkins DT). American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN., pp. 233-246.
- Ikonen A., Tahvanainen J. y Roininen H. (2001). Chlorogenic acid as an antiherbivore defence of willows against leaf beetles. *Entomol Exp Appl*, **99**, 47-54.
- Isman M.B. y Duffey S.S. (1982). Toxicity of tomato phenolic compounds to the fruitworm, *Heliothis zea*. *Entomol Exp Appl*, **31**, 370-373.
- Jacobs M. y Rubery P.H. (1988). Naturally occurring auxin transport regulators. *Science*, **241**, 346-349.
- Jansen M.P.T. y Stamp N.E. (1997). Effects of light availability on host plant chemistry and the consequences for behavior and growth of an insect herbivore. *Entomol Exp Appl*, **82**, 319-333.
- Jongsma M.A., Bakker P.L. y Stiekema W.J. (1993). Quantitative determination of serine proteinase inhibitor activity using a radial diffusion assay. *Anal Biochem*, **212**, 79-84.
- Jongsma M.A., Bakker P.L., Visser B. y Stiekema W.J. (1994). Trypsin inhibitor activity in mature tobacco and tomato plants is mainly induced locally in response to insect attack, wounding and virus infection. *Planta*, **195**, 29-35.
- Jordan B.R., Chow H.J. y Anderson J.M. (1992). Changes in mRNA levels and polypeptide subunits of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in response to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant Cell Environ*, **15**, 91-98.
- Kalbin G., Hidema J., Brosché M., Kumagai T., Bornman J.F. y Strid A. (2001). UV-B-induced DNA damage and expression of defence genes under UV-B stress: tissue-specific molecular marker analysis in leaves. *Plant Cell Environ*, **24**, 983-990.
- Karban R. y Myers J.H. (1989). Induced plant responses to herbivory. *Annu Rev Ecol Syst*, **20**, 331-348.
- Karban R. y Baldwin I.T. (1997). *Induced responses to herbivory*. Chicago University Press.
- Keinänen M., Oldham N.J. y Baldwin I.T. (2001). Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in *Nicotiana attenuata*. *J Agric Food Chem*, **49**, 3553-3558.

- Keller T., Damude H.G., Werner D., Doerner P., Dixon R.A. y Lamb C. (1998). A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell*, **10**, 255-266.
- Kessler A. y Baldwin I.T. (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, **291**, 2141-2144.
- Krizek D.T., Britz S.J. y Mirecki R.M. (1998). Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. New Red Fire lettuce. *Physiol Plant*, **103**, 1-7.
- Kurashige N.S. y Agrawal A.A. (2005). Phenotypic plasticity to light competition and herbivory in *Chenopodium album* (Chenopodiaceae). *American Journal of Botany*, **92**, 21-26.
- Lamb C. y Dixon R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **48**, 251-275.
- Laudert D. y Weiler E.W. (1998). Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *The Plant Journal*, **15**, 675-654.
- Lavola A., Julkunen-Tiitto R., Roininen H. y Aphalo P. (1998). Host-plant preference of an insect herbivore mediated by UV-B and CO₂ in relation to plant secondary metabolites. *Biochemical Systematics and Ecology*, **26**, 1-12.
- Leatham G.F., King V. y Stahmann M.A. (1980). *In vitro* polymerization of quinones or free radicals generated by plant or fungal oxidative enzymes. *Phytopathology*, **70**, 1134-1140.
- Lewis N.G. y Yamamoto E. (1990). Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **41**, 455-496.
- Li L., Li C. y Howe G.A. (2001). Genetic analysis of wound signaling in tomato. Evidence for a dual role of jasmonic acid in defense and female fertility. *Plant Physiol*, **127**, 1414-1417.
- Li L., Li C., Lee G.I. y Howe G.A. (2002). Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 6416-6421.
- Lightner J., Browse J. y Ryan C.A. (1993). Isolation of signalling mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Molecular Genetics and Genomic*, **241**, 595-601.
- Lukefahr M.J. y Martin D.F. (1966). Cotton plant pigments as a source of resistance to the bollworm and tobacco budworm. *Journal of Economical Entomology*, **59**, 176-179.
- Madronich S., Mc Kenzie R.L., Björn L.O. y Caldwell M.M. (1998). Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. In: *Assessment 1998 Environmental Effects of Ozone Depletion*, UNEP

- Malanga G. y Puntarulo S. (1995). Oxidative responses and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation. *Physiol Plant*, **94**, 672-679.
- Mallikarjuna N., Kranthi K.R., Jadhav D.R., Kranthi S. y Chandra S. (2004). Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut. *J Appl Entomol*, **128**, 321-328.
- Mazza C.A., Battista D., Zima A., Szwarcberg-Bracchitta M., Giordano C.V., Acevedo A., Scopel A.L. y Ballaré C.L. (1999a). The effects of solar UV-B radiation on the growth and yield of barley are accompanied by increased DNA damage and antioxidant responses. *Plant Cell Environ*, **22**, 61-67.
- Mazza C.A., Zavala J., Scopel A.L. y Ballaré C.L. (1999b). Perception of solar UVB radiation by phytophagous insects: Behavioral responses and ecosystem implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 980-985.
- Mazza C.A., Boccalandro H.E., Giordano C.V., Battista D., Scopel A.L. y Ballaré C.L. (2000). Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiol*, **122**, 117-125.
- Mazza C.A., Izaguirre M.M., Zavala J., Scopel A.L. y Ballaré C.L. (2002). Insect perception of ambient ultraviolet-B radiation. *Ecology Letters*, **5**, 722-726.
- McCloud E.S. y Berenbaum M.R. (1994). Stratospheric ozone depletion and plant-insect interactions: effects of UVB radiation on foliage quality of Citrus jambhiri for Trichoplusia ni. *J Chem Ecol*, **20**, 525-539.
- McGurl B., Pearce G., Orozco-Cardenas M.L. y Ryan C.A. (1992). Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science*, **255**, 1570-1572.
- McKenzie R.L., Björn L.O., Bais A. y Ilyasd M. (2003). Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochem Photobiol. Sci.*, **2**, 5-15.
- Meiners T. y Hilker M. (2000). Induction of plant synomones by oviposition of a phytophagous insect. *J Chem Ecol*, **26**, 221-232.
- Mølgaard P. y Ravn H. (1988). Evolutionary aspects of caffeoyl ester distribution in dicotyledons. *Phytochemistry*, **27**, 2411-2421.
- Montoya T., Nomura T., Farrar K., Kaneta T., Yokota T. y Bishop G.J. (2002). Cloning the tomato Curl3 gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. *Plant Cell*, **14**, 3163-3176.

- Oommen A., Dixon R.A. y Paiva N.L. (1994). The elicitor-inducible alfalfa isoflavone reductase promoter confers different patterns of developmental expression in homologous and heterologous transgenic plants. *Plant Cell*, **6**, 1789-1803.
- Orozco-Cárdenas M.L. y Ryan C.A. (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 6553-6557.
- Orozco-Cárdenas M.L., Narváez-Vásquez J. y Ryan C.A. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell*, **13**, 179-191.
- Paul N.D., Rasanayagam S., Moody S.A., Hatcher P.E. y Ayres P.G. (1997). The role of interactions between trophic levels in determining the effects of UV-B on terrestrial ecosystems. *Plant Ecol*, **128**, 297-308.
- Pearce G., Strydom D., Johnson S. y Ryan C.A. (1991). A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*, **253**, 895-898.
- Pierpoint W.S. (1983). Reactions of phenolic compounds with proteins, and their relevance to the production of leaf protein. In: *Leaf Protein Concentrates* (eds. Telek L & Graham HD). Avi Publishing Comp. Inc., Wesport CT., pp. 235-267.
- Pohlon E. y Baldwin I.T. (2001). Artificial diets 'capture' the dynamics of jasmonate-induced defenses in plants. *Entomol Exp Appl*, **100**, 127-130.
- Rao M.V., Paliyath G. y Ormrod D.P. (1996). Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, **110**, 125-136.
- Reymond P., Weber H., Damond M. y Farmer E.E. (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **12**, 707-719.
- Richard S., Lapointe G., Rutledge R.G. y Séguin A. (2000). Induction of chalcone synthase expression in white spruce by wounding and jasmonate. *Plant Cell Physiol*, **41**, 982-987.
- Roda A.L., Oldham N.J., Svatos A. y Baldwin I.T. (2003). Allometric analysis of the induced flavonols on the leaf surface of wild tobacco (*Nicotiana attenuata*). *Phytochemistry*, **62**, 527-536.
- Rojo E., León J. y Sánchez-Serrano J.J. (1999). Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **20**, 135-142.

- Rousseaux M.C., Ballaré C.L., Scopel A.L., Searles P.S. y Caldwell M.M. (1998). Solar ultraviolet-B radiation affects plant-insect interactions in a natural ecosystem of Tierra del Fuego (southern Argentina). *Oecologia*, **116**, 528-535.
- Rousseaux M.C., Scopel A.L., Searles P.S., Caldwell M.M., Sala O.E. y Ballaré C.L. (2001). Responses to solar ultraviolet-B radiation in a shrub-dominated natural ecosystem of Tierra del Fuego (southern Argentina). *Global Change Biol*, **7**, 467-478.
- Rousseaux M.C., Julkunen-Tiitto R., Searles P.S., Scopel A.L., Aphalo P. y Ballaré C.L. (2004). Solar UV-B radiation affects leaf quality and insect herbivory in the southern beech tree *Notofagus antarctica*. *Oecologia*, **138**, 505-512.
- Rozema J., van de Staaij J.W.M., Biörn L.O. y Caldwell M.M. (1997). UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends Ecol Evol*, **12**, 22-28.
- Ryan C.A. y Pearce G. (1998). Systemin: a polypeptide signal for plant defensive genes. *Annual Review of Cell Development Biology*, **14**, 1-17.
- Ryan C.A. (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta*, **1477**, 112-121.
- Sävenstrand H., Brosché M. y Strid A. (2002). Regulation of gene expression by low levels of ultraviolet-B radiation in *Pisum sativum*: isolation of novel genes by suppression subtractive hybridisation. *Plant Cell Physiol*, **43**, 402-410.
- Scheer J.M. y Ryan C.A. (1999). A 160-kd systemin receptor on the surface of *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *Plant Cell*, **11**, 1525-1535.
- Schittko U., Hermsmeier D. y Baldwin I.T. (2001). Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. II. Accumulation of plant mRNAs in response to insect-derived cues. *Plant Physiol*, **125**, 701-710.
- Schmitt J. y Wulff R.D. (1993). Light spectral quality, phytochrome, and plant competition. *Trends Ecol Evol*, **8**, 47-50.
- Searles P.S., Caldwell M.M. y Winter K. (1995). The response of five tropical dicotyledon species to solar ultraviolet-B radiation. *American Journal of Botany*, **82**, 445-453.
- Searles P.S., Flint S.D. y Caldwell M.M. (2001). A meta-analysis of plant field studies simulating stratospheric ozone depletion. *Oecologia*, **127**, 1-10.
- Sinclair S.J., Johnson R. y Hamill J.D. (2004). Analysis of wound-induced gene expression in *Nicotiana* species with contrasting alkaloid profiles. *Funct Plant Biol*, **31**, 721-729.

- Sivasankar S., Sheldrick B. y Rothstein S.J. (2000). Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. *Plant Physiol*, **122**, 1335–1342.
- Slansky Jr. F. (1982). Symposium: Insect Behavioral Ecology'81: Insect Nutrition: An Adaptationist's Perspective. *Fla Entomol*, **65**, 45-71.
- Smith D.A. (1982a). Toxicity of phytoalexins. In: *Phytoalexins* (eds. Bailey JA & Mansfield JW). John Wiley and Sons, New York, pp. 218-252.
- Smith H. (1982b). Light quality, photoperception, and plant strategy. *Annual Review of Plant Physiology*, **33**, 481-518.
- Smith H. (1995). Physiological and ecological function within the phytochrome family. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **46**, 289-315.
- Smith H. (2000). Phytochromes and light signal perception by plants-an emerging synthesis. *Nature*, **407**, 585-596.
- Stahmann M.A., Spencer A.K. y Honold G.R. (1977). Cross linking of proteins by peroxidase *in vitro*. *Biopolymers*, **16**, 1299-1306.
- Stamp N.E. (1990). Growth versus molting time of caterpillars as a function of temperature, nutrient concentration and the phenolic rutin. *Oecologia*, **82**, 107-113.
- Stamp N.E. y Horwath K.L. (1992). Interactive effects of temperature and concentration of the flavonol rutin on growth, molt and food utilization of *Manduca sexta* caterpillars. *Entomol Exp Appl*, **64**, 135-150.
- Stamp N.E., Temple M.P., Traugot M.S. y Wilkens R.T. (1994). Temperature-allelochemical interactive effects on performance of *Manduca sexta* caterpillars. *Entomol Exp Appl*, **73**, 199-210.
- Staswick P.E., Yuen G.Y. y Lehman C.C. (1998). Jasmonate signaling mutants of Arabidopsis are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J*, **15**, 747-754.
- Stratmann J.W. y Ryan C.A. (1997). Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 11085–11089.
- Stratmann J.W., Stelmach B.A., Weiler E.W. y Ryan C.A. (2000). UVB/UVA radiation activates a 48 kDa myelin basic protein kinase and potentiates wound signaling in tomato leaves. *Photochem Photobiol*, **71**, 116-23.
- Strid A., Chow W. y Anderson J.M. (1996). Changes in the relaxation of electrochromic shifts of photosynthetic pigments and in the levels of mRNA transcripts in leaves of *Pisum Sativum*

- as a result of exposure to supplementary UV-B radiation. The dependency on the intensity of the photosynthetically active radiation. *Plant Cell Physiol*, **37**, 61-67.
- Summers C.B. y Felton G.W. (1994). Prooxidant effects of phenolic acids on the generalist herbivore *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): Potential mode of action for phenolic compounds in plant anti-herbivore chemistry. *Insect Biochem Mol Biol*, **24**, 943-953.
- Surplus S.L., Jordan B.R., Murphy A.M., Carr J.P., Thomas B. y A.-H.-Mackerness S. (1998). Ultraviolet-B-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic pathogenesis-related proteins. *Plant Cell Environ*, **21**, 685-694.
- Thomma B.P.H.J., Eggermont K., Penninckx I.A.M.A., Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B.P.A. y Broekaert W.F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 15107-15111.
- Traugott M.S. y Stamp N.E. (1997). Effects of chlorogenic acid- and tomatine-fed caterpillars on performance of an insect predator. *Oecologia*, **109**, 265-272.
- Turlings T.C.J., Tumlinson J.H. y Lewis W.J. (1990). Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science*, **250**, 1251-1253.
- Usami S., Banno H., Ito Y., Nishihama R. y Machida Y. (1995). Cutting activates a 46-kilodalton protein kinase in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 8660-8664.
- van Dam N.M. y Baldwin I.T. (2001). Competition mediates costs of jasmonate-induced defences, nitrogen acquisition and transgenerational plasticity in *Nicotiana attenuata*. *Funct Ecol*, **15**, 1-10.
- van Dam N.M., Horn M., Mares M. y Baldwin I.T. (2001). Ontogeny constrains the systemic protease inhibitor response in *Nicotiana attenuata*. *J Chem Ecol*, **27**, 547-568.
- Vijayan P., Shockey J., Lévesque C.A., Cook R.J. y Browse J. (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 7209-7214.
- Voelckel C. y Baldwin I.T. (2003). Detecting herbivore-specific transcriptional responses in plants with multiple DDRT-PCR and subtractive library procedures. *Physiol Plant*, **118**, 240-252.
- Voelckel C. y Baldwin I.T. (2004). Generalist and specialist lepidopteran larvae elicit different transcriptional responses in *Nicotiana attenuata*, which correlate with larval FAC profiles. *Ecology Letters*, **7**, 770-775.

- Vogt T., Pollak P., Tarlyn N. y Taylor L.P. (1994). Pollination- or wound-induced kaempferol accumulation in petunia stigmas enhances seed production. *The Plant Cell*, **6**, 11-23.
- Walling L.L. (2000). The myriad plant responses to herbivores. *J Plant Growth Regul*, **19**, 195-216.
- Weber H. (2002). Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci*, **7**, 217-224.
- Wilkens R.T., Spoerke J.M. y Stamp N.E. (1996). Differential responses of growth and two soluble phenolics of tomato to resource availability. *Ecology*, **77**, 247-258.
- Willekens H., Langebartels C., Tire C., Montagu M., Inze D. y Camp W. (1994). Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 10450-10454.
- Williamson C., Zagarese H., Schulze P., Hargreaves B. y Seva J. (1994). The impact of short-term exposure to UV-B radiation on zooplankton communities in north temperate lakes. *J Plankton Res*, **16**, 205-218.
- Yalamanchili R.D. y Stratmann J.W. (2002). Ultraviolet-B activates components of the systemin signaling pathway in *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *J Biol Chem*, **277**, 28424-28430.
- Yang S.Y., Stamp N.E. y Osier T.L. (1996). Effects of temperature, multiple allelochemicals and larval age on the performance of a specialist caterpillar. *Entomol Exp Appl*, **79**, 335-344.
- Yang T. y Poovaiah B.W. (2002). A calmodulin-binding/CGCG Box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *J Biol Chem*, **277**, 45049-45058.
- Zavala J., Scopel A.L. y Ballaré C.L. (2001). Effects of solar UV-B radiation on soybean crops: Impact on leaf herbivory by *Anticarsia gemmatilis*. *Plant Ecol*, **156**, 121-130.
- Ziegler J., Keinänen M. y Baldwin I.T. (2001). Herbivore-induced allene oxide synthase transcripts and jasmonic acid in *Nicotiana attenuata*. *Phytochemistry*, **58**, 729-738.