



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología y Biología Molecular

**Efectos de la competencia
sobre las defensas inducibles por insectos
de *Arabidopsis thaliana***

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

Lic. Javier Edgardo Moreno

Director de tesis: Dr. Carlos L. Ballaré

Consejero de estudios: Dr. Norberto Iusem

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología y Ecología Vinculadas a la Agricultura, Facultad de Agronomía,
Universidad de Buenos Aires-CONICET.

Buenos Aires, 2008

**Efectos de la competencia
sobre las defensas inducibles por insectos
de *Arabidopsis thaliana***

Jurados de Tesis Doctoral del Lic. Javier E. Moreno:

Nombre	Firma	Calificación
.....
.....
.....

Efectos de la competencia sobre las defensas inducibles por insectos de *Arabidopsis thaliana*

Resumen

El carácter sésil de las plantas ha condicionado la evolución de sus respuestas a los estímulos ambientales. La interacción de dos importantes fuerzas de selección, como la herbivoría y la competencia, parece haber resultado en un compromiso (“*trade-off*”) en la distribución de recursos de la planta a las respuestas frente a esos estímulos. Así las plantas deben crecer lo suficientemente rápido como para ser competitivas con sus vecinos y, al mismo tiempo, asignar recursos a la defensa para poder sobrevivir en ambientes donde hay organismos consumidores. Este compromiso en la asignación de recursos es conocido como el “dilema de las plantas” (crecer o defenderse). A nivel mecanístico, no está claro cómo las plantas resuelven este dilema. En esta tesis, describo que la radiación rojo lejano (RL), que le permite a la planta percibir la presencia de plantas vecinas a través de la inactivación del fitocromo, atenúa la respuesta de defensa de *Arabidopsis thaliana* contra el ataque de insectos herbívoros, y esta atenuación estaría mediada por una desensibilización de los tejidos de la planta frente a los jasmonatos, un grupo de fitohormonas que controlan las defensas contra insectos herbívoros. La mayoría de los efectos del RL estuvieron expresados en forma constitutiva en el mutante *phyB* (deficiente en fitocromo B), desaparecieron parcialmente en el mutante *jar1-1* (deficiente en la activación de respuestas a JA) y se conservaron en el mutante *sav3-2* (deficiente en la activación de respuestas morfológicas frente al RL). Los efectos del RL sobre la sensibilidad al JA parecieron ser específicos sobre la rama de respuesta a JA controlada por ERF1, un factor de transcripción cuya expresión resultó ser controlada por el fitocromo. Simultáneamente, el RL también indujo la sobre-expresión de algunos genes *JAZ* (represores de la vía del JA). Concluimos, que la desensibilización selectiva contra los jasmonatos es el mecanismo a través del cual la planta ajusta la expresión de defensas en función de cambios en la relación R:RL, que funciona como un indicador de futuras demandas de recursos para respuestas de crecimiento.

Palabras clave: competencia, relación rojo: rojo lejano, señales de competencia, herbivoría, compromisos, *Arabidopsis thaliana*, defensas inducibles de plantas, jasmonatos, desensibilización.

Effects of competence on plant inducible defenses against insect herbivores in *Arabidopsis thaliana*

Abstract:

Plants are sessile organisms. This attribute conditioned the evolution of plant responses to environmental stimuli. The interaction of two main selective forces, herbivory and competence, seems to have determined a trade off in resource allocation to plant responses to both stimuli. Plants must grow fast enough to be competitive against other plant neighbors, meanwhile allocates resources to synthesize defense against herbivores when they are present. This allocation compromise is known as the “dilemma” of plants; how plants resolve this dilemma, at the mechanistic level, is unclear. Here we show that reflected far-red radiation (FR), which signals the proximity of neighbors in plant canopies by inactivating the photoreceptor phytochrome, induced a drastic down-regulation of defenses in *Arabidopsis*, and that this down-regulation was mediated by a reduction in plant sensitivity to jasmonates, which mediates plant inducible response to insects. Most of the FR effects on plant defense were constitutively expressed in *phyB*, a mutant that lacks phytochrome B, nearly absent in *jar1-1*, a mutant impaired in jasmonate signaling, and conserved in *sav3-2*, a mutant that has normal levels of phytochrome but fails to initiate a suite of competition responses known as the shade avoidance syndrome (SAS). The effects of reflected FR on jasmonate sensitivity were specific to those aspects of the jasmonate response thought to be controlled by ERF1, a transcription factor whose expression we found to be regulated by phytochrome. Concurrently, FR also over-expressed some of the members of the *JAZ* family (repressors of JA pathway). I conclude that selective desensitisation to jasmonates is the mechanism whereby the plant fits its inducible defenses against insect attack to changes in R:FR ratio, a signal of future energy demand to growth responses.

Keywords: competence, red: far red ratio, light signals of competence, herbivory, trade-off, *Arabidopsis thaliana*, plant defenses, jasmonic acid, desensitisation.

Agradecimientos

A Leti por todo su amor, estímulo y paciencia diaria. Por ser mi *laetitia*.

A Juani y Francisca por hacerme feliz cada día.

A mis padres y mis hermanos, por todo el apoyo, respeto y amor que me brindaron en este camino que tantas veces les ha resultado incomprensible.

A Carlos Ballaré por darme libertad para trabajar y pensar, por estar abierto a recibir mis ideas. Por haberme mostrado el mundo desconocido de la eco-fisiología.

A Marcelo Yanovsky por estar siempre dispuesto a responder mis preguntas y a compartir sus datos.

A los amigos que he conocido trabajando en el IFEVA.

Muy especialmente a Miriam Izaguirre, Carlos Mazza y Ana Zima, que desde un principio compartieron todo.

A los que pasaron junto a mí por el Laboratorio de UV: Mariela Szwarcberg, Carla Giordano, Carla Caputo, Silvia De Simone, Mariana Conte, Guadalupe Galíndez, Mariela Biondini, Iván Fojo, y a las últimas incorporaciones Patricia Demkura y Mercedes Keller. Quiero agradecer especialmente a Miriam Cargnel, que tanto me ayudó en mi trabajo de tesis y especialmente por sus palabras de ánimo cuando las cosas no salían y teníamos que volver a empezar.

A los del Sacks, mi segunda oficina y lugar de mis primeros almuerzos en el IFEVA: Mollard, Stricker, Rotundo, Maseda y Tognetti. A las historias de Rolando León.

A los del Lab. “Grande” que he molestado en tantas oportunidades y viceversa. A los que se fueron: Boccalandro, Luccioni, Oliverio, Arana y a los que todavía están: Trupkin, Mati Rugnone, Giglione, Romina Sellaro, Eli, Blondi, Gaby Auge, Paulita, Paula, Silvia, María, Sabrina. A Guille y Vero del lab de Semillas.

A Anita Faigón y Leo Storani por su entrañable amistad.

A los amigos con los que compartí otras cosas: Biganzoli, Rolo, Gundel, Rafa Mac Donough, Irizarri.

A los ecólogos del IFEVA por ayudarme a ampliar mi visión y mis preguntas.

Al IFEVA por pasar a estar en mis mejores recuerdos.

A la UBA, universidad pública y gratuita que me permitió estudiar y crecer profesionalmente. Al CONICET por haber financiado mi trabajo de tesis.

Los resultados de esta Tesis fueron parcialmente incluidos en las siguientes publicaciones:

Moreno JE, Tao Y, Chory J, Ballaré CL. "Ecological modulation of plant defense via phytochrome control of jasmonate sensitivity". *En revisión*.

Tao Y, Ferrer JL, Pojer F, Hong F, Ljung K, Long JA, Li L, **Moreno JE**, Bowman ME, Ivans LJ, Lim J, Ballaré CL, Sandberg G, Noel JP, Chory J. "A new tryptophan-dependent pathway for auxin biosynthesis is required for the shade avoidance response of plants" (2008). *Cell*, 133(1):164-76.

*'It is not the strongest of species that survive or the most intelligent
but the ones most responsive to change'*
Charles R. Darwin (1859)

INDICE

Resumen		I
Abstract		II
Agradecimientos		III
Publicaciones		IV
		V
Indice		VI
Capítulo 1	introducción general	1
Capítulo 2	materiales y métodos	21
Capítulo 3	defensas inducibles, impacto de la competencia	32
Capítulo 4	señales de competencia y sensibilidad al JA, ensayos químicos y mutantes	44
Capítulo 5	mutante <i>sav3</i>, desacopla el SAS de las defensas, caracterización funcional y bioensayo	54
Capítulo 6	desensibilización contra el JA, el efecto del RL es selectivo	69
Capítulo 7	discusión general y conclusiones	88

capítulo

1

introducción general

CAPITULO 1

INTRODUCCION GENERAL

1. Evolución y respuestas de las plantas a estímulos ambientales

La evolución de las plantas ha estado condicionada por su carácter sésil. A diferencia de otros organismos, las plantas deben lidiar con factores ambientales bióticos o abióticos sin la posibilidad de escapar del estrés. Por ello, las plantas a lo largo de la historia de su evolución han ido fijando complejos mecanismos de respuesta que le permiten hacer frente a los estímulos ambientales (Valladares *et al.*, 2007).

Una historia de vida es consecuencia de fuerzas evolutivas de largo plazo pero también de respuestas inmediatas del organismo al ambiente en el que vive. La capacidad de un genotipo para responder de manera diferente a ambientes distintos se conoce como plasticidad fenotípica (Bradshaw, 1965). La historia de vida de un organismo resulta de un compromiso en la asignación de los recursos que están disponibles. Y los recursos invertidos en una respuesta no estarán disponibles para otra (Karban & Baldwin, 1997). Esto hace que la plasticidad observada sea menor a la plasticidad potencial máxima debido a la limitación de recursos o a la presencia de algún estímulo ambiental (Callaway *et al.*, 2003; van Kleunen & Fischer, 2005). Un compromiso, o *trade off*, es una relación negativa entre dos características de una historia de vida, donde el aumento de una está asociado a una reducción de la otra (Begon *et al.*, 2005). Estos compromisos durante la historia de vida, han generado mecanismos a través de los cuales el individuo puede controlar la expresión de respuestas plásticas, que en última instancia le permiten maximizar su capacidad de dejar descendencia, *fitness*, en ambientes cambiantes (Sultan, 2000).

2. Compromiso entre respuestas de crecimiento y defensas

Para el caso particular de las plantas, hay un consenso generalizado sobre la existencia de un compromiso entre las respuestas de crecimiento y las de defensa contra herbívoros (Figura 1) *i.e.*: (Rhoades, 1983; Coley *et al.*, 1985; Herms & Mattson, 1992). Esto llevó a plantear un modelo donde la generación de defensas contra el ataque de insectos herbívoros

puede estar restringida dependiendo gradualmente de la existencia de condiciones ambientales que promueven el crecimiento de la planta (Cipollini, 2004). Uno de los estímulos ambientales mas habituales, que desencadena respuestas de crecimiento, es la presencia de plantas vecinas. En este contexto, se predice que las plantas capaces de detectar y responder a la presencia de otras plantas vecinas serían mas susceptibles al ataque por insectos herbívoros por tener debilitadas sus defensas, y viceversa. A esta situación de compromiso se lo conoce en la literatura como el **“dilema de las plantas”** entre crecer o defenderse (Herms & Mattson, 1992).

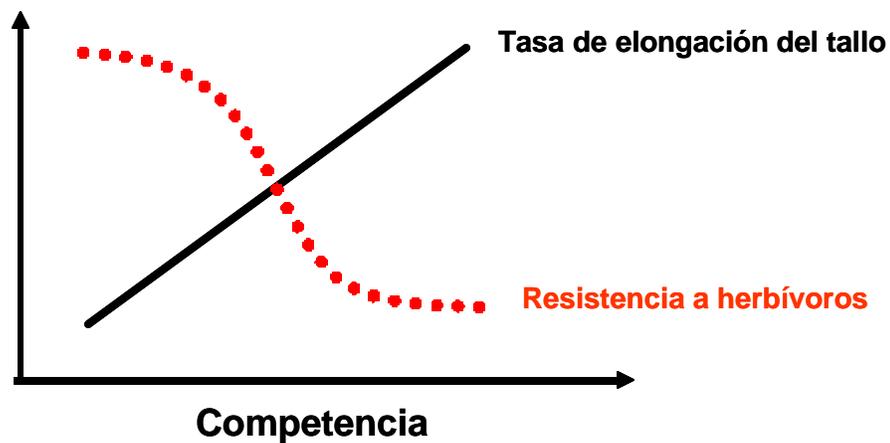


Figura 1: Relación hipotética entre una respuesta de crecimiento de la planta, tasa de elongación del tallo, y una respuesta de defensa, resistencia a herbívoros, bajo distintos niveles de sombreado producidos por la presencia de plantas vecinas (adaptado de Cipollini, 2004).

Esta relación negativa entre la disponibilidad de recursos y las defensas ha sido reportada en sistemas naturales y cultivados. Plantas cultivadas en sitios sombreados fueron preferidas por insectos herbívoros respecto de plantas cultivadas en sitios abiertos, *i.e.*, (Louda *et al.*, 1987; Dudt & Shure, 1994; Kurashige & Agrawal, 2005); también se registró una disminución en la tasa de crecimiento de plantas de *Impatiens capensis* infestadas con roya en condiciones de alta densidad de siembra respecto de otros de baja densidad (Lively *et al.*, 1995). En la misma dirección, plantas sombreadas de *Chenopodium album* mostraron una resistencia reducida (mortalidad de orugas) a la herbivoría respecto de otras cultivadas bajo plena luz solar (Kurashige & Agrawal, 2005).

Este compromiso también ha sido registrado a la inversa. En un estudio con enredaderas de la especie *Convolvulus arvensis*, se demostró que el daño mecánico previo al sombreado

limita la habilidad de esa planta para promover los cambios morfológicos típicamente inducidos por la sombra (Gianoli *et al.*, 2007), como la elongación de los entrenudos y pecíolos, el aumento de la relación largo:ancho de la hoja, entre otras. También se ha observado que plantas dañadas de *Convolvulus demissus* mostraron una menor capacidad de respuesta a la sequía que plantas no dañadas (Quezada & Gianoli, 2006). Es decir que la herbivoría además de poder reducir *per se* el *fitness* del individuo, puede limitar las respuestas plásticas de la planta inducidas por el ambiente.

3. Costos derivados de las respuestas a las condiciones ambientales

Insectos herbívoros: posibles consumidores

La generación de defensas anti-herbívoro tiene un alto costo que sólo puede ser justificado en el contexto evolutivo a través de un mayor *fitness*. Esto se hace evidente cuando se estudian las defensas que son sintetizadas únicamente después del ataque del herbívoro, que es precisamente cuando los beneficios de la defensa pueden contrarrestar los costos derivados de su producción (Karban & Baldwin, 1997). Plantas transgénicas de *Nicotiana attenuata* que expresaban constitutivamente unas proteínas de defensa contra insectos, los inhibidores de proteinasas (PINs, del inglés *proteinase inhibitors*), mostraron un *fitness* menor que plantas del genotipo salvaje donde las PINs forman parte del sistema inducido por los herbívoros (Zavala *et al.*, 2004). Por todo esto, se piensa que las defensas inducibles son una forma de plasticidad fenotípica que permite a la planta ajustar su fenotipo al ambiente en el que vive (Agrawal, 1998; Baldwin, 1998; Cipollini, 1998; Agrawal, 1999; Baldwin, 1999).

Plantas vecinas: posibles competidores

Los cambios morfológicos y funcionales inducidos en una planta por la presencia de plantas vecinas, denominados conjuntamente “síndrome de escape al sombreado” (SAS, del inglés *shade avoidance syndrome*), también tienen un costo. Ese costo repercute negativamente en el *fitness* del individuo cuando se promueve artificialmente en ambientes sin competencia. El mutante *phyB*, que expresa constitutivamente un fenotipo de competencia aún creciendo bajo plena luz solar, tuvo un menor rendimiento que el genotipo salvaje en condiciones de baja densidad de cultivo (Ballaré & Scopel, 1997) y algo similar

ocurrió para otros mutantes, *hy1* y *hy2*, que también expresan el fenotipo SAS de forma permanente (Pigliucci & Schmitt, 1999). En determinados ambientes el costo puede no ser energético sino estar asociado al momento en el que se induce el SAS, *e.g.*: la floración anticipada que habitualmente acompaña al SAS puede ser perjudicial en determinadas condiciones ambientales. Claro que este síndrome otorga una ventaja en *fitness* cuando hay presencia de otras plantas que compiten por recursos limitantes (Ballaré, 1999).

4. Respuesta contra el ataque de herbívoros: fitohormonas involucradas

Como consecuencia de la inevitable interacción con los herbívoros, las plantas terrestres han seleccionando mecanismos de respuestas que involucran desde una línea basal permanente conocida como defensas *constitutivas* hasta otra línea de defensas disparadas por el herbívoro conocidas como *inducibles*. Entre las defensas constitutivas se encuentran los tricomas, espinas, ceras epicuticulares, inhibidores de proteinasas (PINs) y metabolitos secundarios como los fenilpropanoides, los glucosinolatos en crucíferas, entre otros. Esta primera línea de defensa puede ser fortalecida luego de la percepción del herbívoro constituyendo las defensas inducibles, *i.e.*: la densidad de tricomas en hojas nuevas aumenta luego del contacto con insectos herbívoros (Traw & Bergelson, 2003), lo mismo sucede con la síntesis de glucosinolatos y PINs en *Arabidopsis* (Cipollini, 2004; Mewis *et al.*, 2005). Estas defensas inducibles requieren de la percepción del herbívoro y de algún mensajero que induzca la síntesis *de novo* de metabolitos secundarios y la acumulación de proteínas con función anti-herbívoro.

La respuesta de la planta a los herbívoros depende en mayor medida de la fitohormona ácido jasmónico (JA, Figura 2) (Creelman & Mullet, 1997). La vía de señalización del JA juega un rol central en las respuestas disparadas por el ataque de insectos (Kessler & Baldwin, 2002; Li *et al.*, 2005), aunque se ha descrito que la respuesta final a estos insectos depende de una delicada y compleja interacción con las vías del ácido salicílico (SA) (Delaney *et al.*, 1994) y del etileno (ET) (O'Donnell *et al.*, 1996). Para algunos sistemas, se ha reportado que la vía del JA y SA son antagónicas, *i.e.*: plantas de tabaco infectadas por el virus del mosaico del tabaco (TMV por sus siglas en inglés) son mas vulnerables a la oruga *Heliothis virescens* (Felton *et al.*, 1999; Felton & Korth, 2000). Empleando un análogo estructural del SA, el benzothiadiazole (BTH) sobre plantas de

tomate, se encontró una menor expresión del gen de la polifenol oxidasa, un gen marcador de la vía del JA, resultando comprometida su resistencia a larvas de *Spodoptera exigua* (Thaler *et al.*, 1999; Bostock, 2005). Este antagonismo había sido probado con anterioridad a nivel molecular donde tratamientos con SA inhibían la inducción de genes de respuesta a herida controlados por el JA (Doherty *et al.*, 1988; Peña-Cortes *et al.*, 1993). En el sentido contrario, se demostró que plantas de *Arabidopsis* inducidas por larvas de *Pieris rapae* fueron mas resistentes a las enfermedades causadas por las bacterias *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* (De Vos *et al.*, 2006). Este resultado indica que la respuesta de defensa al ataque simultáneo de distintos organismos es el resultado de una compleja red de señales modulada por los organismos atacantes y por las condiciones ambientales reinantes.

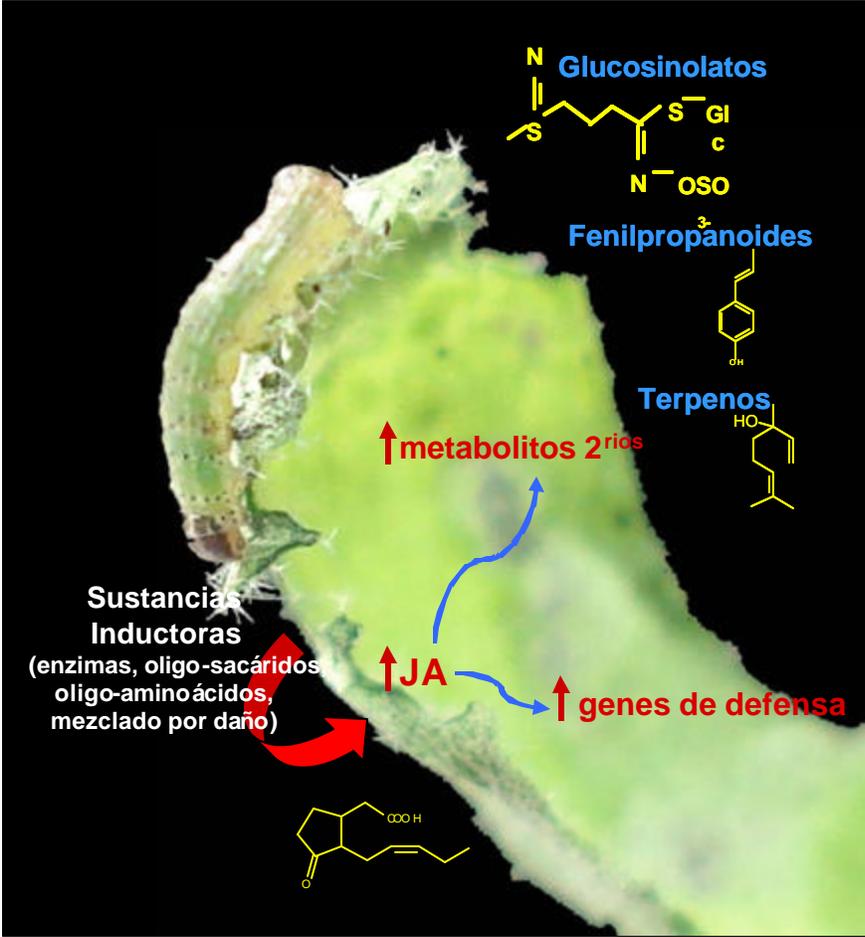


Figura 2: El JA juega un rol central en las defensas inducibles por el ataque de herbívoros en Arabidopsis.

El nivel de protagonismo de cada fitohormona depende en gran medida del tipo de daño producido por el insecto (Walling, 2000) y de su comportamiento alimentario: especialista o generalista (Reymond *et al.*, 2004). Así, la respuesta a insectos chupadores de floema, como los áfidos y la mosca blanca que generan un daño localizado prácticamente a nivel celular, está mediada principalmente por el SA y el JA (Moran & Thompson, 2001). Mientras que la respuesta a insectos masticadores, que producen comparativamente un daño más importante en el tejido, esta mediada conjuntamente por el JA y ET (Stotz *et al.*, 1999). El principal avance en la identificación de los elementos de señalización de estas vías se dio con la utilización de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con niveles alterados de percepción o síntesis de esas fitohormonas o niveles contrastantes de resistencia o sensibilidad a plagas (Figura 3) (Glazebrook, 2001; 2005; Pieterse *et al.*, 2005; Verhagen *et al.*, 2006).

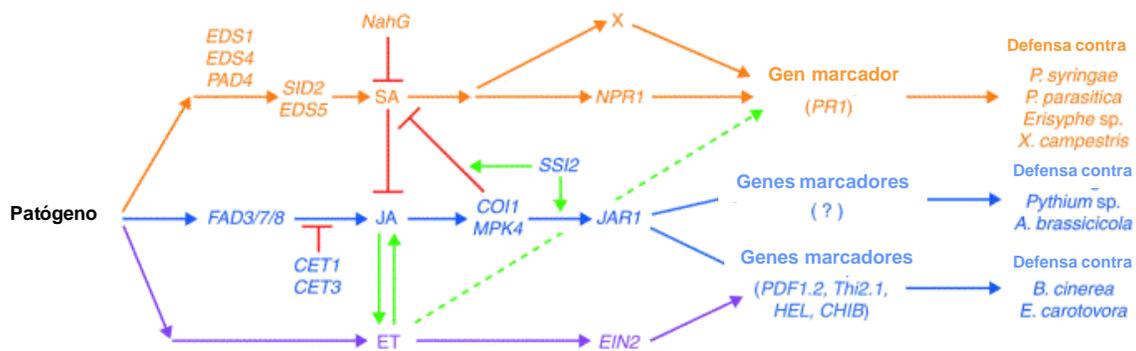


Figura 3: Resumen esquemático de la señalización e interacción de las vías de defensa de *Arabidopsis* indicando los mutantes disponibles para cada vía al momento de la revisión bibliográfica (adaptado de Glazebrook, 2001).

Los metabolitos sintetizados por estas vías alteran distintos aspectos de la fisiología o comportamiento del insecto herbívoro. Por ejemplo, las PINs cambian la digestibilidad del tejido ingerido (Lawrence & Koundal, 2002); recientemente Chen y colaboradores describieron dos proteínas de la planta, inducibles por JA, con función Arg y Thr deaminasa que catabolizan estos aminoácidos en el estómago del insecto *M. sexta* disminuyendo el valor nutricional del alimento (Chen *et al.*, 2005). En la bibliografía prevalecen los metabolitos cuyo mecanismo de acción anti-herbívoro es desconocido. Tal es el caso de las *pathogen related proteins* (PRs), de las germinas, de *hevein-like protein* (HEL), de las defensinas como PDF1.2, por citar sólo algunos.

Estas defensas pueden causar efectos *directos* sobre los herbívoros afectando su fisiología, *i.e.*: toxinas o compuestos que dificultan la digestibilidad; o alterando su comportamiento, *i.e.*: liberación de compuestos con efecto repelente (Schoonhoven *et al.*, 1998). Pero las defensas también pueden afectar al herbívoro de manera *indirecta* (Figura 4). Las plantas pueden emitir compuestos volátiles en respuesta a la herbivoría que, en algunos casos, terminan atrayendo a predadores (carnívoros o parasitoides) de sus propios herbívoros (Dicke *et al.*, 1990). La información que da la planta al predador sobre la ubicación de su presa constituye un mecanismo a través del cual la planta aumenta el éxito del carnívoro, pero también su propio *fitness* (Dicke *et al.*, 1999; Wäckers & Wunderlin, 1999). Esto hace que el establecimiento de una comunidad de herbívoros sobre una planta sea el resultado de una compleja red de señalización de la planta con otras plantas vecinas y de la planta con la comunidad de herbívoros y sus predadores.

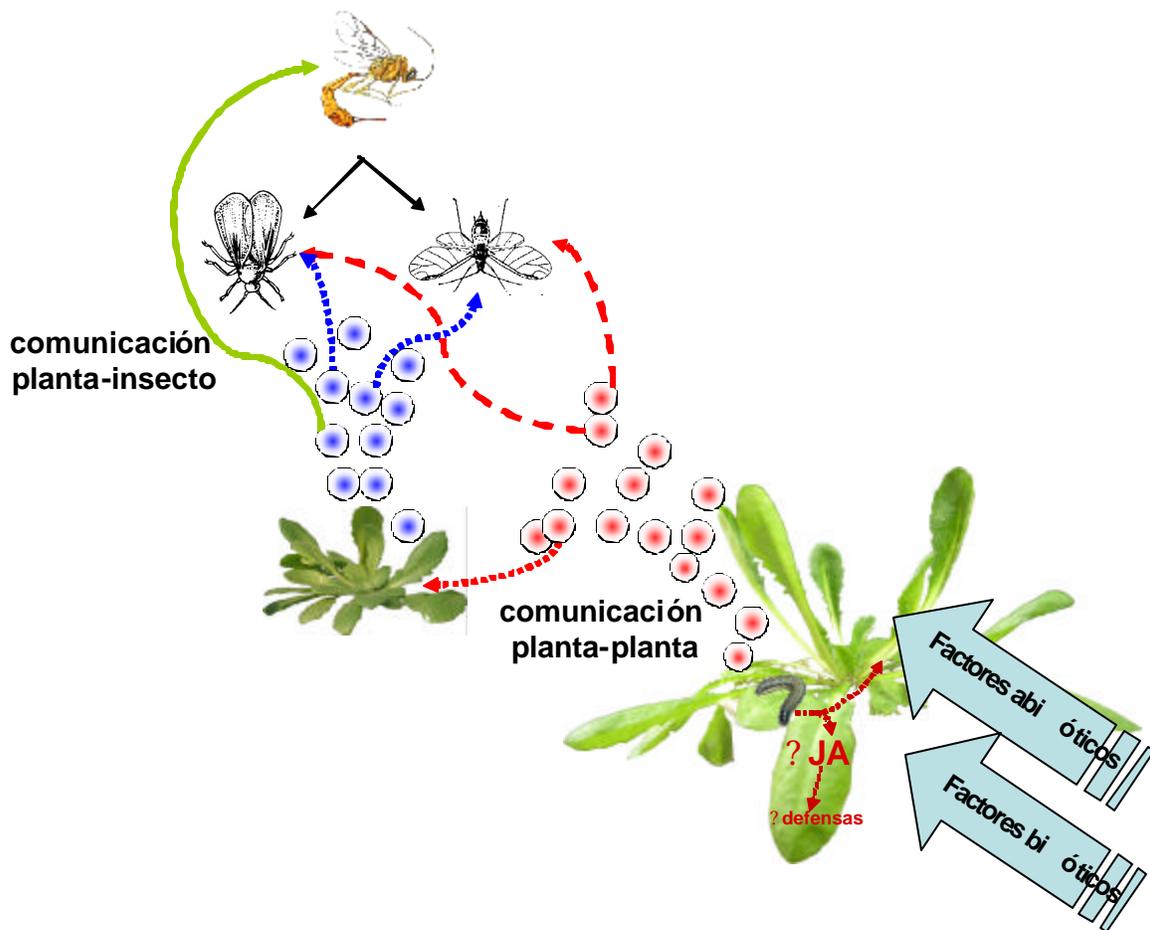


Figura 4: Síntesis esquemática e integradora de las defensas de *Arabidopsis*. El daño producido por insectos herbívoros gatilla una respuesta de defensa en la planta focal. Simultáneamente, el daño induce la producción de compuestos volátiles que puede señalar a plantas vecinas contra el posible ataque de insecto que podrían sufrir, o bien, atraer directamente a los predadores de sus herbívoros.

5. Percepción de plantas vecinas

Las plantas compiten por agua, por nutrientes y también compiten por la absorción de luz. Como la mayor parte de la luz visible (PAR, del inglés *photosynthetically active radiation*) es absorbida por la clorofila y otros pigmentos accesorios de la fotosíntesis que absorben fuertemente en las longitudes de ondas correspondientes al azul y al rojo, la luz transmitida y reflejada por una hoja es diferente a la luz incidente (Figura 5).

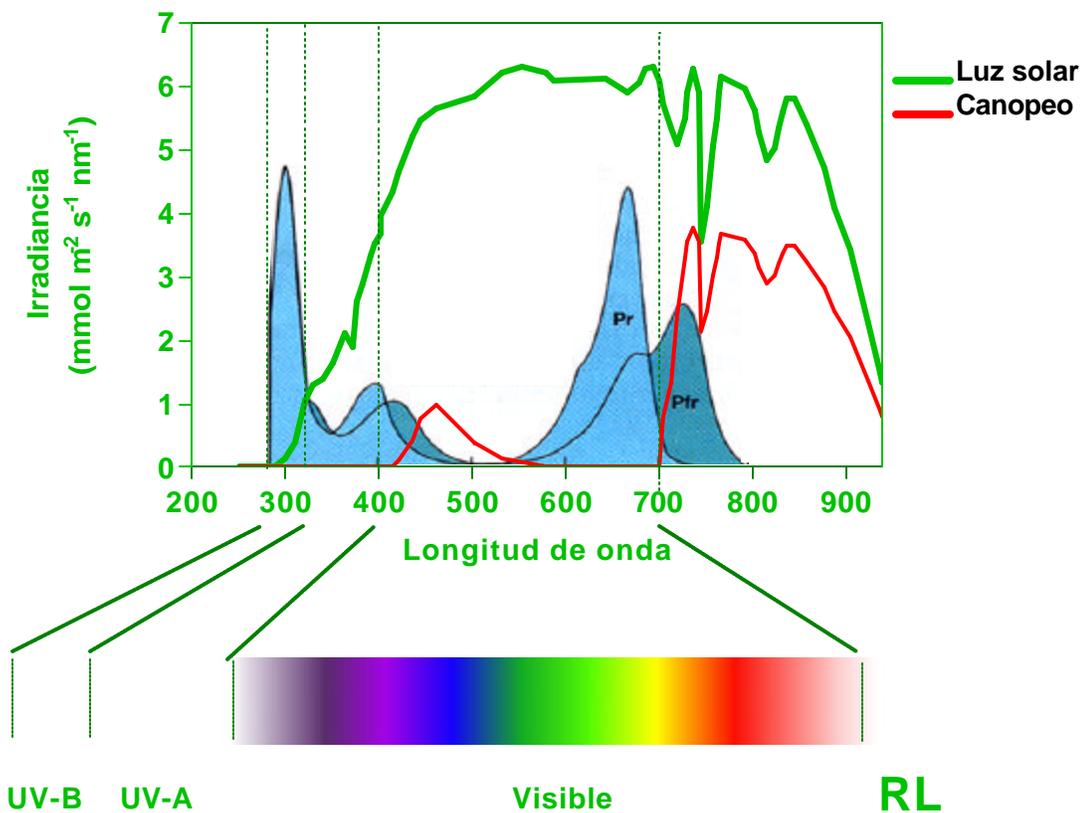


Figura 5 Espectros de absorción de las formas Pr y Pfr del fitocromo en solución superpuestos con el espectro de la luz solar y el espectro debajo de un canopeo denso. Nótese que casi la totalidad de la luz por encima de 700 nm no es absorbida por la hoja.

El ambiente lumínico es percibido por una serie de fotorreceptores que cubren un espectro amplio de longitudes de onda. Los fitocromos absorben principalmente en el rojo (R, 660 nm) y el rojo lejano (RL, 730 nm) (Smith, 2000), mientras que los criptocromos y las fototropinas absorben fundamentalmente la radiación azul (400-500 nm) (Ahmad & Cashmore, 1996; Briggs & Christie, 2002).

La luz transmitida y reflejada por una hoja está fuertemente enriquecida en RL respecto del R, es decir, que su proporción R:RL es baja. Este cambio en la composición espectral

de la luz es una de las principales fuentes de información utilizadas por las plantas para establecer la proximidad de otras plantas vecinas (Ballaré *et al.*, 1990; Smith, 2000). Esto es posible gracias a la propiedad de unos fotorreceptores, conocidos como fitocromos, que oscilan permanentemente entre una forma biológicamente inactiva (Pr) y otra forma activa (Pfr), dependiendo de la relación R:RL del ambiente, por la capacidad del cromóforo del fitocromo de absorber en esas longitudes de onda. La excitación del cromóforo modifica la conformación de la proteína y, por ende, su capacidad de acción biológica. La forma inactiva Pr tiene su máximo de absorción en el R que la convierte en la forma activa Pfr. La fotoconversión es un proceso reversible permitiendo que la absorción de RL por la forma Pfr, que tiene su pico de absorción en el RL, regenere la forma Pr (Figura 5). La proporción de Pfr respecto del fitocromo total (Pfr/P) dependerá de la composición espectral del tratamiento lumínico.

La percepción de una baja R:RL induce un conjunto de respuestas morfológicas y funcionales conocidas como SAS que incluyen la erección de las hojas, el alargamiento de los entrenudos y pecíolos, disminución de las ramificaciones y una acelerada senescencia de las hojas basales (Figura 6). El SAS frecuentemente está acompañado por una floración anticipada. Numerosos estudios han demostrado que la expresión de SAS es un factor determinante en las estrategias de establecimiento y supervivencia de plantas que crecen en un ambiente con intensa competencia (Ballaré & Scopel, 1997; Ballaré *et al.*, 1997).

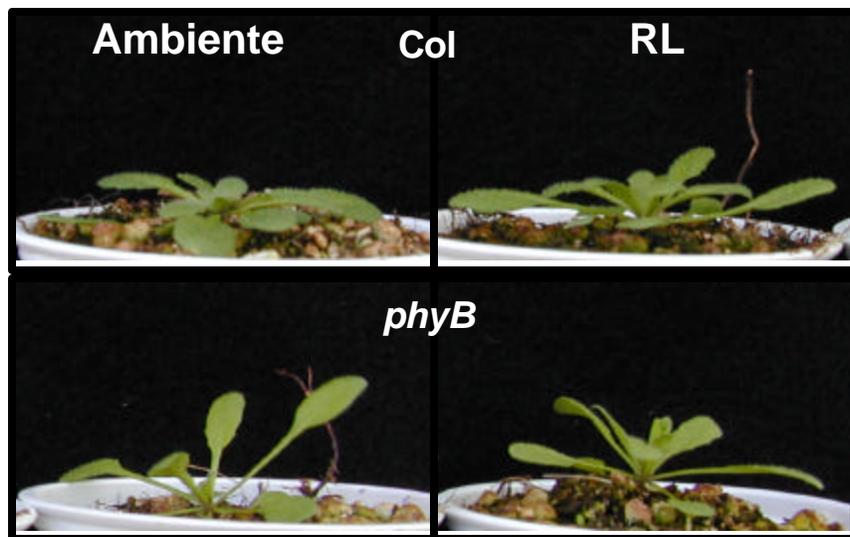


Figura 6: Fenotipo de plantas del mutante *phyB* y del genotipo salvaje cultivadas en invernáculo en distintos ambientes lumínicos: Ambiente: luz natural o RL: luz natural suplementada con RL.

El *phyB* se expresa en toda la planta y es el más abundante en plantas verdes, jugando un rol central en la detección de la relación R:RL del ambiente, controlando la detección de plantas vecinas (Somers & Quail, 1995; Nemhauser & Chory, 2002). La importancia de la función del fitocromo queda de relieve en el patrón de desarrollo del mutante *phyB*, deficiente en la síntesis de la parte proteica del fitocromo. El mutante *phyB* posee un fenotipo constitutivo de competencia independientemente de la relación R:RL del ambiente (Figura 6). Muchas de las repuestas que conforman el SAS se dan antes de que la planta este bajo un canopeo denso, lo que se ha interpretado como una respuesta adaptativa por medio de la cual la planta anticipa la competencia futura, aumentando sus probabilidades de sobrevivir en un ambiente que le será hostil (Ballaré & Scopel, 1997).

La percepción de los cambios en la relación R:RL por el fitocromo desencadena una serie de eventos moleculares en cascada que finalizan con la regulación transcripcional y funcional de los genes relacionados con la fotomorfogénesis (Jiao *et al.*, 2007). Para conocer los detalles moleculares de la señalización del fitocromo, que escapan al propósito de esta Introducción General, remitirse a la Introducción del Capítulo 5.

6. Interacción de las respuestas de defensa y de competencia.

El compromiso entre las respuestas de crecimiento y las defensas contra insectos herbívoros ha sido estudiado a través de aproximaciones fisiológicas y moleculares en los últimos años (Cipollini, 2004; McGuire & Agrawal, 2005; Izaguirre *et al.*, 2006).

Es así que al aumentar la densidad de cultivo en plantas de *Brassica napus* se encontraron niveles menores de actividad de PINs (Cipollini & Bergelson, 2001). Cuando plantas de esta misma especie fueron cultivadas a campo con o sin competencia de una gramínea, las plantas preferidas por los insectos fueron aquellas que estaban expresando el SAS, sugiriendo una menor expresión de sus defensas inducibles (Cipollini & Bergelson, 2002). Sin embargo, el diseño experimental de estos estudios hacía imposible descartar la posibilidad de que el resultado fuera simplemente una consecuencia directa de la competencia por recursos como el nitrógeno. De hecho, en uno de los casos la fertilización adicional con nitrógeno revirtió el efecto derivado de la competencia (Cipollini & Bergelson, 2001).

Para superar estas limitaciones experimentales, plantas de *Nicotiana longiflora* fueron cultivadas en un ambiente lumínico que simulaba la presencia de plantas vecinas, evitando la competencia directa. Las señales lumínicas de competencia redujeron la acumulación de compuestos fenólicos en respuesta a la herbivoría simulada con regurgitado de *Manduca sexta* (Izaguirre *et al.*, 2006). Este efecto se observó mayoritariamente inhibiendo la acumulación de ácido clorogénico, un fenilpropanoide con función antiherbívoro descrita (Stamp & Osier, 1998). En concordancia, la expresión de los genes codificantes para enzimas clave en la biosíntesis de compuestos como el ácido clorogénico estuvieron reprimidos en ambientes suplementados con RL a pesar del estímulo con regurgitado (Izaguirre *et al.*, 2006). Este resultado es particularmente interesante porque pone de manifiesto que la percepción de señales lumínicas derivadas de la presencia de plantas vecinas es suficiente para modular las defensas inducibles de *N. longiflora* y no es consecuencia de una limitación de recursos. En otras palabras, estos estudios demostraron que las respuestas controladas por el fitocromo limitan la respuesta de defensa inducida por insectos herbívoros haciendo más susceptible a las plantas a la herbivoría.

En otros sistemas vegetales, como pepino y tomate, se encontró mayor nivel de herbivoría natural sobre las plantas del mutante *phyB* que sobre las del genotipo salvaje (McGuire & Agrawal, 2005; Izaguirre *et al.*, 2006, respectivamente). En el contexto del dilema de las plantas a crecer o defenderse, podríamos decir que iniciar las respuestas de crecimiento, promovidas por las señales lumínicas de competencia (baja relación R:RL), tiene un costo para la planta que se refleja en una menor habilidad para acumular compuestos de defensa.

Como se discutió anteriormente, la herbivoría puede condicionar el nivel de expresión de las respuestas de competencia de la planta (Callaway *et al.*, 2003; Gianoli *et al.*, 2007). Consecuentemente, en el contexto de la competencia con plantas vecinas, las respuestas inducidas por herbivoría podrían afectar directamente el *fitness* de la planta, o de forma indirecta modificando su interacción con otras plantas y con los insectos herbívoros y sus predadores carnívoros o parasitoides.

7. *Arabidopsis* para el estudio de la interacción planta-insecto

Arabidopsis thaliana es una crucífera (familia: Brassicaceae). A mediados de la década del 80' fue propuesta como planta modelo para uso en laboratorios de biología molecular debido a su corto tiempo generacional, reducido tamaño, y su pequeño genoma nuclear (125 Mb) comparados con los de otras plantas modelo como tomate o tabaco (Meyerowitz & Somerville, 1994; Ausubel, 2000).

Desde entonces, *Arabidopsis* ha sido una herramienta fundamental en el conocimiento de las vías de señalización de las distintas respuestas a estímulos ambientales, *i.e.*: luz, temperatura, salinidad, frío, sequía, patógenos y también herbivoría, por citar sólo algunos. Los logros obtenidos en *Arabidopsis*, han servido como punto de partida para descubrir genes en otras especies vegetales con relevancia económica, como tomate, maíz y arroz.

En la actualidad, existen importantes bancos de germoplasma de *Arabidopsis* con diferentes ecotipos y líneas transgénicas o mutantes para la mayoría de sus casi 25.000 genes (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; Alonso *et al.*, 2003). Estos genotipos se han convertido en una invaluable herramienta para poner a prueba la relevancia de cascadas de señalización específicas en ciertos procesos (Alonso & Ecker, 2006).

Además de estas ventajas, la gran cantidad de información que existe en *Arabidopsis* nos permite contextualizar nuestros resultados en un marco de vías de señalización que se incrementa exponencialmente día a día.

8. Preguntas abordadas en esta tesis

Sabemos que las plantas pueden defenderse directamente contra el ataque de insectos sintetizando compuestos con función anti-herbívoro. Además, sabemos que el patrón de desarrollo de una planta puede ser modificado por señales lumínicas provenientes de plantas vecinas. Como todo mecanismo inducible requiere de la transducción de la señal en la planta.

El uso de *Arabidopsis* abre la posibilidad de evaluar la interacción de estas vías a nivel molecular, permitiéndonos explicar los patrones de herbivoría observados bajo diferentes grados de competencia con plantas vecinas. El valor de esta aproximación genética en el estudio de la interacción planta-insecto fue discutida en varias publicaciones (Mitchell-Olds *et al.*, 1998; Dicke *et al.*, 2003).

En esta tesis abordaré la siguiente **pregunta general**:

¿Cuáles son los mecanismos fisiológicos que explican el cambio en la asignación de recursos desde respuestas de defensa a respuestas de competencia?

De esta pregunta central, se desprenden **preguntas específicas**:

1. ¿Las respuestas de crecimiento, inducidas por la presencia de plantas vecinas o sus señales lumínicas derivadas, comprometen la síntesis *de novo* de defensas contra el ataque de herbívoros en *Arabidopsis*?
2. ¿Cómo impactan las señales lumínicas derivadas de la competencia en la vía de señalización del JA?
3. ¿El efecto del RL sobre la calidad del tejido foliar es una consecuencia de la expresión de la componente morfológica del SAS o involucra una vía específica?

9. Hoja de ruta

La tesis presenta a continuación un capítulo de materiales y métodos (capítulo 2) y cuatro capítulos de resultados. En el primer capítulo de resultados (capítulo 3) se evalúa el efecto de la densidad y de las señales lumínicas de competencia sobre el crecimiento de larvas de *S. frugiperda*, caracterizando la habilidad de inducción de metabolitos de defensas. En el capítulo 4, estudié el mecanismo por el cual el RL controla negativamente la acumulación de metabolitos de defensa, centrándome en el control de la percepción del JA. En el capítulo 5 probé que este compromiso no requiere de la componente morfológica del SAS usando el mutante *sav3-2*. Y finalmente en el capítulo 6 cuantifiqué la expresión de genes relacionados con la percepción y transducción de la señal de esa fitohormona.

BIBLIOGRAFIA

Agrawal, A. (1999) Induced responses to herbivory in wild radish: effects on several herbivores and plant fitness. *Ecology*, **80**, 1713–1723.

Agrawal, A.A. (1998) Induced responses to herbivory and increased plant performance. *Science*, **279**, 1201-1202.

Ahmad, M. & Cashmore, A.R. (1996) Seeing blue: the discovery of cryptochrome. *Plant Molecular Biology*, **30**, 851-861.

Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C. & Ecker, J.R. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, 653-657.

Alonso, J.M. & Ecker, J.R. (2006) Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in Arabidopsis. *Nature Reviews. Genetics*, **7**, 524-536.

Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 796-815.

Ausubel, F.M. (2000) Arabidopsis genome. A milestone in plant biology. *Plant Physiology*, **124**, 1451-1454.

Baldwin, I.T. (1998) Jasmonate induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *PNAS*, **95**, 8113-8118.

Baldwin, I.T. (1999) Inducible nicotine production in native *Nicotiana* as an example of adaptive phenotypic plasticity. *Journal of Chemical Ecology*, **25**, 3-30.

Ballaré, C.L., Scopel, A.L. & Sánchez, 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. & Scopel, A.L. (1997) Phytochrome signalling in plant canopies. Testing its population-level consequences using photoreceptor mutants of Arabidopsis. *Functional Ecology*, **11**, 441-450.

- Ballaré, C.L., Scopel, A.L. & Sánchez, R.A.** (1997) Foraging for light: photosensory ecology and agricultural implications. *Plant, Cell and Environment*, **20**, 820-825.
- Ballaré, C.L.** (1999) Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signalling mechanisms. *Trends in Plant Science*, **4**, 97-102.
- Begon, M., Townsend, C.A. & Harper, J.L.** (2005) Ecology: from Individuals to ecosystems. *4th Edition, Blackwell Publishing*.
- Bostock, R.M.** (2005) Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annual Review of Phytopathology*, **43**, 545-580.
- Bradshaw, A.D.** (1965) Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics*, **13**, 115-155.
- Briggs, W.R. & Christie, J.M.** (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science*, **7**, 204-210.
- Callaway, R.M., Pennings, S.C. & Richards, C.L.** (2003) Phenotypic plasticity and interactions among plants. *Ecology*, **84**, 1115-1128.
- Cipollini, D.F.** (1998) Induced defenses and phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution*, **13**, 200.
- Cipollini, D.F. & Bergelson, J.** (2001) Plant density and nutrient availability constrain constitutive and wound-induced expression of trypsin inhibitors in *Brassica napus*. *Journal of Chemical Ecology*, **27**, 593-610.
- Cipollini, D.F. & Bergelson, J.** (2002) Interspecific competition affects growth and herbivore damage of *Brassica napus* L. in the field. *Plant Ecology*, **162**, 227-231.
- Cipollini, D.F.** (2004) Stretching the limits of plasticity: can a plant defend against both competitors and herbivore? *Ecology*, **85**, 28-37.
- Coley, P., Bryant, D. & Chapin, F.S.** (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, **230**, 895-899.
- Creelman, R.A. & Mullet, J.E.** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**, 355-381.
- Chen, H., Wilkerson, C., Kuchar, J., Phinney, B. & Howe, G.** (2005) Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *PNAS*, **102**, 19237-19242.
- De Vos, M., Van Zaanen, W., Koornneef, A., Korzelijs, J.P., Dicke, M., Van Loon, L.C. & Pieterse, C.M.J.** (2006) Herbivore-induced resistance against microbial pathogens in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **142**, 352-363.

Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E. & Ryals, J. (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, **266**, 1247-1250.

Dicke, M., van Beek, T.A., Posthumus, M.A., Ben Dom, N., van Bokhoven, H. & de Groot, A. (1990) Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions. Involvement of host plant in its production. *Journal of Chemical Ecology*, **16**, 381-396.

Dicke, M., Gols, R., Ludeking, D. & Posthumus, M.A. (1999) Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants. *Journal of Chemical Ecology*, **25**, 1907-1922.

Dicke, M., van Poecke, R.M.P. & de Boer, J.G. (2003) Inducible indirect defence of plants: from mechanisms to ecological functions. *Basic and Applied Ecology*, **4**, 27-42.

Doherty, H.M., Selvendran, R.R. & Bowles, D.J. (1988) The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxy-benzoic acids. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **33**, 377-384.

Dudt, J.F. & Shure, D.J. (1994) The influence of light and nutrients on foliar phenolics and insect herbivory. *Ecology*, **75**, 86-98.

Felton, G.W., Korth, K.L., Bi, J.L., Wesley, S.V., Huhman, D.V., Mathews, M.C., Murphy, J.B., Lamb, C. & Dixon, R.A. (1999) Inverse relationship between systemic resistance of plants to microorganisms and to insect herbivory. *Current Biology*, **9**, 317-320.

Felton, G.W. & Korth, K.L. (2000) Trade-offs between pathogen and herbivore resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**, 309-314.

Gianoli, E., Molina-Montenegro, M.A. & Becerra, J. (2007) Interactive effects of leaf damage, light intensity and support availability on chemical defences and morphology of a twining vine. *Journal of Chemical Ecology*, **33**, 95-103.

Glazebrook, J. (2001) Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis - 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 301-308.

Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **43**, 205-227.

Herms, D.A. & Mattson, W.J. (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology*, **67**, 283-335.

Izaguirre, M.M., Mazza, C.A., Biondini, M., Baldwin, I.T. & Ballaré, C.L. (2006) Remote sensing of future competitors: impacts on plant defenses. *PNAS*, **103**, 7170-7174.

Jiao, Y., Lau, O.S. & Deng, X.W. (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews Genetics*, **8**, 217- 230.

Karban, R. & Baldwin, I. (1997) Induced responses to herbivory. *Chicago University Press, Chicago, Illinois, USA*.

Kessler, A. & Baldwin, I.T. (2002) Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Reviews Plant Biology*, **53**, 299-328.

Kurashige, N.S. & Agrawal, A.A. (2005) Phenotypic plasticity to light competition and herbivory in *Chenopodium album* (Chenopodiaceae). *American Journal of Botany*, **92**, 21-26.

Lawrence, P.K. & Koundal, K.R. (2002) Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*, **5**, 93-109.

Li, C., Schillmiller, A.L., Liu, G., Lee, G.I., Jayanty, S., Sageman, C., Vrebalov, J., Giovannoni, J.J., Yagi, K., Kobayashi, Y. & Howe, G.A. (2005) Role of ω -oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *The Plant Cell*, **17**, 971-986.

Lively, C.M., Johnson, S.G., Delph, L.F. & Clay, K. (1995) Thinning reduces the effect of rust infection on jewelweed (*Impatiens capensis*). *Ecology*, **76**, 1859–1862.

Louda, S.M., Dixon, P.M. & Huntly, N.J. (1987) Herbivory in sun and shade at a natural meadow-woodland ecotone in the Rocky Mountain. *Vegetatio*, **72**, 141-149.

McGuire, R. & Agrawal, A.A. (2005) Trade-offs between the shade-avoidance response and plant resistance to herbivores? Tests with mutant *Cucumis sativus*. *Functional Ecology*, **19**, 1025-1031.

Mewis, I., Appel, H.M., Hom, A., Raina, R. & Schultz, J.C. (2005) Major signaling pathways modulate Arabidopsis glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects. *Plant Physiology*, **138**, 1149-1162.

Meyerowitz, E.M. & Somerville, C.R. (1994) Arabidopsis. *Cold Spring Harbor Press, New York, USA*.

Mitchell-Olds, T., Gershenson, J., Baldwin, I. & Boland, W. (1998) Chemical ecology in the molecular era. *Trends in Plant Science*, **3**, 362-365.

Moran, P.J. & Thompson, G.A. (2001) Molecular responses to aphid feeding in Arabidopsis in relation to plant defense pathways. *Plant Physiology*, **125**, 1074-1085.

Nemhauser, J. & Chory, J. (2002) Photomorphogenesis. *The Arabidopsis Book*.

O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H.M.O. & Bowles, D.J. (1996) Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science*, **274**, 1914-1917.

Peña-Cortes, H., Albrecht, T., Prat, S., Weiler, E.W. & Willmitzer, L. (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta*, **191**, 123-128.

Pieterse, C.M.J., Schaller, A., Mauch-Mani, B. & Conrath, U. (2006) *Multigenic and induced systemic resistance in plants*, Tuzun & Bent Eds. (Springer US 2006) pp. 166-196.

Pigliucci, M. & Schmitt, J. (1999) Genes affecting phenotypic plasticity in Arabidopsis: pleiotropic effects and reproductive fitness of photomorphogenic mutants. *Journal of Evolutionary Biology*, **12**, 551-562.

Quezada, I.M. & Gianoli, E. (2006) Simulated herbivory limits phenotypic responses to drought in *Convolvulus demissus* (Convolvulaceae). *Polish Journal of Ecology*, **54**, 499-503.

Reymond, P., Bodenhausen, N., Van Poecke, R.M.P., Krishnamurthy, V., Dicke, M. & Farmer, E.E. (2004) A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *The Plant Cell*, **16**, 3132-3147.

Rhoades, D.F. (1983) Responses of alder and willow to attack by tent caterpillars and webworms: evidence for pheromonal sensitivity of willows. In *P. A. Hedin, Editor, American Chemical Society Symposium Series 208, Washington, D.C., USA*, 55-68.

Schoonhoven, L.M., Jermy, T. & van Loon, J.J.A. (1998) Insect-plant biology, from physiology to evolution. *Chapman & Hall, London*.

Smith, H. (2000) Phytochromes and light signal perception by plants-an emerging synthesis. *Nature*, **407**, 585-591.

Somers, D.E. & Quail, P.H. (1995) Temporal and spatial expression patterns of PHYA and PHYB genes in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **7**, 413-427.

Stamp, N.E. & Osier, T.L. (1998) Response of five insect herbivores to multiple allelochemicals under fluctuating temperatures. *Entomol Exper Applic*, **88**, 81-96.

Stotz, H., Kroymann, J. & Mitchell-Olds, T. (1999) Plant-insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, **2**, 268-272.

Sultan, S.E. (2000) Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science*, **5**, 537-542.

- Thaler, J., Fidantsef, A., Duffey, S. & Bostock, R.** (1999) Trade-offs in plant defense against pathogens and herbivores: a field demonstration of chemical elicitors of induced resistance. *Journal of Chemical Ecology*, **25**, 1597–1609.
- Traw, M.B. & Bergelson, J.** (2003) Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **133**, 1367-1375.
- Valladares, F., Gianoli, E. & Gómez, J.M.** (2007) Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytologist*, **176**, 749-763.
- van Kleunen, M. & Fischer, M.** (2005) Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants. *New Phytologist*, **166**, 49-60.
- Verhagen, B.W.M., Loon, L.C.V. & Pieterse, C.M.J.** (2006) Induced disease resistance signaling in plants. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, **Chapter 35**, 334-343.
- Wäckers, F.L. & Wunderlin, R.** (1999) Induction of cotton extrafloral nectar production in response to herbivory does not require a herbivore-specific elicitor. *Entomol Exper Applic*, **91**, 149-154.
- Walling, L.L.** (2000) The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation*, **19**, 195-216.
- Zavala, J.A., Patankar, A.G., Gase, K. & Baldwin, I.T.** (2004) Constitutive and inducible trypsin proteinase inhibitor production incurs large fitness costs in *Nicotiana attenuata*. *PNAS*, **101**, 1607-1612.

capítulo

2

materiales y métodos

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

COMUNES A TODOS LOS CAPITULOS

1. Material vegetal

Las semillas de los diferentes genotipos de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en esta tesis fueron obtenidas del Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC, Ohio, EEUU). La colaboración con un laboratorio de investigación extranjero nos permitió caracterizar las semillas del mutante *sav3-2* que surgieron en una búsqueda de mutantes deficientes en la respuesta de “escape al sombreado” (Tao *et al.*, 2008). En todos los casos, las semillas de *Arabidopsis* fueron sembradas en cajas plásticas transparentes con agar 0.8% en oscuridad a 4°C durante tres días, luego tratadas con un pulso de luz roja durante 1 hora para inducir y sincronizar la germinación, y finalmente eran transferidas a una cámara de cultivo con fotoperíodo de luz blanca de 10 hs. mantenida a 22°C. Las plántulas de 7 días de edad se transplantaban a macetas de 254 cm³ que contenían una mezcla 1:1:1 de perlita:vermiculita:turba y eran periódicamente regadas con Hakaphos? .

2. Cría de insectos

La colonia inicial de huevos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fue generosamente cedida por el Dr. Eduardo Virla (PROIMI, Tucumán, Argentina). Las larvas eran criadas en un cuarto de cultivo con fotoperíodo 12/12 hs de luz blanca/oscuridad y alimentadas con una dieta artificial que consistió en una mezcla de nutrientes indeterminados como germen de trigo, harina de soja y poroto, extracto de levadura y el agregado de cantidades conocidas de metil parabeno, ácido ascórbico, vitamina C, antibiótico tetraciclina y agar (Murúa *et al.*, 2003). A partir del tercer estadio, las larvas eran separadas en posillos individuales hasta empupar. Las pupas eran puestas en jaulas y una vez que aparecían las polillas se agregaba un recipiente con algodón humedecido con una solución líquida de azúcar disuelta en agua como alimento que era reemplazada diariamente. Luego de 5 a 7 días, comenzábamos a recolectar las puestas de huevos.

3. Simulación de presencia de plantas vecinas: suplementación con RL

Las plantas de Arabidopsis fueron cultivadas con luz natural ambiental hasta la cuarta semana de vida. Luego eran alineadas frente a un banco de lámparas incandescentes cubiertos con una combinación de tres filtros de acrílico azul (Paolini 2031, Acrílicos Ambin, Buenos Aires, Argentina, 2.4 mm de espesor) y un filtro rojo (Paolini 2053, Acrílicos Ambin, Buenos Aires, Argentina, 2.4 mm de espesor) para el tratamiento de radiación RL suplementaria (tratamiento RL, ver Figura 1) o bien con filtros opacos (tratamiento Ambiente). Entre las lámparas y los filtros se colocaban recipientes de vidrio con agua para absorber el calor generado por las lámparas. El agua era repuesta diariamente. En los distintos experimentos mostrado en esta tesis, no registré diferencias en la temperatura del aire asociadas a los tratamientos lumínicos.

Para chequear los niveles de relación R:RL usé un radiómetro Skye SKR100/SKR110 (Skye Instruments, Ltd., UK). Los valores de relación R:RL fueron cercanos a 0.2. La eficiencia de los tratamientos lumínicos se estimó midiendo el ángulo de inserción foliar respecto del suelo. Esta caída en R:RL simuló el efecto de la proximidad de plantas vecinas de un canopeo de índice de área foliar de 0.5, donde el sombreado mutuo es despreciable.

La suplementación con RL comenzaba 4 días antes del tratamiento de herbivoría (real o simulada).

Las plantas cultivadas en cámaras recibieron un PAR de $125 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y las de invernáculo recibieron un PAR promedio de $400 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

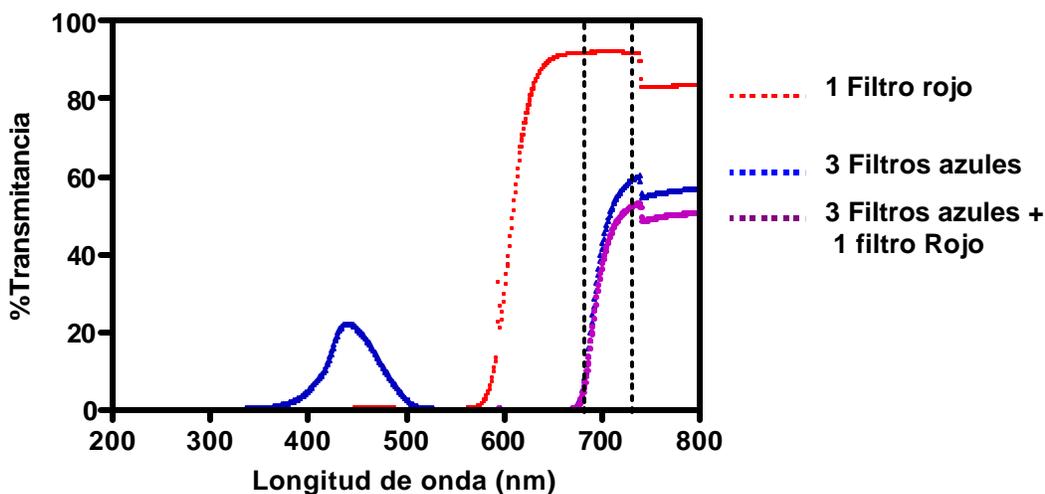


Figura 1: Espectros de transmitancia de 1 filtro rojo y 3 filtros azules y su combinación. El tratamiento con RL se realizó con la combinación de 1 filtro rojo y 3 filtros azules.

4. Bioensayos con larvas de *S. frugiperda*

Se colocaron cuatro larvas de dos días de edad sobre cada una de las plantas de *Arabidopsis*. Las orugas fueron dispuestas en diferentes hojas de la roseta. La mitad de las plantas de cada genotipo en cada tratamiento no eran sometidas a la herbivoría y eran utilizadas como control de cada tratamiento lumínico. El tratamiento de competencia, ya sea densidad o suplementación con RL, continuó durante el período de alimentación (5 a 7 días). Las orugas se pesaron al final del experimento. El incremento de la masa corporal de la larva está fuertemente correlacionado con la fecundidad potencial del insecto (Klingenberg & Spence, 1997).

5. Tratamientos de herbivoría simulada

Para simular el daño por herbivoría, se trató una hoja completamente expandida de una roseta en el estadio 3.5 a 3.7 que equivale a un 50 a 70% del tamaño final de la roseta (Boyes *et al.*, 2001). Se aplicó un corte superficial con una lámina de bisturí (Super Thin Gillete?) a un lado de la nervadura central sobre la que se colocó 3,5 µl de una dilución 1:10 (v/v) de regurgitado recolectado de orugas del cuarto estadio.

6. Medición de relación C:N

Las concentraciones totales de C y N fueron determinadas por el método de combustión (Sollins *et al.*, 1999) usando un analizador elemental LECO (TruSpec CN Determinator, LECO Corporation, Miami, EEUU). Previo al análisis, las muestras fueron secadas a 60° C durante 48 horas y molidas hasta obtener un polvo fino para homogeneizar el tejido.

7. Estimación de los compuestos fenólicos de la hoja

Transcurridas 72 hs del estímulo de herbivoría (real o simulada) se cosecharon discos de hoja (28 mm² cada uno) de cada uno de los tratamientos en 1.4 ml de una solución 99:1 metanol:HCl. La extracción se realizó durante 48 hs a -20° C. Luego se midieron las absorbancias de la solución a 305 nm (A₃₀₅) y a 320 nm (A₃₂₀) en un espectrofotómetro UV-1700 (Shimadzu Corporation, Tokio, Japón) como un estimador de la cantidad de compuestos fenólicos presentes en la hoja.

8. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se pulverizó en mortero con nitrógeno líquido 0.5 g 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 (12.000 g por 20 min a 4° C). Se resuspendió el precipitado en 2ml de agua y 200 ul 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 (12.000 g por 20 min a 4° C), y se lavaron los precipitados con 2 ml de etanol 70 % (v/v) y se centrifugó (12.000 g por 20 min a 4° C). Se secaron los precipitados y se resuspendieron en agua milliQ.

La calidad y cantidad del ARN extraído fueron estimadas en un gel de agarosa 1%. Y paralelamente, se midió por espectrofotometría las absorbancias a 260 y 280 nm y la relación 260/280 de 1 ml de una solución 1/1000 de ARN en agua para calcular la cantidad y la calidad del ARN extraído.

El ARN total fue tratado con la enzima *DNasa RNasaFree* (Promega?, Madison, Wis) para eliminar posibles contaminaciones con ADN.

La reacción de retrotranscripción fue realizada con la enzima *Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase* (Promega?) usando 1-2 µg de ARN total, según el protocolo indicado por el proveedor. Rápidamente el protocolo de retrotranscripción consistió en agregar a 1-2 ug de RNA total 0.5 µg de oligo dT. La mezcla fue desnaturalizada a 70° C durante 5 min y rápidamente enfrías en hielo. Finalmente, a cada reacción se adicionó MMLV-5X Reaction Buffer, dNTPs 10 mM, 200 units of M-MLV RT (Promega?, Madison, Wis) y agua milliQ libre de nucleasas hasta un volumen final de 20 µl. La reacción fue realizada 42° C durante 60 min y fue parada calentado a 70° C por 15 min.

9. Cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real (RTq-PCR)

El ADNc resultante fue usado como templado para la amplificación de genes específicos por medio del 7500 PCR Real System (Applied Biosystems, Foster City, USA). Los *primers* fueron diseñados usando el software *Primer Express 1.5* (Applied Biosystems). Las reacciones de PCR fueron realizadas usando la *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) con los *primers* listados mas abajo a una concentración final de 3.6 μ M cada uno y 1.0 μ l de 50% (v/v) ADNc como templado. Las condiciones de ciclado de la PCR consistieron en un paso inicial de activación de la polimerasa a 94° C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 94° C durante 15 seg y 1 min a 60° C. La expresión del gen β -*actin-8* (*At1g49240*) de *Arabidopsis* fue detectada usando un *primer forward* universal 5'-AGTGGTCGTACAACCGGTATTGT-3' y un *reverse primer* específico 5'-GAGGATAGCATGTGGAAGTGGAGAA-3'. El valor de la expresión de β -*actin-8* se usó como un estándar endógeno para normalizar o relativizar pequeñas diferencias entre las muestras en la cantidad de templado. La tabla que sigue a continuación detalla los primers utilizados para medir la expresión de los genes de interés.

Gen	Foward 5'? 3'	Reverse 5'? 3'
<i>COII</i>	ACTGCTTCATCGCCGTTTCT	ACGACTGCATAACACCGGATC
<i>JAZ1</i>	TGCAAGCCTGATGTCAATGG	TGTTGTCCGCTGACGTGAGT
<i>JAZ2</i>	TTTCGGTTTCAACGATGTCG	TTTCGGTTTCAACGATGTCG
<i>JAZ3</i>	TTGGGTTCGAAAAATTCTCCG	GCTTTCGCTGGTTTCCTCCT
<i>JAZ4</i>	TAGCTCCTGAAAAGGCCCAA	GAGGTCCATTTCCGGCTAGC
<i>JAZ5</i>	ACCGAAAACCCGATTCCAGT	CTGGTGGATCGAATTTTCCG
<i>JAZ6</i>	CAACGTGGTGATTCCCGATC	TCATTGTTCCCGGAACCTCGT
<i>JAZ7</i>	TGAGAAGTTCAGACGGTTCGG	TCGAGTCGAATTGTTTGGGAT
<i>JAZ8</i>	CGATCGCAAGCAGAGAAATG	GATCCGACCCGTTTGAGGAT
<i>JAZ9</i>	TCATTCAATGCAGCTCCTCGT	TCCGAGCTTGAGGGATGAAG
<i>JAZ10</i>	TCAGCCTCAGATCCCGATTT	CTAGACCTGGCGAGAGACGC
<i>JAZ11</i>	CAATGGTGTCCCTGCACAAA	CAATGGTGTCCCTGCACAAA
<i>JAZ12</i>	TCTCGTTTTGCAGATCCACG	GCGAATGCCTCCTTGAATA
<i>ERF1</i>	CCTCGGCGATTCTCAATTTTT	CCGAAAGCGACTCTTGAACCTCT

<i>HEL</i>	GGCTATCAACAAGGCCATCTCA	TCAATGGCCGAAACAAGCAT
<i>PDF1.2</i>	TTGCTGCTTTCGACGCA	TGTCCCACTTGGCTTCTCG
<i>MYC2</i>	CCGAAAACCCGAATCTGGAT	GGGTCTGAGAATGAACCGGAC
<i>VSP1</i>	GGGCGTACTGGTCGTGGTTA	CCGGGAGTCCTGGAGTTGAT

La amplificación en tiempo real del ADNds fue monitoreada y analizada usando el *Sequence Detector v1.3 program* (Applied Biosystems). El valor de CT (del inglés *threshold cycle*) fue normalizado usando los valores de CT de la *?-actin-8* para cada muestra. Los niveles de transcrito normalizados fueron comparados entre tratamientos y se calculó la expresión relativa al tratamiento control del genotipo salvaje.

MATERIALES Y METODOS

PARTICULARES DE CADA CAPITULO

Capítulo 3

1. Bioensayo con diferentes densidades de plantas de Arabidopsis

Plántulas de 7 días de Arabidopsis, de los genotipos salvaje y mutante *phyB*, fueron transplantadas en macetas individuales de 3.5 x 7 cm de diámetro x profundidad cultivadas en el invernáculo. Estas macetas fueron dispuestas en el espacio de manera tal que generaran dos densidades (288 y 615 plantas m²) de cultivo. Estas dos densidades habían mostrado, en un estudio previo, inducir un SAS con distintas intensidades de acuerdo al nivel de competencia (Ballaré & Scopel, 1997). En diferentes momentos del crecimiento del cultivo se fueron registrando parámetros de SAS como el ángulo de inserción foliar, la altura del canopeo, y la relación lámina/ pecíolo (L/P).

Luego de dos semanas de crecimiento, fueron agregadas 19 orugas de *S. frugiperda* de dos días de edad. Transcurridos 8 días registré la masa corporal de las orugas.

El PAR promedio registrado durante esos días fue cercano a los 400 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y la temperatura media fue mantenida con calientes en 20°C.

2. Estimación de la biomasa radical y aérea de Arabidopsis

Una vez finalizado el bioensayo sobre cultivos con distintas densidades, las plantas fueron cuidadosamente retiradas de la maceta. Las raíces fueron delicadamente lavadas para retirar todos los restos de perlita y turba retenidos en las raíces. La raíz fue cortada de la base de la roseta con una tijera. Cada vástago y raíz fue ensobrado y rotulado con un número identificador, y secados durante 48 hs a 60° C. La masa del tejido fue determinada con una balanza analítica.(Sartorius AG, Alemania).

Capítulo 4

1. Inducción de las respuestas de defensa con la aplicación de MeJA exógeno

La inducción química de las respuestas controladas por el JA fue realizada sumergiendo plantas de Arabidopsis de cuatro semanas de edad en una solución acuosa conteniendo 0, 50 o 450 μ M MeJA (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI, USA). Las plantas fueron cosechadas a diferentes tiempos post-inducción e inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido para posteriores estudios de expresión génica.

Capítulo 5

1. Tratamientos lumínicos del mutante *sv3*

Para suministrar los diferentes tratamientos lumínicos usé las fuentes de luz descritas a continuación. El rojo lejano continuo fue provisto por dos lámparas incandescentes de 150 W (Philips R95) en combinación con un filtro de acetato rojo y seis filtros de acrílico azul (Paolini 2031, Acrílicos Ambin, Buenos Aires, Argentina, 2mm de espesor). El rojo continuo fue provisto por tubos de luz fluorescente de 40 W (Philips cool light) seguidos de un acetato rojo (Paolini, La Casa del Acetato, Buenos Aires, Argentina). El tratamiento con luz azul difirió del tratamiento con rojo en que el filtro utilizado fue un acetato azul (Paolini, La Casa del Acetato, Buenos Aires, Argentina).

Para los experimentos de desetiación sembré 10 semillas de cada genotipo en cajas plásticas transparentes conteniendo agar 0.8%. Los tratamientos lumínicos se extendieron durante 4 días hasta la medición de las respuestas clásicas de desetiación, *i.e.*: grado de

inhibición del alargamiento del hipocotilo y ángulo entre los cotiledones. En todas las series de experimentos se dejó la misma cantidad de cajas en oscuridad como control del crecimiento. Se promedió los valores de las 10 plántulas. Cada caja fue una réplica biológica, y se repitió por triplicado al menos tres veces (Fankhauser & Casal, 2004).

2. Percepción del azul y del sombreado neutro del mutante *sav3-2*

Plantas de *Arabidopsis* fueron cultivadas durante 4 semanas en cámara de cultivo con un PAR de $85 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y una temperatura de 20°C . En la 4^{ta} semana, tres grupos de plantas fueron crecidas bajo tres condiciones lumínicas: luz blanca, reducción del azul (acetato amarillo, #12 med yellow, Roscolux, Rosco Laboratories Inc., Stamford, CT, EEUU) y sombreado (media sombra 50%). En los primeros dos casos, la intensidad final fue de $85 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y el último caso la intensidad fue de $45 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Posteriormente se midieron los parámetros de SAS.

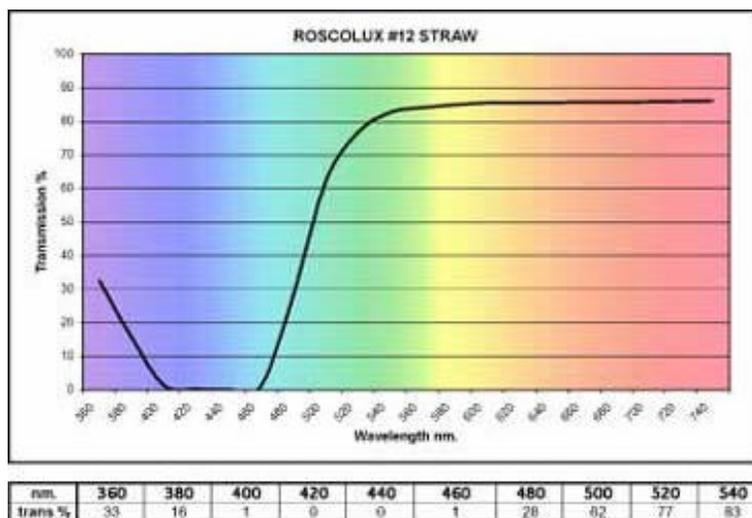


Figura 2: Espectros de transmitancia del acetato amarillo #12 Roscolux, utilizado para reducir los niveles de luz azul que alcanzaba a las plantas.

3. Respuestas a pulsos de RL al final del día (EOD)

Plantas de *Arabidopsis* fueron cultivadas durante 4 semanas en cámara de cultivo con un PAR de $85 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y una temperatura de 20°C . Para aplicar el pulso al final del día (EOD) con rojo lejano, se utilizó el banco con lámparas incandescentes descrito en la

parte general de esta sección, que fueron encendidas durante los últimos 45 min de las horas de luz blanca. Posteriormente se midieron los parámetros de SAS.

Capítulo 6

1. Análisis *in silico* de las secuencias regulatorias en cis de regiones promotoras

El análisis de las secuencias promotoras de algunos genes fue realizado con el software de acceso libre disponible en la red en <http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/> dentro de la base de datos ATCISDB según las instrucciones del proveedor (Davuluri *et al.*, 2003). ATCISDB es una base de datos que incluye elementos regulatorios *cis* verificados o no experimentalmente. Sus secuencias promotoras provienen de las bases de datos de TAIR, RIKEN y SALK.

BIBLIOGRAFIA

- Ballaré, C.L. & Scopel, A.L.** (1997) Phytochrome signalling in plant canopies. Testing its population-level consequences using photoreceptor mutants of Arabidopsis. *Functional Ecology*, **11**, 441-450.
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R. and Gortach, J.** (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell*, **13**, 1499-1510.
- Davuluri, R.V., Sun, H., Palaniswamy, S.K., Matthews, N., Molina, C., Kurtz, M. and Grotewold, E.** (2003) AGRIS: Arabidopsis Gene Regulatory Information Server, an information resource of Arabidopsis cis-regulatory elements and transcription factors. *BMC Bioinformatics*, **4**, 25.
- Fankhauser, C. & Casal, J.J.** (2004) Phenotypic characterization of a photomorphogenic mutant. *The Plant Journal*, **39**, 747-760.
- Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemano, S., Alvarez, D. and Abdala, G.** (2007) Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **76**, 1145-1152.
- Klingenberg, C. & Spence, J.** (1997) On the role of body size for life-history evolution. *Ecological Entomology*, **22**, 55-68.
- Murúa, M.G., Defagó, V. and Virla, E.** (2003) Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría experimental de *Spodoptera frugiperda* (Lep., Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides. *Plagas*, **29**, 43-52.
- Sollins, P., Glassman, C., Paul, E., Swanston, C., Lajtha, K., Heil, J. and Elliott, E.** (1999) Soil carbon and nitrogen: pools and fractions. in G. P. Robertson, D. C. Coleman, C. S. Bledsoe, and P. Sollins, editors. *Standard Soil Methods for Long-Term Ecological Research*. Oxford University Press, New York Oxford.
- Tao, Y., Ferrer, J.-L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J.A., Li, L., Moreno, J.E., Bowman, M.E., Ivans, L.J., Cheng, Y., Lim, J., Zhao, Y., Ballaré, C.L., Sandberg, G., Noel, J.P. and Chory, J.** (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, **133**, 164-176.

capítulo

3

defensas inducibles
impacto de la competencia

CAPITULO 3

INTRODUCCION

1. Competencia con plantas vecinas

La competencia con otras plantas puede generar condiciones de crecimiento estresantes (Siemens *et al.*, 2001). Esa competencia puede darse en los diferentes estratos de la planta, aunque los mas obvios son a nivel de la raíz y el follaje. En la raíz, se ha registrado competencia directa por agua y nutrientes conocida como competencia dependiente de recursos, aunque también ha sido descripta otra competencia no dependiente de recursos que requiere la liberación de moléculas al suelo que actúan como señales sobre plantas vecinas perjudicando su normal desarrollo, *i.e.*: la alelopatía (Whittaker & Feeny, 1971). Esta misma disquisición entre competencia dependiente o no de recursos puede ser aplicada al canopeo. Sería el caso de la competencia por la luz en la que puede darse un sombreado real entre plantas cercanas o simplemente cambios en la relación R:RL generados por una planta vecina que no llega a producir un sombreado real (Ballaré *et al.*, 1990).

Como se especula que el costo de defenderse es mayor en una situación de competencia, esto exacerbaría el compromiso fundamental al que debe enfrentarse una planta: crecer mas rápido que las plantas vecinas, o producir metabolitos para defenderse contra el ataque de herbívoros y patógenos (Herms & Mattson, 1992).

2. Daño por insectos herbívoros

La respuesta de la planta al insecto es el resultado de la percepción del estímulo mecánico, que incluye el efecto del peso corporal de la larva, el grado de daño producido por las mordeduras o debido al desplazamiento del insecto sobre la hoja, y también depende de la percepción del estímulo químico, *i.e.*: sustancias inductoras que pueden estar en la saliva o en las secreciones orales (SO). La saliva es producida por las glándulas salivales ubicadas cerca del aparato masticador (Felton & Eichenseer, 1999), mientras que las SO provienen del sistema digestivo del animal y podrían contener sustancias de origen animal como también productos de la degradación del tejido vegetal ingerido (von Dahl *et al.*, 2006). Se han reconocido componentes específicos de cada una que pueden inducir

respuestas en la planta. Es el caso de la glucosa oxidasa (GOX) salival de *S. exigua* que resultó responsable de la represión de las defensas inducibles, incluyendo la síntesis de nicotina, en plantas de *Nicotiana tabacum* (Musser *et al.*, 2002; Musser *et al.*, 2005; Bede *et al.*, 2006). En las SO se describieron varios grupos de moléculas capaces de inducir las defensas como β -glucosidasa (Mattiacci *et al.*, 1995), FACs (del inglés *fatty acid-amino acid conjugates*) entre las que se destaca la volicitina (Alborn *et al.*, 1997), y recientemente, fragmentos de la ATP sintasa cloroplastial llamada inceptina (Schmelz *et al.*, 2006; Schmelz *et al.*, 2007).

3. Objetivos de este capítulo

Los experimentos presentados a continuación fueron diseñados para evaluar el impacto de la competencia con plantas vecinas sobre el crecimiento de un insecto masticador en un cultivo de *Arabidopsis*. Para ello diseñamos dos tipos de bioensayos en los que evaluamos el incremento del peso de larvas de *S. frugiperda* para reconocer qué señales de competencia son necesarias y suficientes para modular las defensas inducibles por el ataque de insectos: **1)** baja vs. alta densidad de plantas; **2)** luz ambiente vs. luz ambiente suplementada con RL para simular la presencia de plantas vecinas que no alcanzan a producir un sombreado real.

Dado que en *Arabidopsis* disponemos de mutantes deficientes en distintas vías de señalización, incluimos en los dos experimentos al mutante *phyB*, que carece de un *phyB* funcional y presenta un fenotipo constitutivo de sombreado aún creciendo bajo plena luz solar. Este mutante nos permite evaluar si el efecto del RL sobre la calidad del tejido está mediado específicamente por la vía del *phyB*.

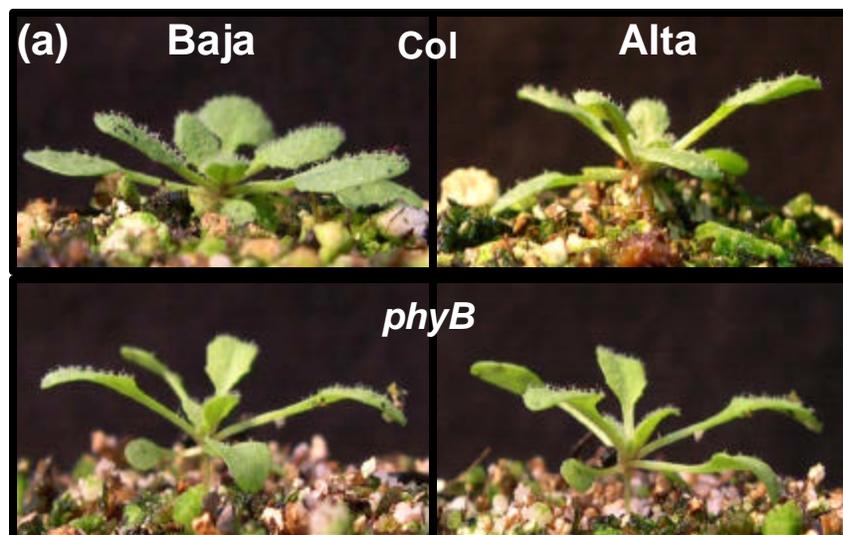
Los Materiales y Métodos empleados en esta sección se describen en detalle en la sección M&M correspondientes al Capítulo 2.

RESULTADOS

El crecimiento de las orugas de *S. frugiperda* fue mayor sobre plantas cultivadas a altas densidades

Existen estudios previos que muestran una conexión fisiológica entre los mecanismos involucrados en la competencia y las defensas inducibles por insectos. En esta dirección, plantas de tomate cultivadas a mayores densidades acumularon menor cantidad de metabolitos con función antiherbívoro como la rutina, el ácido clorogénico y la tomatina (Stamp *et al.*, 2004), presumiblemente porque ellas tienen acceso a niveles reducidos de recursos del ambiente comparadas con plantas aisladas. Cultivé plantas de *Arabidopsis* a bajas y altas densidades y medí el efecto de la densidad sobre varios parámetros de la planta relacionados con la calidad forrajera del tejido para larvas de *S. frugiperda* en un ensayo de no-elección. Las plantas fueron cultivadas en macetas individuales, excluyendo la posibilidad de competencia subterránea y permitiendo, en cambio, la competencia aérea de las plantas, imitando condiciones de competencia encontradas en la naturaleza. Al momento de la medición de los parámetros de SAS, el sombreado real producido entre las plantas era relativamente bajo. En el ecotipo salvaje (Col), las plantas respondieron al aumento de densidad induciendo las respuestas típicas de SAS, caracterizadas por una disminución de la proporción lámina/pecíolo, un aumento en el ángulo de inserción foliar y un incremento en la altura del canopeo (Figura 1).

La masa de larvas de *S. frugiperda* fue claramente mayor sobre las plantas cultivadas a alta densidad, indicando que estas plantas poseen un tejido de mejor calidad forrajera que las de baja densidad (Figura 2).



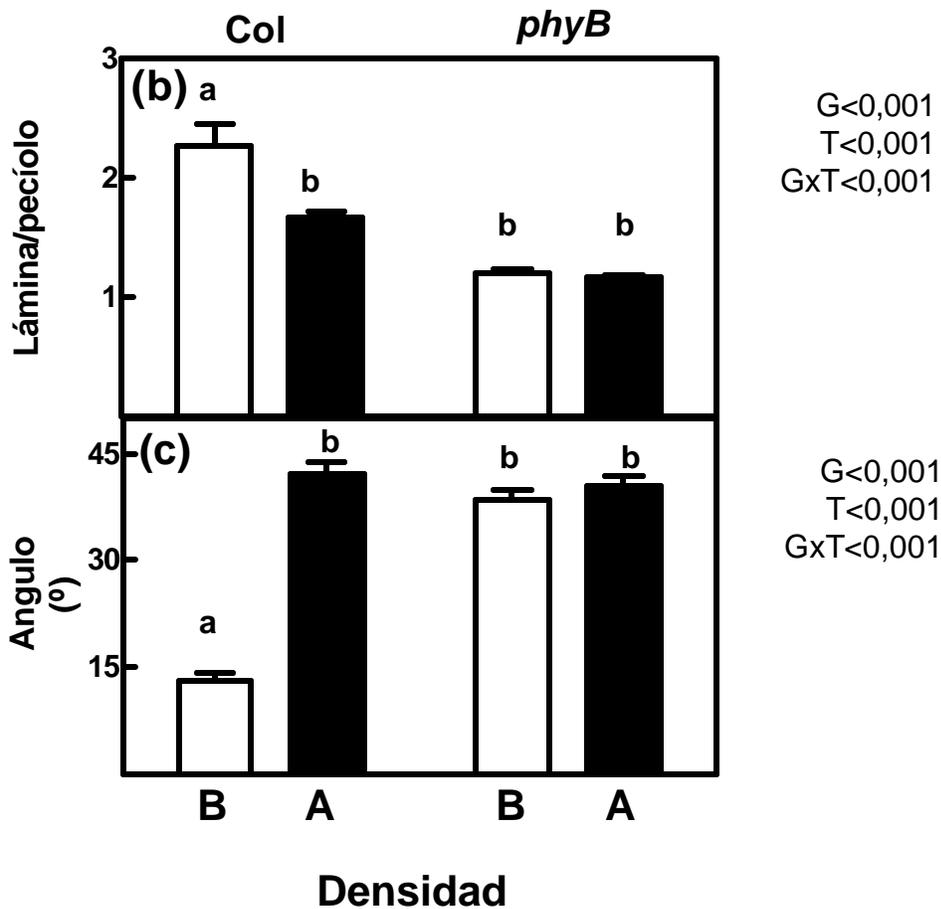


Figura 1: Experimento con distintas densidades de *Arabidopsis* para los genotipos salvaje y *phyb*. a) fenotipo de plantas salvaje y del mutante *phyB* cultivadas en invernáculo a baja (B) y alta (A) densidades, b) proporción L/P. c) ángulo de inserción foliar. Las barras delgadas representan 1 error estándar (n=4) para cada densidad por cada genotipo). La significancia estadística de los efectos principales (G=Genotipo, T=tratamiento de densidad) y la interacción (GxT) se indica a la derecha de cada panel. Letras distintas indican diferencias significativas en los casos donde la interacción fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$)

Las plantas del mutante *phyB*, que mostraron un fenotipo de SAS constitutivo (Figura 1), cultivadas a baja densidad tuvieron un resultado del bioensayo similar al de las plantas salvajes cultivadas a alta densidad (Figura 2). Este resultado señala que la calidad del tejido del mutante *phyB* es mejor que la del ecotipo salvaje. Es interesante señalar que el mutante *phyB* retuvo un grado importante de respuesta a la densidad en cuanto al incremento en masa de las larvas se refiere. Este resultado sugiere que algún otro fitocromo, a parte del *phyB*, estaría modulando la calidad del tejido de *Arabidopsis*.

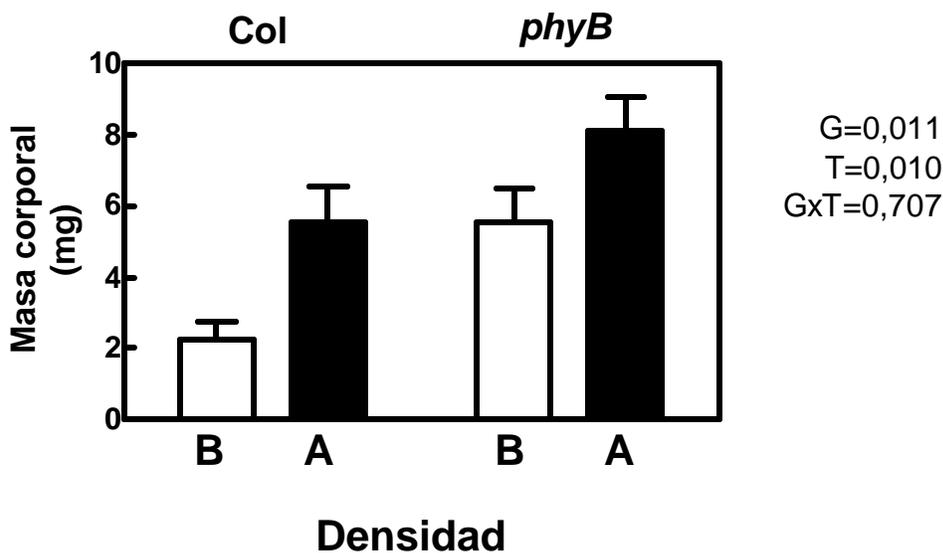


Figura 2: Masa de larvas de *S. frugiperda* alimentadas sobre plantas del ecotipo salvaje y mutante *phyB* cultivadas a a baja (B) y alta (A) densidades. Las barras delgadas representan 1 error estándar (n=4 para cada densidad por cada genotipo). La interacción del ANOVA no fue significativa ($p>0.05$).

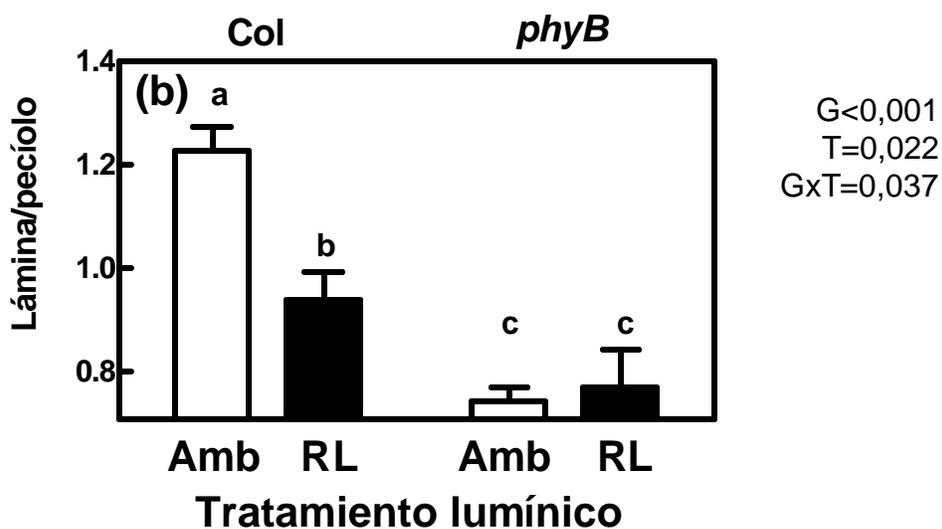
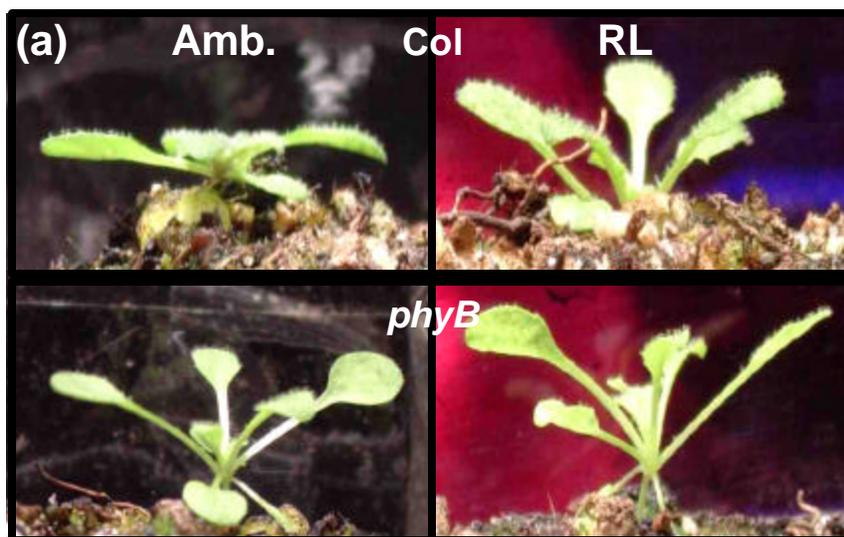
El tratamiento de densidad no tuvo efecto en la acumulación total de biomasa de las plantas, tampoco en la distribución de biomasa entre vástago y raíz (Tabla 1) dentro de cada genotipo. Sin embargo, el mutante *phyB* tuvo en promedio una menor masa aérea que la del genotipo salvaje. Simultáneamente, no se observó diferencia en la relación C:N entre los tratamientos de los dos genotipos. Esto es de suma importancia dado que la relación C:N es un indicador general de la calidad forrajera del tejido (Tabla 1). Estos resultados sugieren que el efecto de la competencia con plantas vecinas sobre el crecimiento de las larvas está controlado por algún otro factor de la calidad del tejido vegetal, sugiriendo que la competencia podría regular diferencialmente las defensas inducibles por insectos.

Genotipo	Densidad	Vástago (g)	Raíz (g)	Vástago/Raíz	C:N
Col	baja	0,628 ? 0,071 a	0,067 ? 0,005 a	9,643 ? 0,876 a	9,568 ? 0,543 a
Col	alta	0,535 ? 0,038 a	0,051 ? 0,002 b	10,597 ? 0,598 a	9,972 ? 0,561 a
<i>phyB</i>	baja	0,357 ? 0,074 b	0,061 ? 0,003 a	5,791 ? 1,050 b	10,767 ? 0,180 a
<i>phyB</i>	alta	0,356 ? 0,016 b	0,057 ? 0,005 b	6,238 ? 0,310 b	10,378 ? 0,176 a

Tabla 1: Parámetros de acumulación y distribución de biomasa entre vástago y raíz para los genotipos salvaje y *phyB* cultivados en condiciones de alta y baja densidad. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0.05$; n=3) en ANOVA de dos factores.

El crecimiento de larvas de *S. frugiperda* fue mayor sobre plantas expuestas a señales lumínicas de competencia

Se cultivaron plantas de *Arabidopsis* en el invernáculo bajo radiación natural con o sin suplementación de RL. El nivel de RL utilizado fue ajustado para imitar la influencia de plantas vecinas distantes. En nuestros experimentos, las plantas fueron cultivadas en macetas individuales para evitar la competencia subterránea. Las plantas del genotipo salvaje respondieron a una baja relación R:RL con una disminución de la proporción L/P y con un aumento en el ángulo de inserción foliar, respuestas típicas del SAS (Figura 3).



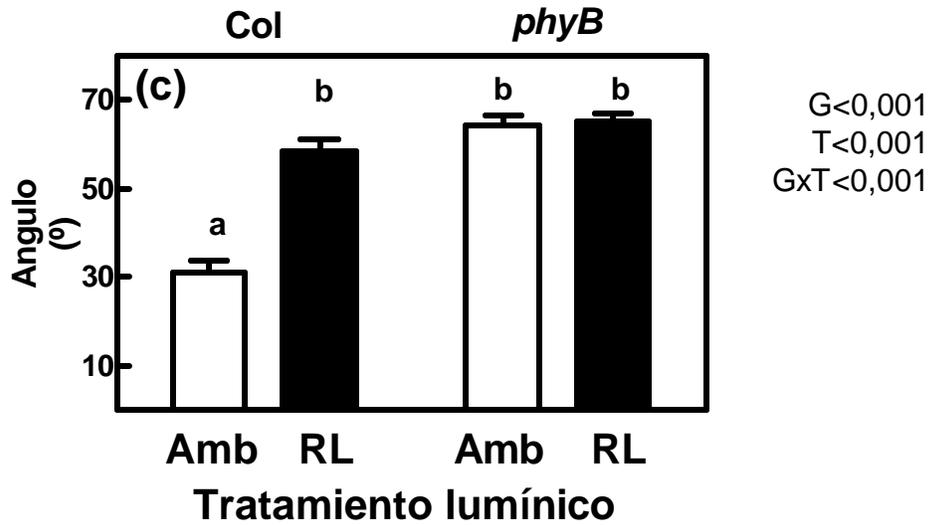


Figura 3: Experimento de irradiación con RL simulando la presencia de plantas vecinas sobre los genotipos salvaje y *phyB* de *Arabidopsis*. a) fenotipo de plantas salvaje y del mutante *phyB* cultivadas en invernáculo bajo luz natural (Ambiente) o suplementado con RL (RL), b) proporción L/P. c) ángulo de inserción foliar. Las barras delgadas representan 1 error estándar (n=15). Estos resultados provienen de un experimento representativo. La significancia estadística de los efectos principales (G=Genotipo, T=tratamiento lumínico) y la interacción (GxT) se indica a la derecha de cada panel. Letras distintas indican diferencias significativas en los casos donde la interacción fue estadísticamente significativa (p<0.05)

El crecimiento de larvas de *S. frugiperda* fue mayor sobre plantas expuestas a señales lumínicas de competencia (baja relación R:RL) comparadas con aquellas crecidas sobre plantas que recibieron luz solar ambiente (Figura 4).

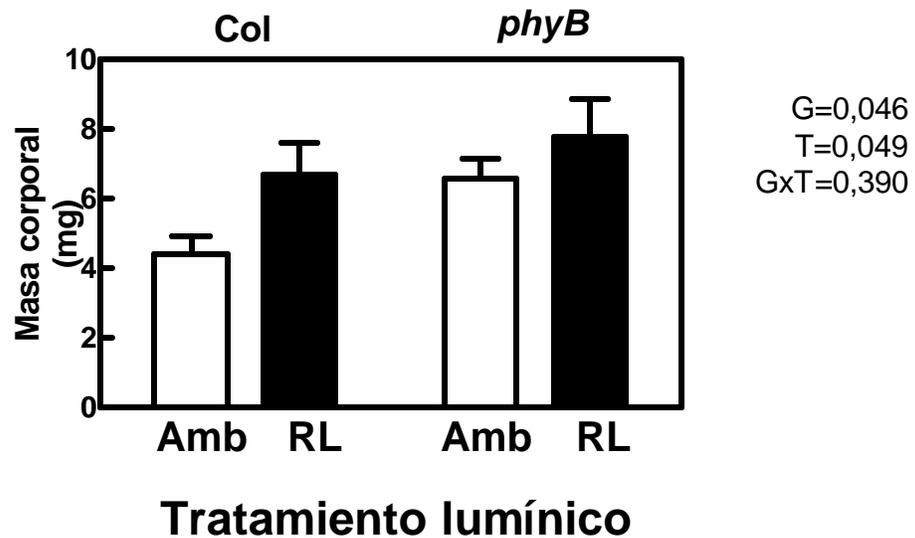


Figura 4: Masa de larvas de *S. frugiperda* alimentadas de plantas de los genotipos salvaje y mutante *phyb* cultivadas en ambientes suplementados o no con RL. Las barras delgadas representan 1 error estándar (n=15). La interacción del ANOVA no fue significativa (p>0.05).

El mutante *phyB* cultivado en ambos ambientes lumínicos mostró siempre un fenotipo SAS (Figura 3) típico de rosetas sombreadas. El crecimiento de larvas de *S. frugiperda* no

fue significativamente diferente entre los dos ambientes lumínicos, pero fue en ambos casos mayor al crecimiento registrado para las larvas sobre el genotipo salvaje cultivadas con luz ambiente (Figura 4). Como se vio para el experimento de densidad, la calidad del tejido mantuvo una respuesta positiva al RL reflejado en plantas del mutante *phyB*. Dentro de la ventana de tiempo de nuestros experimentos, el RL no afectó significativamente la masa específica del tejido foliar ni la relación C:N (Tabla 2).

Genotipo	Tratamiento	Vástago (g)	Raíz (g)	Vástago/Raíz	C:N
Col	Ambiente	0,595 ? 0,086 a	0,062 ? 0,004 a	9,597 ? 0,635 a	8,506 ? 0,390 a
Col	RL	0,545 ? 0,057 a	0,058 ? 0,003 a	9,397 ? 0,325 a	8,512 ? 0,223 a
<i>phyB</i>	Ambiente	0,339 ? 0,041 b	0,047 ? 0,005 b	7,21 ? 0,550 b	8,810 ? 0,342 a
<i>phyB</i>	RL	0,329 ? 0,026 b	0,048 ? 0,004 b	6,983 ? 0,651 b	8,477 ? 0,228 a

Tabla 2: Parámetros de relación C:N y acumulación de biomasa entre vástago y raíz para los genotipos salvaje y *phyB* cultivados en ambientes suplementados o no con RL para simular los cambios en la relación R:RL generados por la presencia de plantas vecinas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$; $n = 3$) en ANOVA de dos factores.

Este resultado confirma resultados previos en *Nicotiana longiflora* (Izaguirre *et al.*, 2006), y claramente demuestran que, aún en la ausencia de una competencia directa entre los individuos, la sola percepción de cambios en la composición espectral asociada al R y al RL puede inducir cambios en las plantas que benefician al crecimiento del insecto. La comparación de los genotipos Col y *phyB* sugiere que los efectos de la densidad y del RL sobre la calidad forrajera del tejido están mediados en parte por una reducción de los niveles de Pfr del *phyB*. Aunque, la respuesta residual al RL observadas en el bioensayo sobre el mutante sugieren que otros fitocromos, que también juegan un rol en la percepción de plantas vecinas, podrían estar controlando la calidad del tejido foliar.

El RL y la mutación en el *phyB* inhiben la expresión de las defensas inducibles de *Arabidopsis*

Las plantas responden a los insectos herbívoros induciendo una variedad de compuestos tóxicos y repelentes de distinta naturaleza química. Nosotros estudiamos los efectos del RL y la deficiencia del *phyB* sobre las defensas inducibles de *Arabidopsis* midiendo la acumulación de compuestos fenólicos y la expresión de varios genes marcadores de la vía del JA. Las plantas del genotipo salvaje respondieron al agregado de regurgitado de *S.*

frugiperda, tratamiento de herbivoría simulada, incrementando la acumulación de compuestos fenólicos en sus hojas (Figura 5 a) y la expresión del gen *HEL* como marcador de la respuesta a insectos masticadores (Figura 5 b). Estas respuestas inducidas por el ataque de herbívoros desaparecieron o estuvieron fuertemente atenuadas cuando las plantas fueron cultivadas en ambientes suplementados con RL. Las plantas del mutante *phyB* mostraron una expresión reducida de sus defensas inducibles, independientemente de la relación R:RL, luego de ser inducidas con el regurgitado de *S. frugiperda* (Figura 5 a y b).

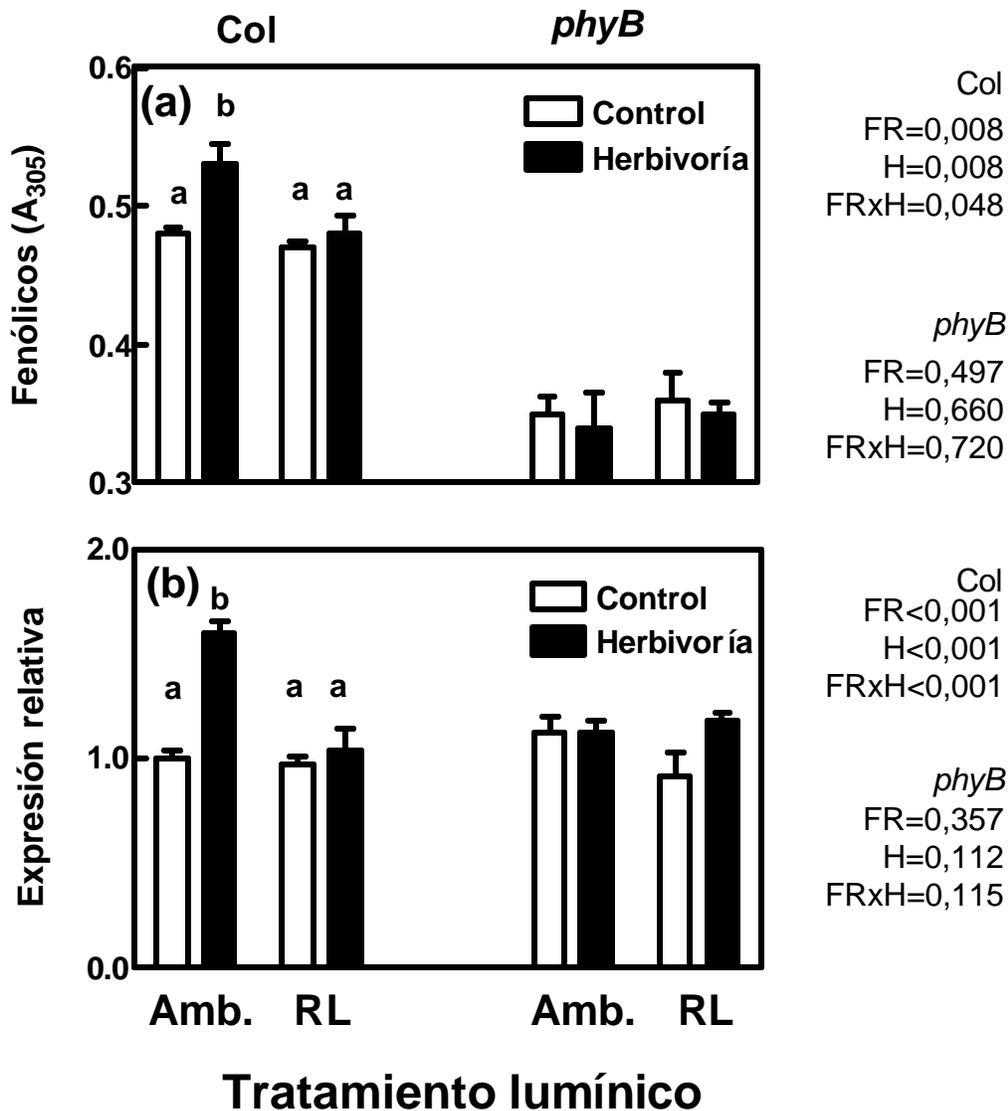


Figura 5: Impacto de la exposición de plantas de Arabidopsis al RL suplementario o a la deficiencia en el *phyB* en la expresión de las defensas inducibles en respuesta a la herbivoría simulada: a) acumulación de compuestos fenólicos, b) acumulación del transcritpo de *HEL*. Las barras delgadas representan 1 error estándar (n=4). La significancia estadística de los efectos principales (G=Genotipo, T=tratamiento lumínico) y la interacción (GxT) se indica a la derecha de cada panel. Letras distintas indican diferencias significativas en los casos donde la interacción fue estadísticamente significativa (p<0.05).

BIBLIOGRAFIA

Alborn, H.T., Turlings, T.C.J., Jones, T.H., Stenhagen, G., Loughrin, J.H. & Tumlinson, J.H. (1997) An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science*, **276**, 945-949.

Ballaré, C.L., Scopel, A.L. & Sánchez, R.A. (1990) Far-red radiation reflected from adjacent leaves: an early signal of competition in plant canopies. *Science*, **247**, 329-332.

Bede, J., Musser, R., Felton, G. & Korth, K. (2006) Caterpillar herbivory and salivary enzymes decrease transcript levels of *Medicago truncatula* genes encoding early enzymes in terpenoid biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, **60**, 519-531.

Felton, G. & Eichenseer, H. (1999) Herbivore saliva and its effects on plant defense against herbivores and pathogens. In AA Agrawal, S Tuzun, E Bent, eds, *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores*. APS Press, St. Paul, MN, 19-36.

Herms, D.A. & Mattson, W.J. (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology*, **67**, 283-335.

Izaguirre, M.M., Mazza, C.A., Biondini, M., Baldwin, I.T. & Ballaré, C.L. (2006) Remote sensing of future competitors: impacts on plant defenses. *PNAS*, **103**, 7170-7174.

Mattiacci, L., Dicke, M. & Posthumus, M. (1995) β -glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *PNAS*, **92**, 2036-2040.

Musser, R.O., Hum-Musser, S.M., Eichenseer, H., Peiffer, M., Ervin, G., Murphy, J.B. & Felton, G.W. (2002) Herbivory: caterpillar saliva beats plant defences. *Nature*, **416**, 599-600.

Musser, R.O., Kwon, H.S., Williams, S.A., White, C.J., Romano, M.A., Holt, S.M., Bradbury, S., Brown, J.K. & Felton, G.W. (2005) Evidence that caterpillar labial saliva suppresses infectivity of potential bacterial pathogens. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **58**, 138-144.

Schmelz, E.A., Carroll, M.J., LeClere, S., Phipps, S.M., Meredith, J., Chourey, P.S., Alborn, H.T. & Teal, P.E.A. (2006) Fragments of ATP synthase mediate plant perception of insect attack. *PNAS*, **103**, 8894-8899.

Schmelz, E.A., LeClere, S., Carroll, M.J., Alborn, H.T. & Teal, P.E.A. (2007) Cowpea chloroplastic ATP synthase is the source of multiple plant defense elicitors during insect herbivory. *Plant Physiology*, **144**, 793-805.

Siemens, D.H., Garner, S.H., Mitchell-Olds, T. & Callaway, R.M. (2001) Cost of defense in the context of plant competition: *Brassica rapa* may grow and defend. *Ecology*, **83**, 505-517.

Stamp, N., Bradfield, M., Li, S. & Alexander, B. (2004) Effect of competition on plant allometry and defense. *The American Midland Naturalist*, **151**, 50-64.

von Dahl, C.C., Havecker, M., Schlogl, R. & Baldwin, I.T. (2006) Caterpillar-elicited methanol emission: a new signal in plant-herbivore interactions? *The Plant Journal*, **46**, 948-960.

Whittaker, R.H. & Feeny, P.P. (1971) Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science*, **171**, 757-770.

capítulo

4

**señales de competencia
y sensibilidad al JA
ensayos químicos y mutantes**

CAPITULO 4

INTRODUCCION

1. Señales derivadas de la herbivoría

Una vez que el insecto comienza a masticar la hoja, se disparan dos clases de señales: las mecánicas y las químicas. Las mecánicas están asociadas al nivel de daño que produce el herbívoro, *i.e.*: la picadura de un insecto chupador de floema difiere de la lesión causada por una larva masticadora (Walling, 2000; De Vos *et al.*, 2005), y a la habilidad de mezclar los componentes subcelulares, *i.e.*: sólo después del daño producido por insectos masticadores la enzima mirosinasa, localizada en células especiales del parénquima floemático, se pone en contacto con los precursores de los glucosinolatos ubicados en el citoplasma activándolos por medio de un clivaje específico (Andreasson *et al.*, 2001; Van Poecke, 2007). En cambio, las químicas están asociadas a la percepción de distintos inductores o “*elicitors*” presentes en el regurgitado o saliva del insecto, *i.e.*: oligogalactourónidos, ácidos grasos conjugados con aminoácidos, enzimas, entre otras (Doares *et al.*, 1995; Mattiacci *et al.*, 1995; Voelckel & Baldwin, 2004).

2. El daño y los primeros eventos en el interior celular: rol del JA

El JA, una fitohormona derivada de los ácidos grasos, juega un rol central en la respuesta de defensa de la planta contra el ataque de insectos herbívoros. Transcurridas unas dos horas de producido el daño por el herbívoro se registra una acumulación de JA y de su precursor OPDA (Reymond *et al.*, 2004). Entre los primeros eventos que le permiten a la planta percibir el daño ocasionado se encuentran despolarizaciones de membrana relacionadas con cambios en la concentración de Ca^{+2} (Maffei *et al.*, 2007). En el citoplasma existen proteínas que unen Ca^{+2} , como las CDPK (del inglés *calcium dependent protein kinase*), que son fundamentales en el mantenimiento de la homeostasis del catión, pero además se especula con que forman parte de una cascada de transducción de señal como sucede en otros organismos como bacterias, levaduras y mamíferos (Lecourieux *et al.*, 2006). En papa, *Solanum tuberosum*, se reportó una regulación negativa de la expresión

de una CDPK tras el agregado de JA (Ulloa *et al.*, 2002). En tomate (Kandoth *et al.*, 2007) y en tabaco (Ludwig *et al.*, 2005) se sugirió una conexión entre la inducción de una MAPK (del inglés *mitogen-activated protein kinase*) y una CDPK. Las MAPK se sabe son componentes centrales en la transducción de señales subcelulares. Aunque todavía no está clara la conexión entre estas señales tempranas y el resto de la señalización celular que se da luego del ataque del herbívoro.

3. Percepción y transducción de la señal del JA

El modelo más reciente para la percepción del JA se completó con el descubrimiento de las proteínas JAZ (del inglés *Jasmonate ZIM-domain*). Estas proteínas, que en *Arabidopsis* forman parte de una familia integrada por 12 miembros, están normalmente unidas a los promotores o a factores de transcripción reprimiendo la transcripción de otros genes. Una vez que el JA se sintetiza, es modificado covalentemente por la enzima JAR1, agregándole el aminoácido isoleucina (Ile) (Staswick *et al.*, 2002). El JA-Ile tiene una afinidad por COI1 (del inglés *Coranatine insensitive 1*) varias veces superior a la del JA solo o el JA conjugado con otros aminoácidos, lo que hace suponer que la forma JA-Ile es la que interactúa *in vivo* con COI1. Estos resultados sugieren fuertemente que COI1 es el receptor del JA (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). Al igual que el receptor de las auxinas y giberelinas, COI1 también es una E3 ligasa que tiene la capacidad de agregar ubiquitina (una proteína de 76 aminoácidos) a una proteína blanco y, de esta manera, condenarla a la degradación mediada por el complejo proteico llamado 26S-proteosoma (Stone & Callis, 2007). Entonces el complejo JA-Ile-COI1 agrega ubiquitina específicamente a JAZ promoviendo su degradación y desreprimiendo los genes inducibles por JA, como *MYC2* (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). La transcripción de *MYC2* induce, por un lado, la síntesis de JA y la transcripción de los genes *JAZ*, hecho que explica la respuesta de “pulsos” descrita para esta hormona en varias especies. Simultáneamente, *MYC2* promueve la transcripción de los genes involucrados en la defensa contra el ataque de herbívoros (Farmer, 2007) (Figura 1).

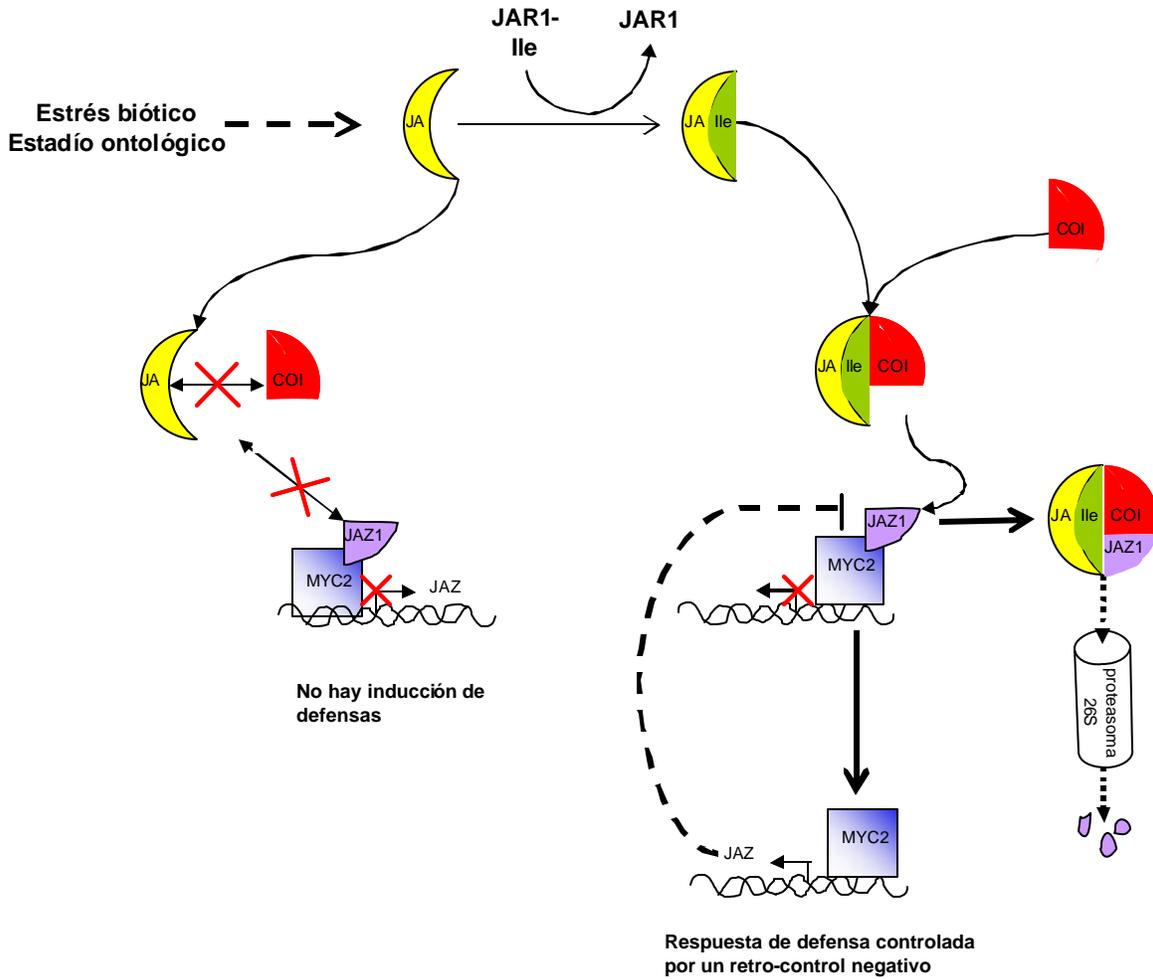


Figura 1: Modelo actual sobre el mecanismo de percepción del JA y eventos tempranos de transducción de la señal.

4. Objetivos del capítulo

En el capítulo anterior, mostré que el RL reflejado por plantas vecinas atenúa la inducción de las defensas de *Arabidopsis* contra la herbivoría. Dado que el JA media las respuestas de defensa a la herbivoría, y que los niveles de JA en los mutantes *phyA*, *phyB* y *phyAphyB* son similares a los del genotipo salvaje (Zhai *et al.*, 2007), nos preguntamos si el RL podría estar modulando la sensibilidad al JA, y de esta manera, controlar la reasignación de recursos desde respuestas de defensas a respuestas de crecimiento.

Para responder a esta pregunta llevé adelante dos aproximaciones, una química y otra genética, evaluando la habilidad de la planta para acumular defensas anti-herbívoro en ambientes lumínicos con niveles contrastantes de RL suplementario. La primera

aproximación consistió en la aplicación exógena de la hormona MeJA y la segunda, en la utilización del mutante *jar1-1* deficiente en la activación del JA a través de su conjugación con Ile.

Los Materiales y Métodos empleados en esta sección se describen en detalle en el Capítulo 2.

RESULTADOS

El impacto inhibitorio del RL sobre la expresión de las defensas inducibles de *Arabidopsis* correlaciona con una desensibilización al JA

Una aproximación clásica para estudiar la sensibilidad a una hormona consiste en aplicar exógenamente dosis conocidas de la hormona y determinar posteriormente la respuesta. Para evaluar si parte del efecto del RL pasaba a través de la desensibilización al JA, diseñé un experimento de aplicación exógena de MeJA, un conjugado metilado del JA con funciones biológicas descritas, capaz de inducir fuertemente las defensas de la planta (Wu *et al.*, 2008). Si parte del efecto del RL pasaba por controlar la sensibilidad al JA, entonces esperábamos que la inducción de respuestas por MeJA estuviera total o parcialmente inhibida en ambientes enriquecidos en RL.

Las plantas de *Arabidopsis* del genotipo salvaje respondieron al agregado exógeno de MeJA aumentando los niveles de compuestos fenólicos y también la expresión del gen *HEL* (Figura 2 a y b). Ese incremento en las defensas inducibles por MeJA desapareció casi en su totalidad cuando las plantas fueron crecidas con RL adicional (Figura 2 a y b), tanto para la acumulación de compuestos fenólicos como para la expresión del gen *HEL*.

En plantas del mutante *phyB* la inducción de las respuestas de defensa por MeJA estuvo significativamente reducida, independientemente de los niveles ambientales de RL. Esas plantas no acumularon compuestos fenólicos en respuesta al tratamiento con MeJA, ni tampoco indujeron la expresión del gen *HEL* (Figura 2 a y b). Tomando estos datos de manera conjunta, puedo concluir que la forma Pfr del fitocromo es necesaria para inducir la acumulación de los metabolitos de defensa en respuesta al MeJA. El RL al disminuir la población de moléculas Pfr del fitocromo estaría disminuyendo la sensibilidad al MeJA exógeno.

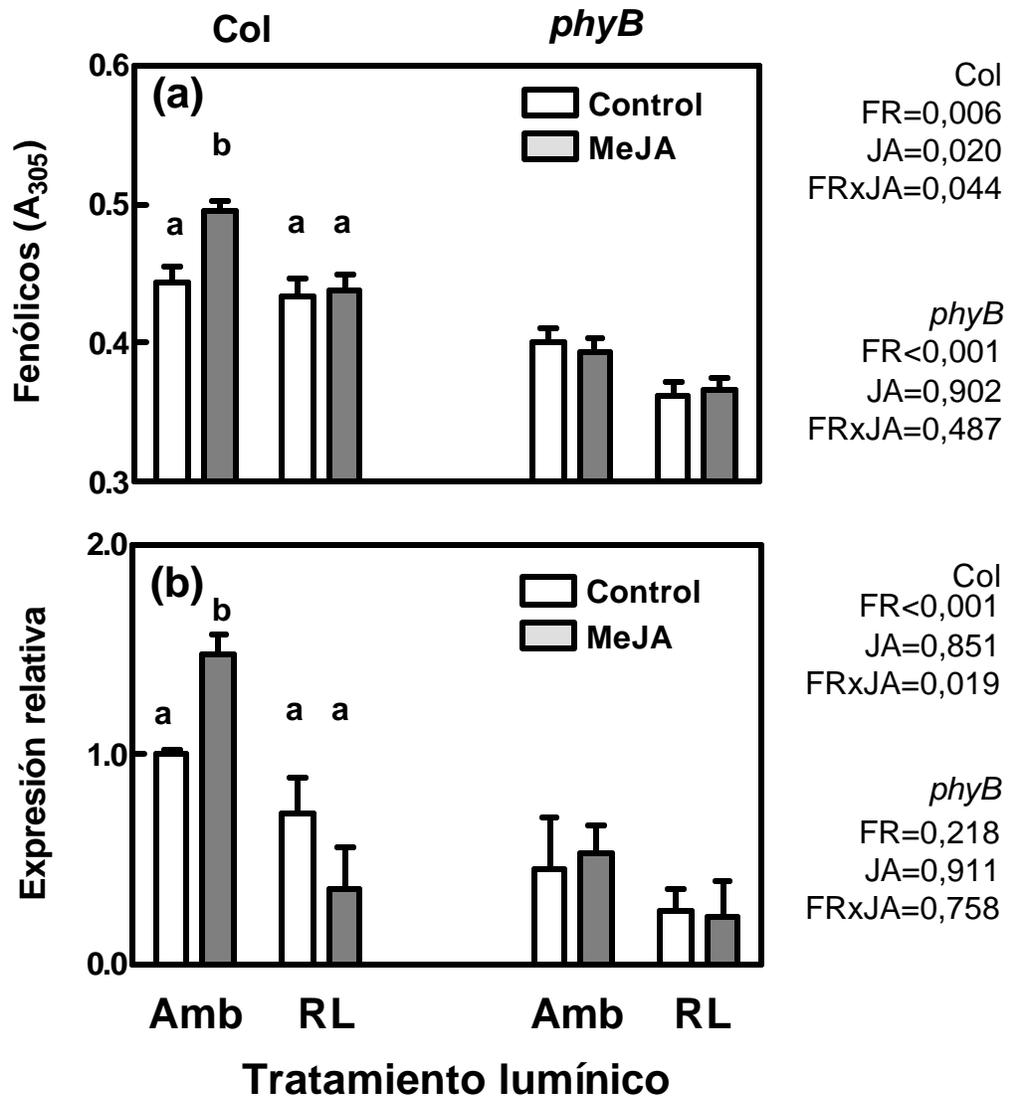


Figura 2 Las señales lumínicas de la competencia o la deficiencia del *phyB* reducen la sensibilidad al MeJA, evaluado sobre: a) la acumulación de compuestos fenólicos, b) la expresión del gen *HEL*. Las barras delgadas representan 1 error estándar (n=4) para caso. La significancia estadística de los efectos principales (G=Genotipo, T=tratamiento lumínico) y la interacción (GxT) se indica a la derecha de cada panel. Letras distintas indican diferencias significativas en los casos donde la interacción fue estadísticamente significativa (p<0.05).

El efecto del RL incrementando la calidad forrajera del tejido desaparece en el mutante *jar1-1*

Como una prueba complementaria de que el efecto del RL sobre la expresión de las defensas inducibles está mediado por alteraciones en la vía de señalización de JA abordé una aproximación genética. Utilicé el mutante *jar1-1* insensible al JA, por ser deficiente en la enzima encargada de activar biológicamente al JA uniéndolo covalentemente con Ile (Staswick *et al.*, 2002; Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). Si el efecto del RL necesita

la vía del JA intacta para inhibir la expresión de las defensas inducibles, en el mutante *jar1-1* las defensas deberían estar reprimidas aún en presencia del RL y, por ende, el efecto del RL mejorando la calidad del tejido se perdería o se vería fuertemente disminuído.

El mutante *jar1-1* mostró tener intactas las respuestas típicas de SAS, respondiendo de forma similar que el genotipo salvaje al RL suplementario (Figura 3 a, b y c).

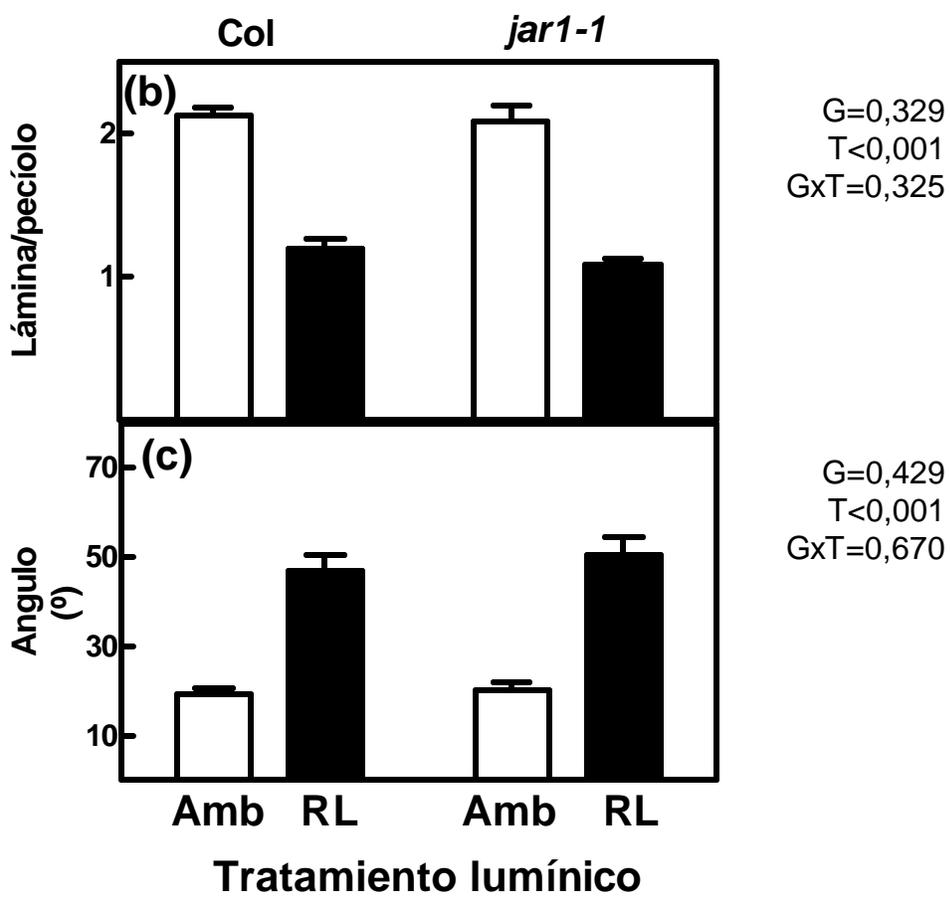
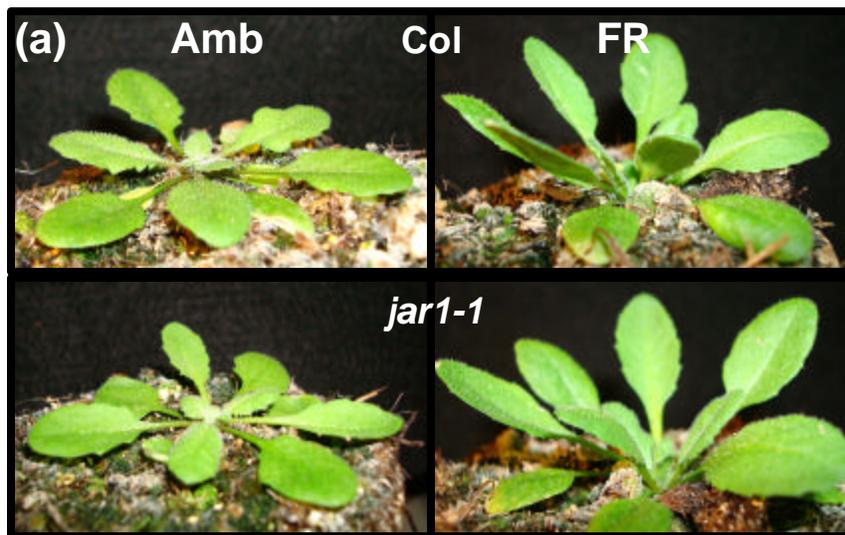


Figura 3: Efectos del RL reflejado sobre el mutante *jar1-1* insensible al JA. a) Fenotipo de plantas de los genotipos salvaje y mutante cultivadas en ambientes sin o con RL suplementario. Los parámetros medidos de SAS fueron: b) la proporción L/P y c) el ángulo de inserción foliar. Las barras delgadas representan 1 error estándar (n=15). La interacción del ANOVA no fue significativa (p>0.05).

Como el mutante *jar1-1* tiene una respuesta de defensa defectuosa aún en presencia del insecto, esperaba que el crecimiento de las larvas de *S. frugiperda* fuera mayor sobre plantas del mutante *jar1-1* que sobre el genotipo salvaje. Esta suposición fue cierta, dado que las larvas crecieron más sobre el mutante que sobre el genotipo salvaje cuando las plantas eran cultivadas con plena luz solar (figura 4). Esto coincide con resultados previos donde se registró un mayor crecimiento de larvas de *M. sexta* en plantas de tabaco deficientes en el gen *JAR1* comparadas con las que crecieron sobre el genotipo salvaje (Kang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). En ambientes enriquecidos en RL, el crecimiento promedio de las larvas sobre el genotipo salvaje fue significativamente mayor al de las larvas alimentadas sobre plantas cultivadas con luz ambiente, concordando con resultados previos (Figura 4). Pero el RL no afectó de manera significativa el crecimiento de las larvas de *S. frugiperda* alimentadas sobre el mutante *jar1-1*.

Estos resultados junto a los ensayos de aplicación exógena de MeJA, nos permiten concluir que parte importante del efecto del RL mejorando la calidad del tejido requiere de la integridad de la vía del JA (Figura 4) y que lo haría desensibilizando los tejidos contra el JA.

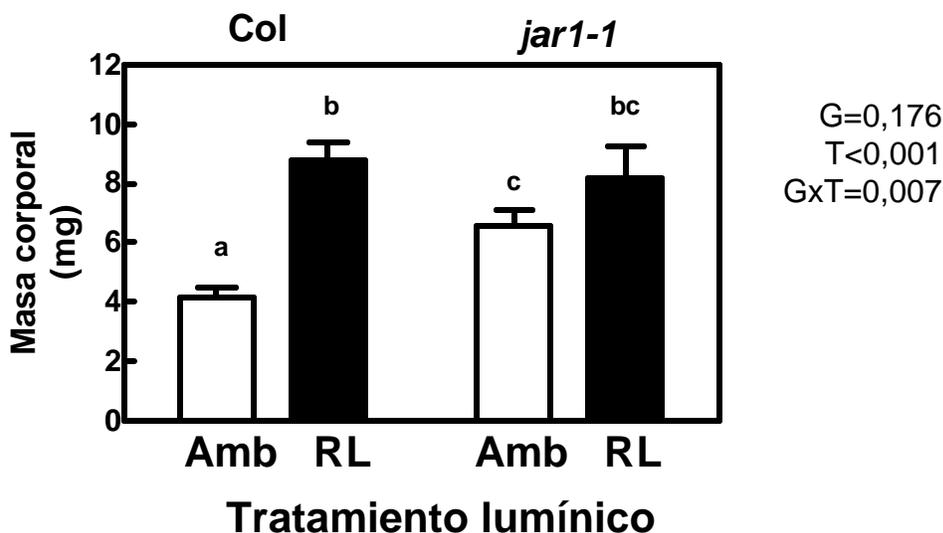


Figura 4: Bioensayo con larvas de *S. frugiperda* alimentándose de plantas del mutante *jar1-1* cultivadas con o sin RL suplementario. Las barras delgadas representan 1 error estándar (n=15). La significancia estadística de los efectos principales (G=Genotipo, T=tratamiento lumínico) y la interacción (GxT) se indica a la derecha de cada panel. Letras distintas indican diferencias significativas en los casos donde la interacción fue estadísticamente significativa (p<0.05).

BIBLIOGRAFIA

- Andreasson, E., Jorgensen, L.B., Hoglund, A.-S., Rask, L. & Meijer, J.** (2001) Different myrosinase and idioblast distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiology*, **127**, 1750-1763.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L. & Solano, R.** (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, **448**, 666-671.
- De Vos, M., Van Oosten, V.R., Van Poecke, R.M.P., Van Pelt, J.A., Pozo, M.J., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.-P., Van Loon, L.C., Dicke, M. & Pieterse, C.M.J.** (2005) Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *MPMI*, **18**, 923-937.
- Doares, S.H., Syrovets, T., Weiler, E.W. & Ryan, C.A.** (1995) Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *PNAS*, **92**, 4095-4098.
- Farmer, E.E.** (2007) Plant biology: jasmonate perception machines. *Nature*, **448**, 659-660.
- Kandath, P.K., Ranf, S., Pancholi, S.S., Jayanty, S., Walla, M.D., Miller, W., Howe, G.A., Lincoln, D.E. & Stratmann, J.W.** (2007) Tomato MAPKs LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 function in the systemin-mediated defense response against herbivorous insects. *PNAS*, **104**, 12205-12210.
- Kang, J.-H., Wang, L., Giri, A. & Baldwin, I.T.** (2006) Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Manduca sexta*. *The Plant Cell*, **18**, 3303-3320.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R. & Pugin, A.** (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist*, **171**, 249-269.
- Ludwig, A.A., Saitoh, H., Felix, G., Freymark, G., Miersch, O., Wasternack, C., Boller, T., Jones, J.D.G. & Romeis, T.** (2005) Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. *PNAS*, **102**, 10736-10741.
- Maffei, M.E., Mithofer, A. & Boland, W.** (2007) Insects feeding on plants: rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*, **68**, 2946-2959.
- Mattiacci, L., Dicke, M. & Posthumus, M.** (1995) ?-glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *PNAS*, **92**, 2036-2040.

Reymond, P., Bodenhausen, N., Van Poecke, R.M.P., Krishnamurthy, V., Dicke, M. & Farmer, E.E. (2004) A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *The Plant Cell*, **16**, 3132-3147.

Staswick, P.E., Tiryaki, I. & Rowe, M.L. (2002) Jasmonate response locus JAR1 and several related Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *The Plant Cell*, **14**, 1405-1415.

Stone, S.L. & Callis, J. (2007) Ubiquitin ligases mediate growth and development by promoting protein death. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**, 624-632.

Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A. & Browse, J. (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature*, **448**, 661-665.

Ulloa, R.M., Raices, M., MacIntosh, G.C., Maldonado, S. & Tellez-Inon, M.T. (2002) Jasmonic acid affects plant morphology and calcium-dependent protein kinase expression and activity in *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum*, **115**, 417-427.

Van Poecke, R.M.P. (2007) Arabidopsis-insect interactions. *The Arabidopsis Book*.

Voelckel, C. & 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.

Walling, L.L. (2000) The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation*, **19**, 195-216.

Wang, L., Halitschke, R., Kang, J.-H., Berg, A., Harnisch, F. & Baldwin, I. (2007) Independently silencing two JAR family members impairs levels of trypsin proteinase inhibitors but not nicotine. *Planta*, **226**, 159-167.

Wu, J., Wang, L. & Baldwin, I. (2008) Methyl jasmonate-elicited herbivore resistance: does MeJA function as a signal without being hydrolyzed to JA? *Planta*, **227**, 1161-1168.

Zhai, Q., Li, C.-B., Zheng, W., Wu, X., Zhao, J., Zhou, G., Jiang, H., Sun, J., Lou, Y. & Li, C. (2007) Phytochrome chromophore deficiency leads to overproduction of jasmonic acid and elevated expression of jasmonate-responsive genes in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology*, **48**, 1061-1071.

capítulo

5

mutante *sav3*,
desacopla el SAS de las defensas
caracterización funcional y bioensayo

CAPITULO 5

INTRODUCCION

1. Competencia con plantas vecinas y mecanismos de percepción.

En la naturaleza, las plantas crecen comúnmente compitiendo con otras plantas. Estas plantas vecinas afectan el crecimiento y desarrollo a través de una compleja red de efectos asociados al sombreado que incluyen la disminución de la disponibilidad de agua y nutrientes en el suelo, la reducción de la intensidad de luz, una disminución de la temperatura del suelo, entre otras. Estos cambios microclimáticos repercuten en la eficiencia de captación de recursos del medio, y en última instancia en el *fitness* del individuo (Dorn *et al.*, 2000).

Pero las plantas pueden detectar la presencia de plantas vecinas mucho antes de producirse un sombreado entre ellas, y por ende, mucho antes de que los efectos derivados del sombreado se produzcan. Esta habilidad de la planta para percibir cambios en la composición espectral de la luz es realizada en el interior de la célula por una familia de receptores llamados fitocromos. El fitocromo tiene dos formas interconvertibles cuya proporción estequiométrica esta determinada por la relación R:RL del ambiente. Cuando hay un canopeo denso, la relación R:RL es baja y la forma del fitocromo mas abundante es la inactiva conocida como Pr. En sitios abiertos, en cambio, la relación R:RL es cercana a 1 y el fotoequilibrio del fitocromo esta desplazado hacia la forma activa conocida como Pfr. La forma Pfr del fitocromo transduce esta señal al núcleo controlando positiva o negativamente la transcripción de ciertos genes que determinan el patrón de crecimiento y desarrollo de la planta.

En *Arabidopsis*, la familia proteica de los fitocromos está integrada por cinco miembros identificados desde A hasta E (Mathews & Sharrock, 1997). Estos fitocromos monitorean esencialmente las mismas señales lumínicas pero tienen roles fisiológicos ligeramente distintos. phyA y phyB son los fitocromos que juegan un rol principal en la vida de la planta, el primero durante la etapa de germinación de la semilla y el segundo en el establecimiento de la plántula. El phyA y el phyB poseen el mismo cromóforo por lo que sus espectros de absorción son idénticos. Sin embargo, estos fitocromos conectan con

distintas vías de desarrollo, la del phyA controlada por el RL y la del phyB controlada por el R, permitiéndoles una especialización funcional. La activación del phyA por RL le permite disparar una respuesta conocida como HIR (del inglés *high irradiance response*) luego de períodos con alta irradiancia o períodos prolongados de exposición (Ballaré *et al.*, 1991). Esta respuesta se la relaciona con estadios de la planta avanzados donde el sombreado entre plantas vecinas es intenso y también se la ha asociado a la supervivencia de plántulas creciendo bajo un canopeo denso (Yanovsky *et al.*, 1995). Las plantas que expresan una HIR no muestran las respuestas típicas de un SAS. En cambio, las respuestas LFR (del inglés *low-fluence response*) están mediadas por el phyB y necesitan bajos flujos para ser inducidas (Ballaré *et al.*, 1992; Ballaré & Scopel, 1997) jugando un rol central en los estadios tempranos del desarrollo del canopeo. Las plantas que expresan un LFR presentan el fenotipo típico del SAS.

2. Señalización del fitocromo

La forma Pfr del fitocromo migra al núcleo desde el citoplasma y se une a la proteína PIF3 (del inglés *PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 3*), un miembro de la superfamilia bHLH (del inglés *basic helix-loop-helix*) de factores de transcripción (Ni *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 1999; Fankhauser *et al.*, 1999). PIF3 localiza constitutivamente en el núcleo y se une a una secuencia tipo *G-box*, CACGTG, presente en varios genes regulados por luz. La forma Pfr del phyB es reclutada por PIF3 que puede estar previamente unida a su secuencia de unión al ADN (Martínez-García *et al.*, 2000). CCA1 (del inglés *CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED PROTEIN 1*) y LHY (del inglés *LATE ELONGATED HYPOCOTYL*) son dos de los genes regulados por la interacción *in vivo* del complejo PHYB-PIF3. Es interesante que CCA1 y LHY son también factores de transcripción, pero de la clase MYB, y han sido involucrados en el control de la expresión de genes asociados a un componente crucial del cloroplasto y a los ritmos circadianos (Wang *et al.*, 1997; Wang & Tobin, 1998; Green & Tobin, 1999). Han sido descritas interacciones positivas y negativas entre los componentes de las vías de señalización de los principales fotorreceptores de *Arabidopsis*, el phyA y el phyB. Pero las respuestas tempranas a la luz, como la inhibición de la elongación del hipocotilo y la expansión de los cotiledones, parecen converger en el grupo COP (del inglés *constitutive photomorphogenic 1*) que, a

través del control de proteólisis específicas regula la estabilidad de la proteína HY5 (del inglés *LONG HYPOCOTYL 5*) con función de factor de transcripción y, de esta manera, la transcripción de otros componentes ubicados río abajo en la cascada de transducción (Quail, 2002).

3. El SAS es un tipo de respuesta “gas-and-brake”

El modelo actual para el control de SAS sugiere un mecanismo “gas and brake” porque requiere la activación y represión génica para asegurar que la planta no tenga una respuesta exagerada al sombreado (Jiao *et al.*, 2007). Este modelo es apoyado por genes que regulan negativamente a su inductor, *i.e.*: CCA1 y LHY se unen al promotor del gen *TOC1* (del inglés *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 PROTEIN*) inhibiendo su expresión, pero a su vez *TOC1* regula positivamente la expresión de *CCA1* y *LHY* (Alabadi *et al.*, 2001). Esto constituye, en sí mismo, un bucle o “loop” que constituiría el núcleo del reloj biológico de *Arabidopsis* y, que además, explica la desetiología de plántulas mediadas por el phyB (Martínez-García *et al.*, 2000).

Entre los genes, inducidos tempranamente por el sombreado, se encuentran varios asociados a vías biosintéticas de diversas fitohormonas, entre las que se destacan las auxinas, los brasinosteroides y las giberelinas (GAs), sugiriendo que estas hormonas juegan algún rol en determinar la arquitectura final de la planta (Devlin *et al.*, 2003). Estudios recientes sugieren una convergencia entre las vías de señalización de las GAs y del phyB que regularía las respuestas de crecimiento, en particular, la elongación del hipocotilo y la expansión del pecíolo foliar. La familia de proteínas DELLA son represoras del crecimiento y constituyen el núcleo de acción de la vía de las GAs (Peng *et al.*, 1997; Silverstone *et al.*, 1998). Estos represores están unidos a algunas proteínas PIF (del inglés *phytochrome interacting protein*), como PIF3 y PIF4 (de Lucas *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008). La interacción física entre las DELLA-PIF bloquea la transcripción de genes involucrados en la promoción del crecimiento mediado por PIF (Figura 1). Cuando alguna señal ambiental como una reducción en la relación R:RL, gatilla la síntesis de GAs, la hormona se une a su receptor *GID1* (del inglés *gibberellin insensitive dwarf 1*), promoviendo la degradación de las proteínas represoras DELLAs a través de la proteína *SLEEPY1* (*SLY1*), una E3-ligasa con dominio F-Box (Dill & Sun, 2001; McGinnis *et al.*,

2003; Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005; Griffiths *et al.*, 2006). Así, las proteínas PIF3 y PIF4 quedan liberadas para inducir la transcripción de genes involucrados en las respuestas de crecimiento típicas de ambientes enriquecidos en RL (de Lucas *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008).

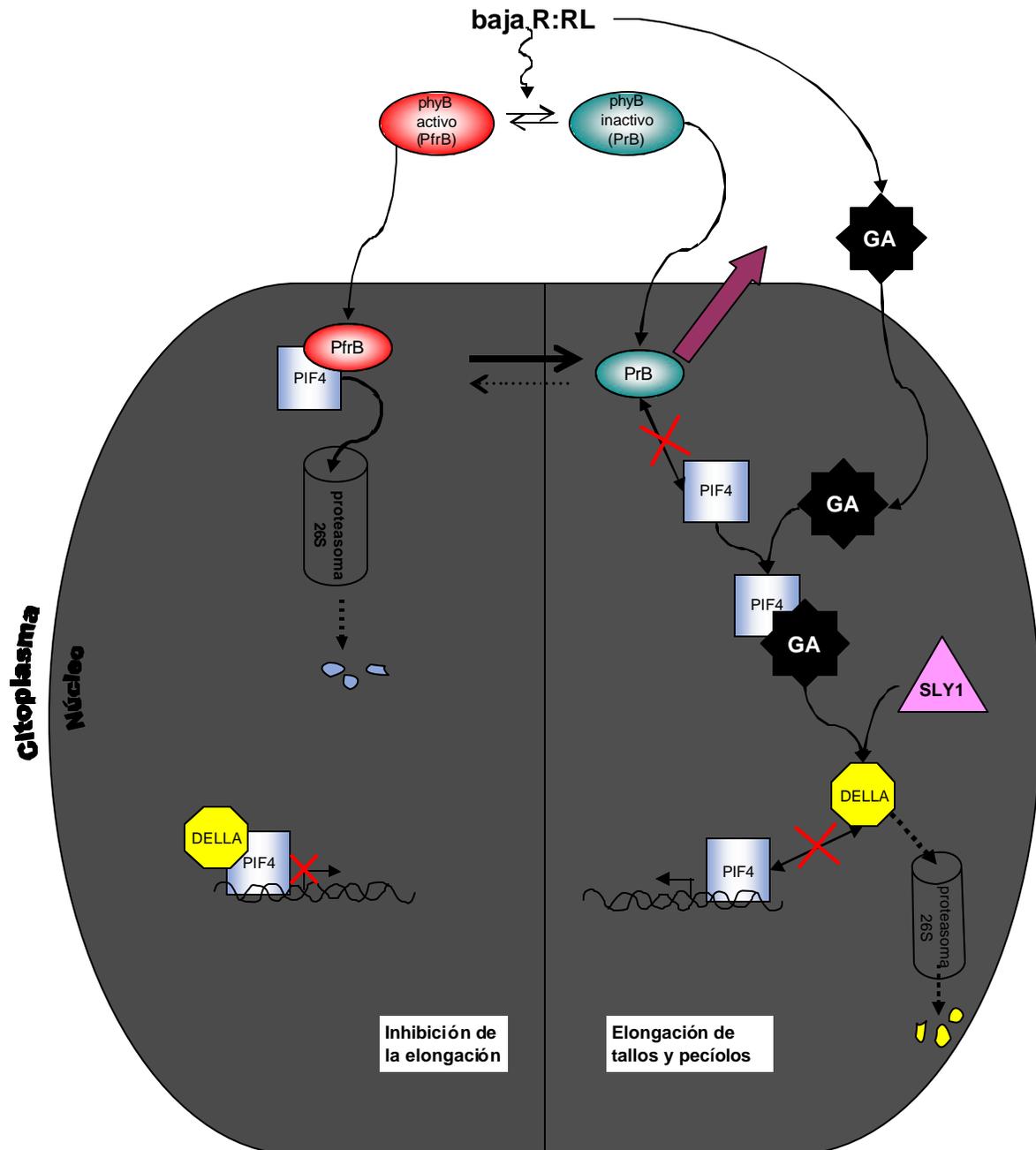


Figura 1: Modelo actualizado del mecanismo molecular que controla la respuesta de elongación de tallos y hojas modulado por la relación R:RL del ambiente.

4. Identificación de una vía rápida de síntesis de auxinas mediada por TAA1

Los mecanismos a través de los cuales las señales de competencia regulan los niveles o la acción de estas hormonas son aún desconocidos. Recientemente, se describió una vía alternativa de síntesis de auxinas dependiente del Trp destinada a suplir los rápidos requerimientos de esta hormona en los sitios que sufrirían alguna modificación morfológica (Tao *et al.*, 2008). El mutante *sav3-2*, deficiente en la enzima TAA1 (del inglés *tryptophan aminotransferase of Arabidopsis*), mostró un hipocotilo corto en condiciones de sombreado y resultó ser un eslabón entre las respuestas SAS con la síntesis de auxinas y etileno (Stepanova *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008).

5. Objetivos de este capítulo

Existe una posibilidad de que el antagonismo entre el SAS y las respuestas inducibles de defensa sea simplemente una consecuencia de la componente morfológica del SAS que demanda recursos y no el resultado de una regulación negativa entre las vías de señalización de ambas respuestas. Para poner a prueba esta hipótesis, usé el mutante *sav3-2* que es insensible a los cambios en la relación R:RL, haciendo que la planta mutante no induzca los cambios morfológicos típicos de SAS aún creciendo en ambientes con baja relación R:RL (Tao *et al.*, 2008). El mutante *sav3-2*, por tener un fenotipo opuesto al del mutante *phyB*, se convirtió en una pieza clave para poner a prueba nuestra hipótesis: si sólo se trataba de un cambio en la asignación de recursos, este mutante al no responder al RL con un SAS no debía cambiar su calidad de tejido, por ende el crecimiento de la oruga debía ser similar en ambientes con niveles contrastantes de RL. Si, en cambio, este compromiso de respuestas requiere de la regulación específica de alguna vía, completamente independiente de TAA1, el crecimiento de la oruga debería ser mayor en plantas del mutante creciendo en ambientes suplementados con RL, de forma similar a lo que sucedía sobre el genotipo salvaje.

A continuación, se muestra la caracterización de respuestas fotomorfogénicas del mutante *sav3-2* con una serie de experimentos en condiciones de competencia simulada. Los experimentos realizados sobre plántulas fueron diseñados para conocer la integridad de las respuestas fotomorfogénicas a las longitudes de onda (A, R y RL) y averiguar si este mutante era capaz de inducir normalmente una HIR. Los experimentos con plantas adultas

perseguían el objetivo de conocer la habilidad del mutante para responder a la reducción de PAR, a la reducción de luz azul, y a pulsos de RL al final del día. En último lugar, realicé el bioensayo con plantas crecidas con niveles contrastantes de RL para evaluar la contribución de la componente morfológica del SAS sobre la calidad forrajera del tejido.

Los Materiales y Métodos empleados en esta sección se describen en detalle en el Capítulo 2.

RESULTADOS

El mutante *sav3-2* es hiposensible al RL, haciéndolo recalcitrante a cambios en la relación R:RL del ambiente

El mutante *sav3-2* fue aislado a partir de líneas mutagenizadas químicamente con EMS (del inglés *ethylmethanesulfonate saturations*) para plántulas que no mostraban un fenotipo de SAS (hipocotilo largo) en condiciones de baja relación R:RL (Tao *et al.*, 2008). El fenotipo de plántulas etioladas, caracterizado por un hipocotilo largo y un aparato fotosintético y cotiledones poco desarrollados, es arrestado por la percepción de la luz induciendo las típicas respuestas fotomorfogénicas que incluyen la inhibición del alargamiento del hipocotilo, la apertura y desarrollo de los cotiledones, y el desarrollo del aparato fotosintético.

Estudios en plántulas etioladas del mutante *sav3-2* revelaron una reducida inhibición del crecimiento del hipocotilo bajo el tratamiento de luz RL continua, la región espectral donde mas eficientemente se activa el phyA (Figura 2 a). Por el contrario, presentó respuestas fotomorfogénicas similares a las del genotipo salvaje para las regiones del R y del A (Figura 2 b y c), que están mediadas en mayor medida por el phyB (Yanovsky *et al.*, 1995) y por los criptocromos (Cashmore *et al.*, 1999), respectivamente. Estos resultados indican que las plántulas del mutante *sav3-2* poseen alterada, de manera específica, su respuesta al RL y su fenotipo no es el resultado de un efecto pleiotrópico de la mutación sobre todas las respuestas de la planta a la luz.

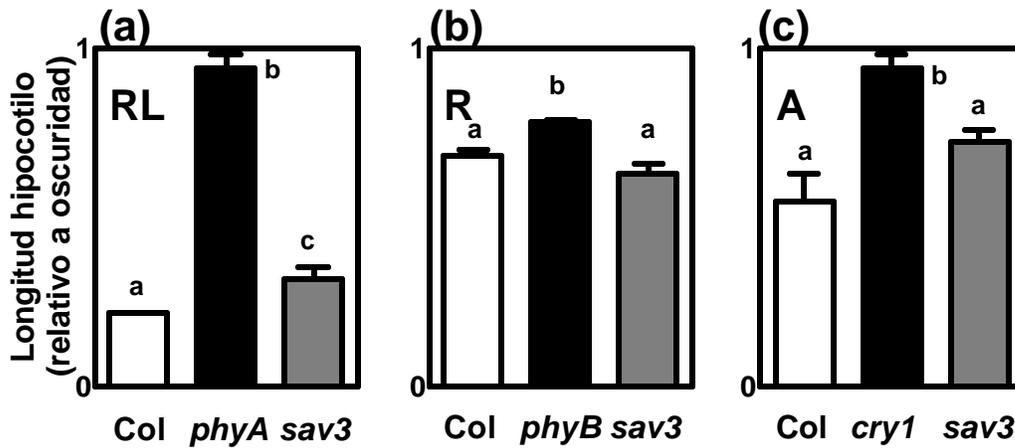


Figura 2: Plántulas etioladas de 4 días de edad bajo diferentes tratamientos con luz monocromática durante 8hs al día. a) Tratamiento con RL, b) con Rojo y c) con Azul. Cada punto representa el promedio \pm ES de al menos 10 réplicas.

Plantas adultas del mutante *sav3-2* no responden a las señales lumínicas de competencia

Plantas de *Arabidopsis*, de 4 semanas de edad, fueron cultivadas bajo plena luz solar y suplementadas o no con RL lateral para simular la presencia de plantas vecinas. Este estímulo adicional disparó las respuestas típicas de SAS, como una disminución de la proporción L/P y un aumento en el ángulo de inserción foliar en el genotipo salvaje (Figura 3 a, b y c). Sin embargo, las plantas del mutante *sav3-2* prácticamente no respondieron al cambio en la relación R:RL del ambiente para ninguno de los parámetros observados (Figura 3). Estos resultados en plantas adultas del mutante *sav3-2* concuerdan con la hiposensibilidad al RL previamente descrita para el estadio de plántula y puede explicar la falta de respuesta de las plantas del estadio adulto. Pero, presumimos que estarían actuando dos fitocromos distintos, el phyA en plántulas etioladas y el phyB en plantas adultas.

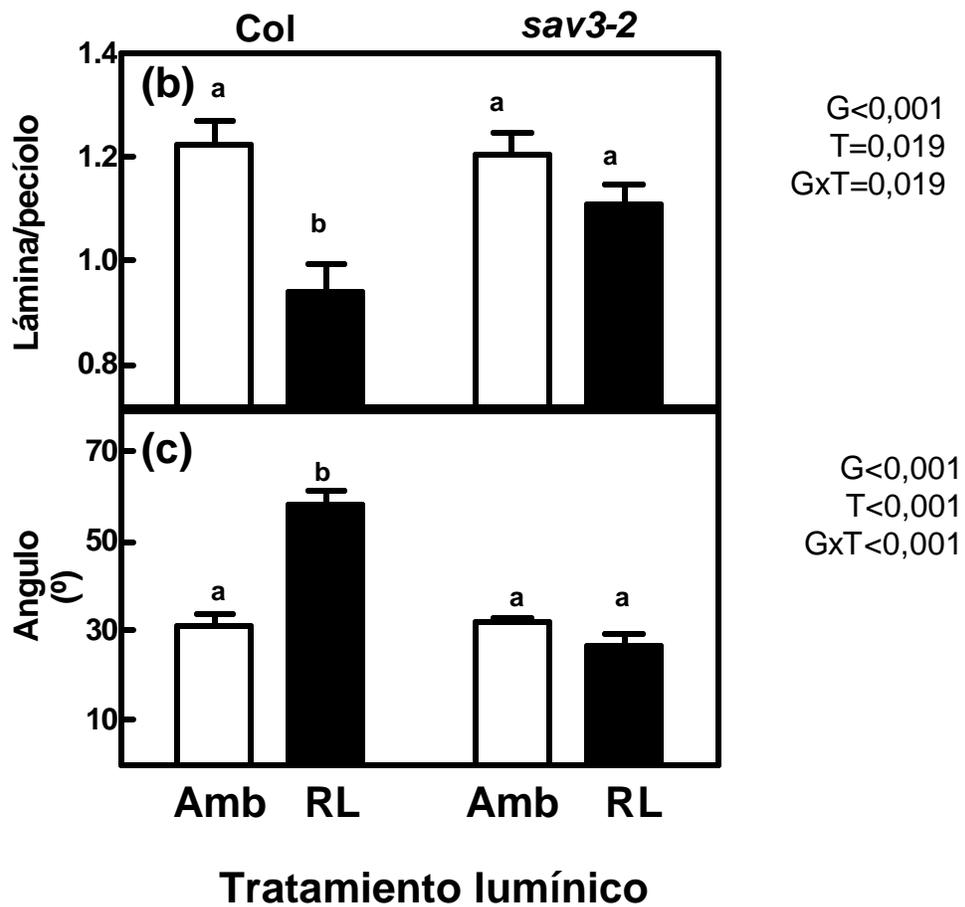
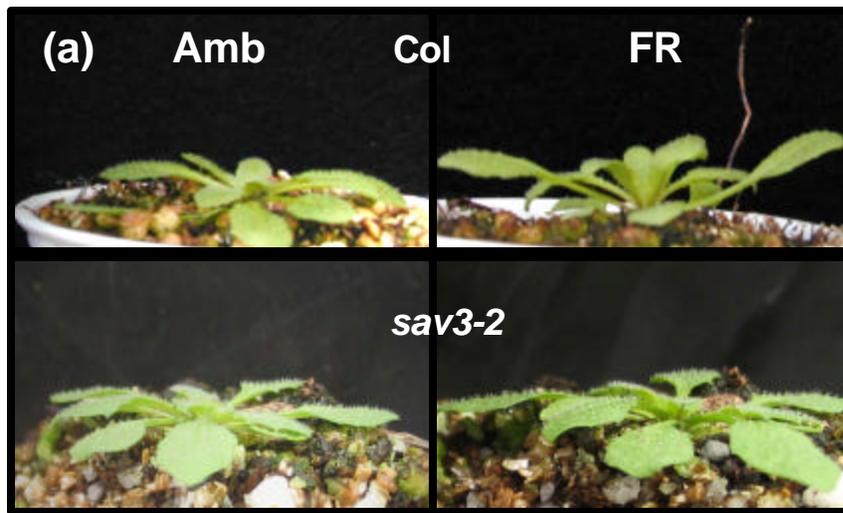


Figura 3: El mutante *sav3-2* es insensible a las señales lumínicas de competencia. a) fenotipo de plantas de los genotipos salvaje y mutante, b y c) respuestas fotomorfológicas típicas en ambos genotipos. Las barras delgadas representan 1 error estándar (n=15) para caso. La significancia estadística de los efectos principales (G=Genotipo, T=tratamiento lumínico) y la interacción (GxT) se indica a la derecha de cada panel. Letras distintas indican diferencias significativas en los casos donde la interacción fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

El mutante *sav3-2* es insensible a pulsos de RL aplicados al final del día

En el experimento anterior, el tratamiento de RL fue aplicado de manera simultánea con la luz blanca. Existe una posibilidad de que esta forma de aplicación del RL pudiera disparar una respuesta fotomorfogénica del tipo HIR, y no una del tipo LFR (del inglés *low fluence response*) como esperaba.

Para corroborar que la respuesta que estaba evaluando en los experimentos era una del tipo LFR diseñé un experimento aplicando pulsos de RL al final del día (EOD, del inglés *end of day*). Estos tratamientos cortos de RL, aseguran el establecimiento de bajos niveles de la forma Pr del fitocromo durante el subsiguiente período de oscuridad, similares a los producidos por una respuesta del tipo LFR (Fankhauser & Casal, 2004). En respuesta al EOD-RL, las plantas del genotipo salvaje aumentaron el ángulo de inserción de sus hojas, una de las respuestas morfológicas típicas del SAS (Figura 4). En cambio, las plantas del mutante *sav3-2* se mostraron imperturbables frente al mismo tratamiento (Figura 4). Este resultado confirma los resultados observados en el apartado anterior y sugiere que el mutante *sav3-2* tiene alteradas la respuesta tipo LFR mediadas por el phyB.

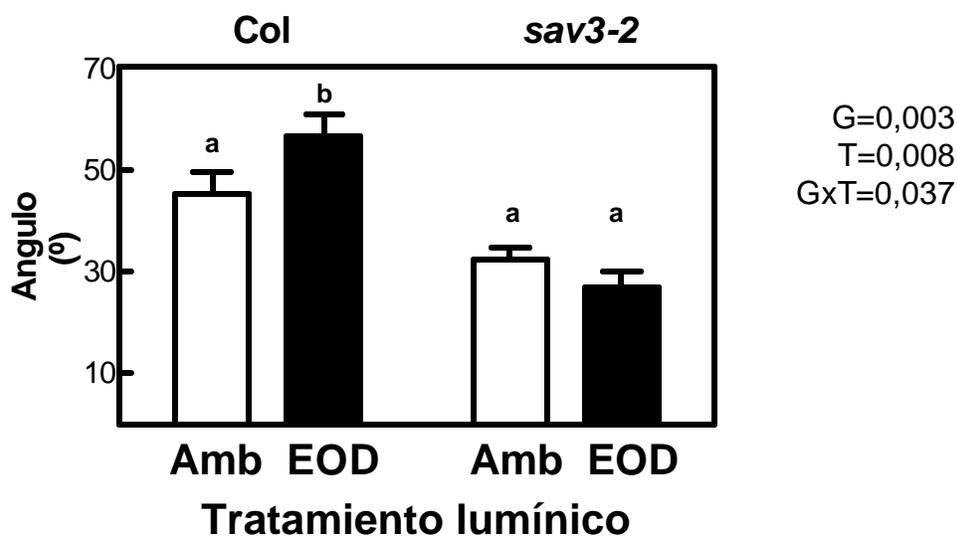


Figura 4: Respuesta en el cambio de ángulo de inserción foliar después de recibir un pulso de RL de 45 minutos EOD durante tres días en plantas del mutante *sav3-2* y el genotipo salvaje. Fueron cultivados con un PAR de luz blanca ($85 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Las barras delgadas representan 1 error estándar ($n=8$). La significancia estadística de los efectos principales (G=Genotipo, T=tratamiento lumínico) y la interacción (GxT) se indica a la derecha de cada panel. Letras distintas indican diferencias significativas en los casos donde la interacción fue estadísticamente significativa ($p<0.05$).

Las respuestas al azul y al sombreado neutro están conservadas en el mutante *sav3-2*

En los estadios avanzados de un canopeo, donde el sombreado mutuo entre plantas vecinas es intenso, las respuestas fotomorfogénicas son controladas en parte por respuestas tipo HIR mediadas por el phyA, pero también por cambios asociados a la radiación azul (respuestas mediadas por los criptocromos) (Ballaré *et al.*, 1991; Kozuka *et al.*, 2005; Christophe *et al.*, 2006) y al “sombreado neutro” caracterizado por una reducción homogénea de la irradiancia presentando un constante fotoequilibrio de las formas del fitocromo (Ballaré *et al.*, 1991).

Para evaluar si el mutante *sav3-2* tiene intactas sus respuestas al azul y al sombreado neutro, diseñé un experimento en cámara de cultivo usando tres condiciones lumínicas: 1) luz blanca 85 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 2) filtro amarillo que remueve específicamente la radiación azul, manteniendo el flujo de fotones final en 85 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 3) 50%: es un sombreado producido por una media sombra que redujo el PAR a 45 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Como había sido descrito previamente, el genotipo salvaje respondió a la eliminación de fotones de luz azul y a la reducción de PAR promoviendo la erección de las hojas de la roseta (Figura 5 a y b). El mutante *sav3-2* respondió de forma similar al genotipo salvaje a los estímulos lumínicos. Este resultado, junto al patrón de respuesta observado en plantas etioladas, permiten concluir que el mutante *sav3-2* tiene una respuesta normal a la radiación azul, y conserva la sensibilidad a cambios producidos en la irradiancia total. Aún mas, este resultado pone de relieve la especificidad de TAA1 en la vía de señalización del phyB en plantas adultas controlando respuestas fotomorfogénicas como la componente morfológica del SAS.

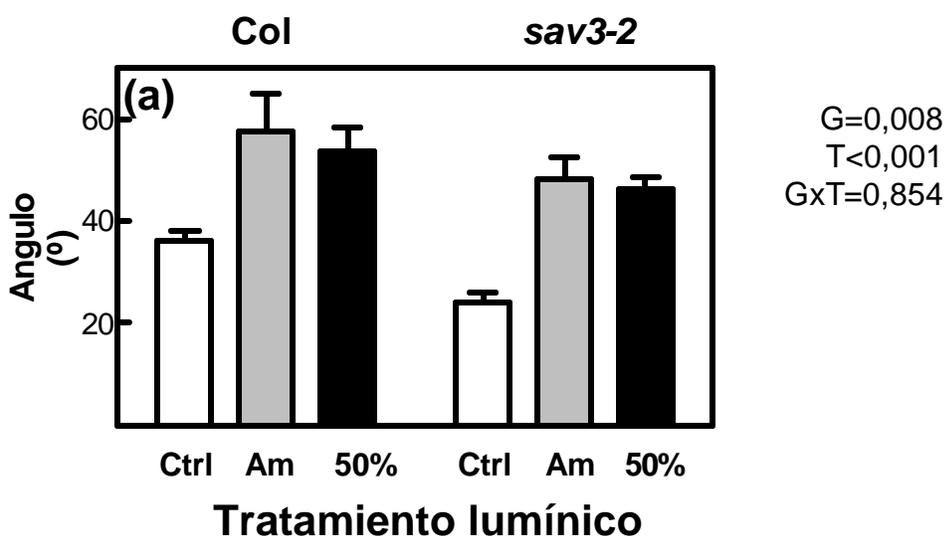


Figura 5: Respuesta del ángulo de inserción foliar del mutante *sav3-2* luego ser inducidos con diferentes tratamientos lumínicos. Ctrl: luz blanca ($85 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$), Am: filtro amarillo que saca casi la totalidad de la luz azul ($85 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y 50%: sombra neutra que reduce la irradiancia a la mitad ($45 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Las barras delgadas representan 1 error estándar ($n=8$) para cada densidad por cada genotipo). La interacción del ANOVA no fue significativo ($p>0.05$).

Bioensayo: el RL mejora la calidad del tejido del mutante *sav3-2*

El resultado del bioensayo mostró un perfil de crecimiento de las larvas de *S. frugiperda* muy parecido para los dos genotipos. El RL suplementario mejora la calidad forrajera del tejido del genotipo salvaje y del mutante *sav3-2* (Figura 6). Aunque este patrón es contrario a lo que esperábamos, resulta de gran importancia desde un punto de vista fisiológico.

Este resultado sugiere que el efecto del RL sobre la calidad de los tejidos no depende de los efectos del RL promoviendo los cambios morfológicos característicos del SAS. En otras palabras, la calidad del tejido no es el resultado de cambios en la asignación de recursos entre dos respuestas que se contraponen, sino que debe involucrar una vía controlada por el RL que afecta la calidad del tejido. Esa vía específica no estaría controlada por el gen TAA1 (Figura 6), pero sí estaría modulada por la forma Pfr del phyB.

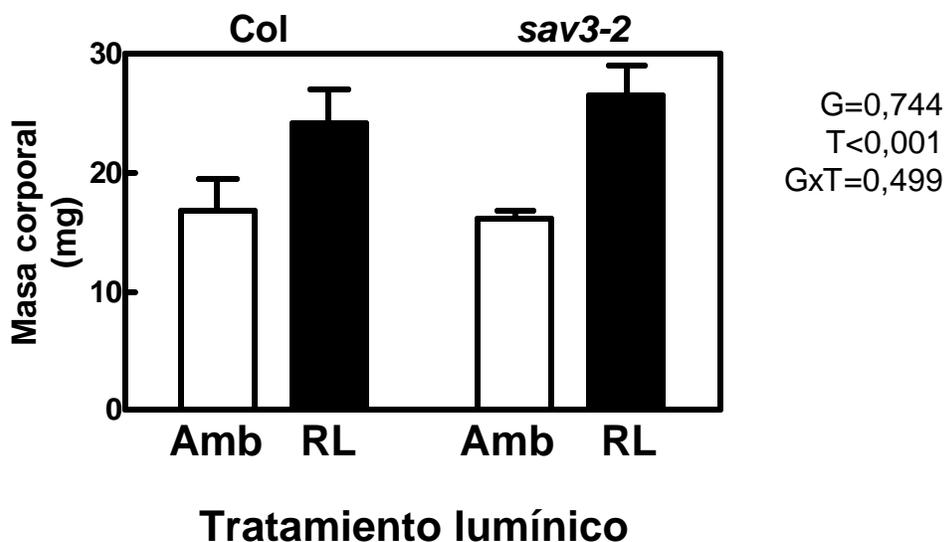


Figura 6: Bioensayo con larvas de *S. frugiperda* alimentándose de plantas del mutante *sav3-2* cultivadas sin o con RL suplementario. Las barras delgadas representan 1 error estándar ($n=15$). La interacción del ANOVA no fue significativa ($p>0.05$).

BIBLIOGRAFIA

- Alabadi, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Mas, P. & Kay, S.A.** (2001) Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. *Science*, **293**, 880-883.
- Ballaré, C.L., Scopel, A.L. & Sanchez, R.A.** (1991) Photocontrol of stem elongation in plant neighbourhoods: effects of photon fluence rate under natural conditions of radiation. *Plant, Cell & Environment*, **14**, 57-65.
- Ballaré, C.L., Scopel, A.L., Radosevich, S.R. & Kendrick, R.E.** (1992) Phytochrome-mediated phototropism in de-etiolated seedlings. *Plant Physiology*, **100**, 170-177.
- Ballaré, C.L. & Scopel, A.L.** (1997) Phytochrome signalling in plant canopies. Testing its population-level consequences using photoreceptor mutants of Arabidopsis. *Functional Ecology*, **11**, 441-450.
- Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.-J. & Liu, D.** (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*, **284**, 760-765.
- Choi, G., Yi, H., Lee, J., Kwon, Y.-K., Soo Soh, M., Shin, B., Luka, Z., Hahn, T.-R. & Song, P.-S.** (1999) Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature*, **401**, 610-613.
- Christophe, A., Mouliat, B. & Varlet-Grancher, C.** (2006) Quantitative contributions of blue light and PAR to the photocontrol of plant morphogenesis in *Trifolium repens* (L.). *Journal of Experimental Botany*, **57**, 2379-2390.
- de Lucas, M., Davière, J.-M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M.A., Titarenko, E. & Prat, S.** (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature*, **451**, 480-484.
- Devlin, P.F., Yanovsky, M.J. & Kay, S.A.** (2003) A genomic analysis of the shade avoidance response in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **133**, 1617-1629.
- Dill, A. & Sun, T.-p.** (2001) Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **159**, 777-785.
- Dorn, L.A., Pyle, E.H. & Schmitt, J.** (2000) Plasticity to light cues and resources in *Arabidopsis thaliana*: testing for adaptive value and costs. *Evolution*, **54**, 1982-1994.
- Fankhauser, C., Yeh, K.-C., Lagarias, C.J., Zhang, H., Elich, T.D. & Chory, J.** (1999) PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in Arabidopsis. *Science*, **284**, 1539-1541.

Fankhauser, C. & Casal, J.J. (2004) Phenotypic characterization of a photomorphogenic mutant. *The Plant Journal*, **39**, 747-760.

Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J.M., Kircher, S., Schäfer, E., Fu, X., Fan, L.-M. & Deng, X.W. (2008) Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature*, **451**, 475-479.

Green, R.M. & Tobin, E.M. (1999) Loss of the circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression. *PNAS*, **96**, 4176-4179.

Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.-L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T.-p. & Thomas, S.G. (2006) Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **18**, 3399-3414.

Jiao, Y., Lau, O.S. & Deng, X.W. (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews Genetics*, **8**, 217- 230.

Kozuka, T., Horiguchi, G., Kim, G.-T., Ohgishi, M., Sakai, T. & Tsukaya, H. (2005) The different growth responses of the *Arabidopsis thaliana* leaf blade and the petiole during shade avoidance are regulated by photoreceptors and sugar. *Plant Cell Physiology*, **46**, 213-223.

Martínez-García, J.F., Huq, E. & Quail, P.H. (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science*, **288**, 859-863.

Mathews, S. & Sharrock, R.A. (1997) Phytochrome gene diversity. *Plant, Cell & Environment*, **20**, 666-671.

McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.-p. & Steber, C.M. (2003) The *Arabidopsis SLEEPY1* gene encodes a putative F-Box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *The Plant Cell*, **15**, 1120-1130.

Ni, M., Tepperman, J.M. & Quail, P.H. (1998) PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell*, **95**, 657-667.

Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P. & Harberd, N.P. (1997) The *Arabidopsis GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses *Genes & Development*, **11**, 3194-3205.

Quail, P.H. (2002) Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **3**, 85-93.

Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N. & Sun, T.-p. (1998) The Arabidopsis *RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *The Plant Cell*, **10**, 155-170.

Stepanova, A.N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L.M., Xie, D.-Y., Doležal, K., Schlereth, A., Jürgens, G. & Alonso, J.M. (2008) TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell*, **133**, 177-191.

Tao, Y., Ferrer, J.-L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J.A., Li, L., Moreno, J.E., Bowman, M.E., Ivans, L.J., Cheng, Y., Lim, J., Zhao, Y., Ballaré, C.L., Sandberg, G., Noel, J.P. & Chory, J. (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, **133**, 164-176.

Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.-y., Hsing, Y.-i.C., Kitano, H., Yamaguchi, I. & Matsuoka, M. (2005) *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, **437**, 693-698.

Wang, Z.-Y. & Tobin, E.M. (1998) Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell*, **93**, 1207-1217.

Wang, Z.Y., Kenigsbuch, D., Sun, L., Harel, E., Ong, M.S. & Tobin, E.M. (1997) A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an Arabidopsis *Lhcb* gene. *The Plant Cell*, **9**, 491-507.

Yanovsky, M.J., Casal, J.J. & Whitelam, G.C. (1995) Phytochrome A, phytochrome B and HY4 are involved in hypocotyl growth responses to natural radiation in Arabidopsis: weak de-etiolation of the phyA mutant under dense canopies. *Plant, Cell & Environment*, **18**, 788-794.

capítulo

6

desensibilización contra el JA

el efecto del RL es selectivo

CAPITULO 6

INTRODUCCION

1. Mecanismos de regulación de la función génica

Aunque muchos esfuerzos están concentrados en conocer los distintos mecanismos de regulación de la función génica, la acumulación del transcripto de ARNm continúa siendo el de más fácil medición y el que ha permitido explicar bastante bien diversas respuestas celulares al ambiente.

La vía del JA es un buen ejemplo de las complejas regulaciones que pueden sufrir los miembros de una cascada de señalización. ERF1 y MYC2, además de regularse en forma cruzada controlando ramas diferentes de la cascada, están sujetos al control de numerosos factores ambientales (Figura 1).

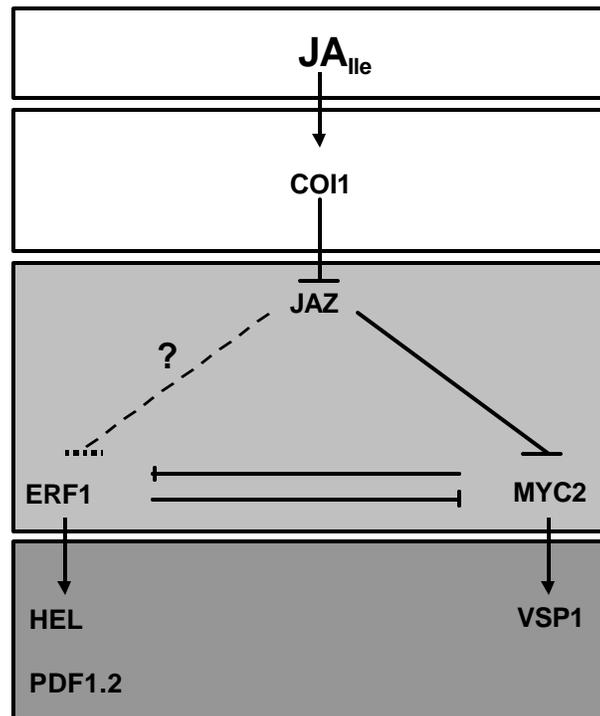


Figura 1: Esquema de la vía de señalización del JA (adaptado de Lorenzo & Solano, 2005).

ERF1 es la conexión molecular entre las vías del JA y del ET en la activación de las defensas. La expresión de *ERF1* es inducida por hongos necrotróficos y su respuesta

depende de la acción simultánea del ET y JA (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002; Lorenzo *et al.*, 2003; Berrocal-Lobo & Molina, 2004). De hecho, la expresión de *ERF1* estuvo bloqueada en mutantes insensibles al JA o al ET como *coi1* y *ein2*, respectivamente (Lorenzo *et al.*, 2003).

MYC2 es un elemento sumamente interesante porque se ha demostrado que participa en las respuestas al JA, al ABA y a la luz azul y porque el control de su expresión es particularmente compleja. Inicialmente, MYC2 fue involucrado en respuestas al JA (Berger *et al.*, 1996) y seguidamente en respuesta a sequía y al ácido abscísico (ABA) (Abe *et al.*, 1997). Pero en una búsqueda de mutantes insensibles al JA se aisló *jin1*, alelo de *myc2*, porque la elongación de su raíz no era inhibida por el agregado de MeJA (Lorenzo *et al.*, 2004). Paralelamente, se confirmó que la expresión de *MYC2* se regula negativamente con la de *ERF1* (Anderson *et al.*, 2004). Además, se sabe que MYC2 es un regulador negativo de la vía de señalización de la luz azul controlada por el criptocromo (Yadav *et al.*, 2005), y en un estudio con dobles mutantes se ha propuesto que MYC2 actúa sinérgicamente con COP1 y SPA1 (del inglés *supressor of phytochrome A 1*) en la represión de la fotomorfogénesis en plántulas etioladas (Ganagppa & Chattopadhyay, 2007). Recientemente, se demostró que MYC2 actúa como factor de transcripción de los genes *JAZ*, sus propios represores de la transcripción (Chini *et al.*, 2007). De esta manera se crea un ciclo negativo o “loop” que podría explicar la respuesta a “pulsos” al JA que tienen las plantas. A partir de un estudio *in silico*, se propuso que la expresión de *MYC2* también estaría controlada por un microRNA que una vez procesado podría unirse al ARNm de *MYC2* dificultando su traducción, pero a la vez disminuyendo la cantidad del factor de transcripción MYC2 que es necesario para la transcripción del microRNA (Megraw *et al.*, 2006).

El descubrimiento del “eslabón perdido” de la vía del JA fue la descripción de las proteínas *JAZ* (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007). Estas proteínas reprimen la transcripción de genes tempranos de respuesta al JA, como la del factor de transcripción MYC2. Este factor de transcripción, a su vez, controla la transcripción de los genes *JAZ* cerrando un ciclo que determina que la respuesta al JA sea controlada. Como en el genoma de *Arabidopsis* existen 12 miembros de la familia *JAZ* (Katsir *et al.*, 2008), se

especula con que alguna de estas proteínas JAZ pueda reprimir específicamente la expresión de *ERF1* (Figura 1).

2. Objetivos del capítulo

Como el RL reflejado por plantas cercanas disminuye la sensibilidad al JA (Capítulo 4), quisimos conocer cuáles eran los elementos de la cascada de transducción del JA que explicaban esa respuesta. El RL podría estar regulando negativamente la transcripción de reguladores positivos de la cascada de transducción del JA (Figura 1), o bien, induciendo la transcripción de algunos represores JAZ.

Los Materiales y Métodos empleados en esta sección se describen en detalle en el Capítulo 2.

RESULTADOS

Bifurcación de la vía: caminos con respuestas diferentes al RL y a la falta de phyB

La vía del JA, río abajo de las proteínas JAZ, se divide en dos ramas: una controlada por *ERF1* (del inglés *ethylene responsive factor 1*), un elemento de respuesta al ET, y la otra controlada por *MYC2* (= *jin1*, del inglés *jasmonate insensitive1*) que ha sido involucrada en respuestas a la luz azul y al ABA (Abe *et al.*, 1997; Yadav *et al.*, 2005). Existen evidencias de que estos dos elementos de la vía podrían ser antagonistas. Y se ha demostrado que la activación de *ERF1* con JA y ET inhibe a *MYC2*, mientras que el tratamiento con JA inhibe a *ERF1* a través de *MYC2* (Lorenzo *et al.*, 2004).

En base a los datos de expresión de los genes controlados por *ERF1* (Lorenzo *et al.*, 2003), como *HEL* (Capítulo 4, Figura 2) y *PDF1.2* (Figura 2 y Tabla I), especulaba con que la expresión de *ERF1* también estuviera inhibida en ambientes suplementados con RL. De forma coincidente con estudios previos, el tratamiento con MeJA indujo en una manera dosis dependiente la acumulación del transcripto *ERF1* (Figura 2) (Lorenzo *et al.*, 2003). En cambio, la expresión de *ERF1* permaneció inalterada cuando el MeJA se aplicó sobre plantas cultivadas en ambientes con RL suplementario (Figura 2). Por su parte, el gen *MYC2* fue claramente inducido por la aplicación de MeJA, pero, contrariamente a *ERF1*, el RL no logró inhibir esa inducción (Figura 2). Este patrón se repite para el gen *VSP1* que se

encuentra río abajo de *MYC2* en la cascada (Figura 2). Estos resultados señalan que una de las ramas de la vía del JA, la rama controlada por *ERF1*, es atenuada por el RL mientras que la rama de *MYC2* permanece inalterada.

En el mismo sentido, los genes *ERF1* y *HEL* no fueron inducidos en plantas del mutante *phyB* rociadas con MeJA exógeno (Figura 3 y Tabla II). Tampoco se indujeron *MYC2* y *VSP1* por el tratamiento con MeJA luego de 3h de la inducción (Figura 3 b). Este resultado ratifica los resultados observados en el genotipo salvaje, y sugiere la existencia de algún elemento interno o externo de la vía del JA, que de manera dependiente del Pfr del phyB, controla selectivamente la rama de *ERF1*.

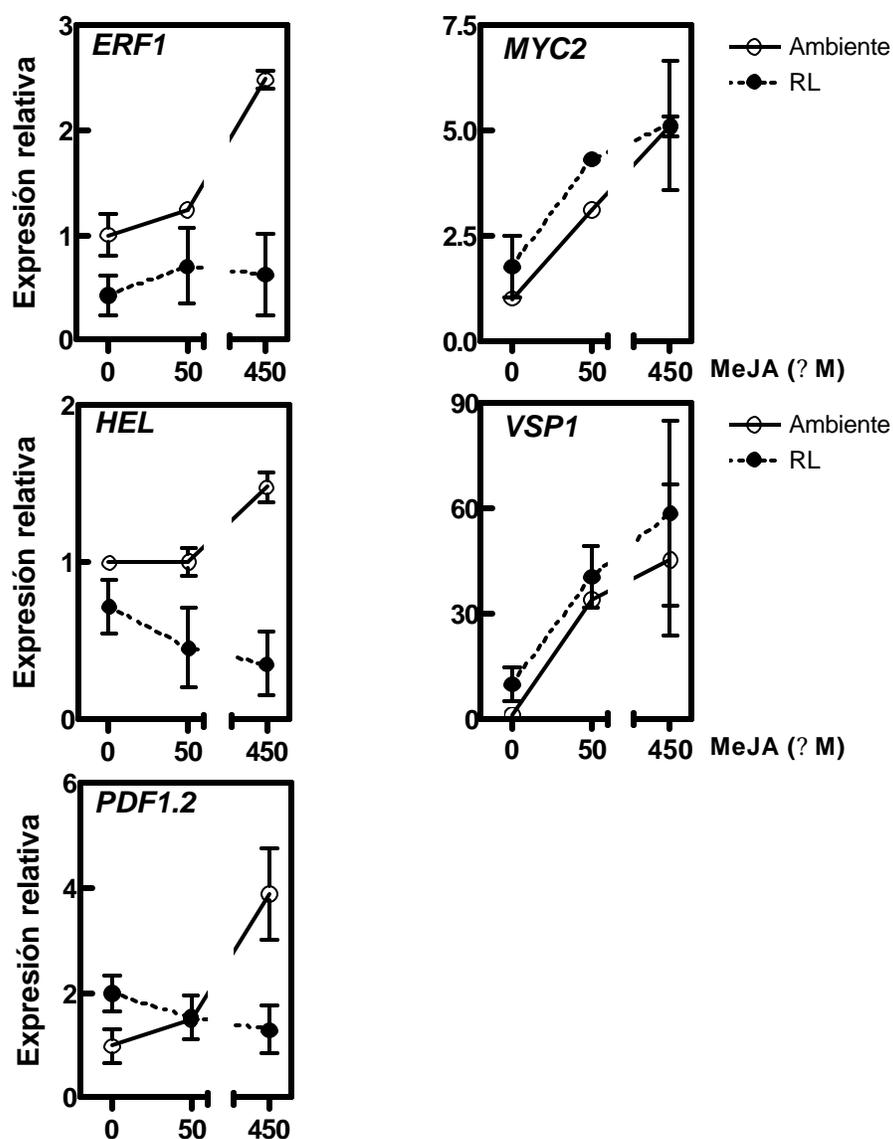


Figura 2: Perfil de expresión para *ERF1*, *HEL*, *PDF1.2*, *MYC2* y *VSP1* en respuesta al RL y al MeJA en el genotipo salvaje.

Gen	RL	MeJA	RLxMeJA
<i>ERF1</i>	0,005	0,019	0,047
<i>HEL</i>	<0,001	0,663	0,047
<i>PDF1.2</i>	0,693	0,327	0,013
<i>MYC2</i>	0,449	<0,001	0,701
<i>VSP1</i>	0,125	<0,001	0,240

Tabla I: Resumen estadístico para el efecto del RL y MeJA sobre la expresión de *ERF1*, *HEL*, *PDF1.2*, *MYC2* y *VSP1* en el genotipo salvaje. Cuando el $p < 0.05$ las diferencias fueron consideradas significativas y marcadas en negrita.

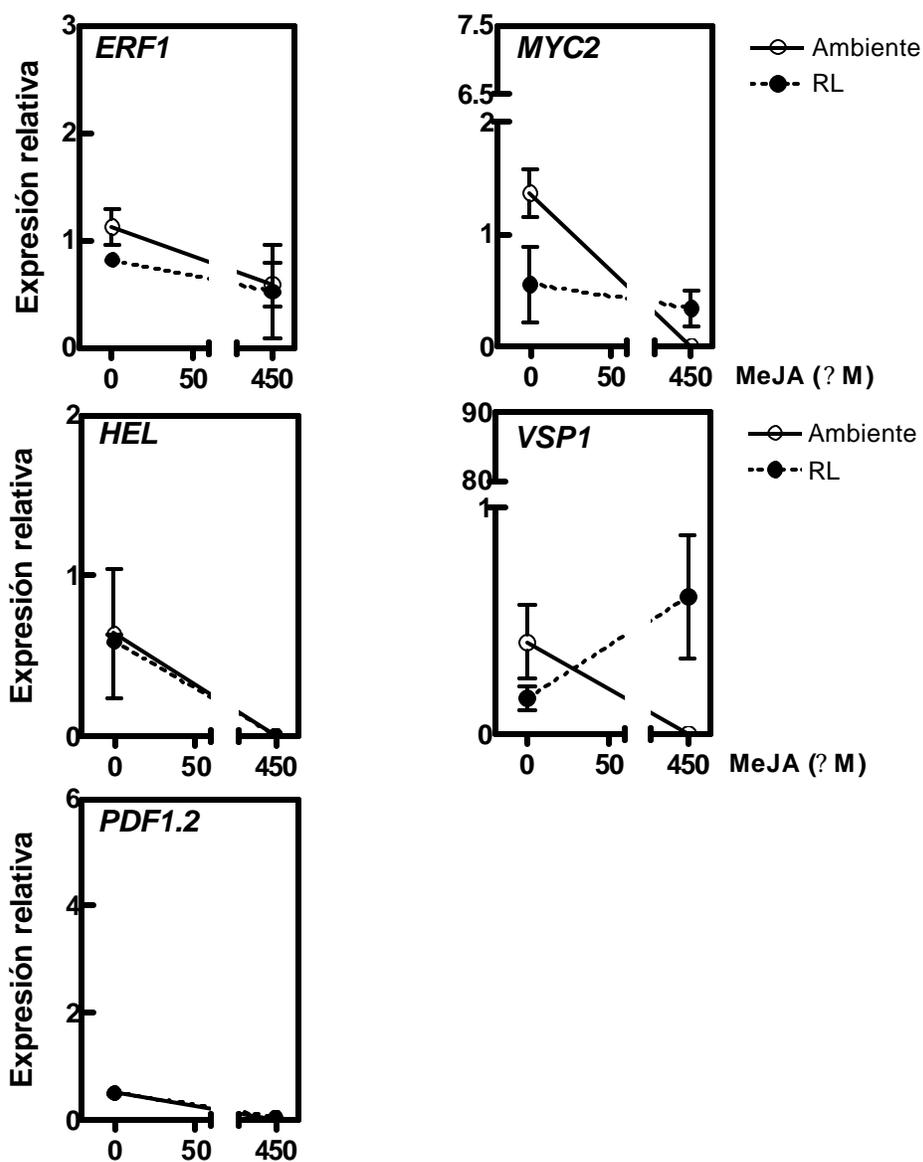


Figura 3: Perfil de expresión para *ERF1*, *HEL*, *PDF1.2*, *MYC2* y *VSP1* en respuesta al RL y al MeJA en el mutante *phyB*.

Gen	RL	MeJA	RLxMeJA
<i>ERF1</i>	0,493	0,234	0,819
<i>HEL</i>	0,391	0,002	0,503
<i>PDF1.2</i>	0,003	<0,001	0,003
<i>MYC2</i>	0,013	0,004	0,005
<i>VSP1</i>	0,327	0,900	0,057

Tabla II: Resumen estadístico para el efecto del RL y MeJA sobre la expresión de *ERF1*, *HEL*, *PDF1.2*, *MYC2* y *VSP1* en el mutante *phyB*. Cuando el $p < 0.05$ las diferencias fueron consideradas significativas y marcadas en negrita.

La expresión de *COI1* no cambia en ambientes suplementados con RL, ni en el mutante *phyB*

COI1 activa la vía del JA a través de la ubiquitinación de las proteínas represoras JAZ (Capítulo 4). Como *COI1* es un componente común de las dos ramas y el efecto del RL sólo se observó en la rama controlada por *ERF1*, no esperábamos que el RL module la expresión de *COI1*.

Pudimos observar que la transcripción de *COI1* no responde al tratamiento con MeJA (Xie *et al.*, 1998), y que no hay un efecto significativo del RL (Figura 4 y Tabla III), confirmando nuestro razonamiento. En el mutante *phyB*, *COI1* respondió de forma ligeramente negativa al agregado de MeJA (figura 4 y Tabla III).

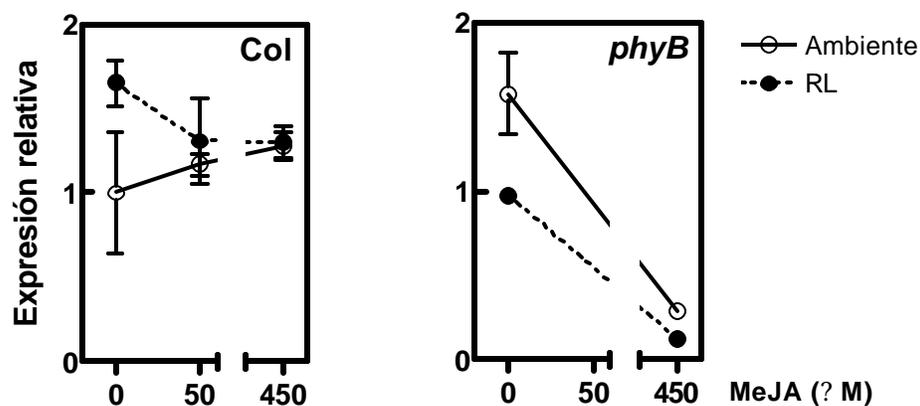


Figura 4: Acumulación relativa de los transcritos de los genes *COI1* en el genotipo salvaje y en el mutante *phyB*.

Genotipo	RL	MeJA	RLxMeJA
Col	0,246	0,810	0,309
<i>phyB</i>	0,089	0,006	0,255

Tabla III: Resumen estadístico para el efecto del RL y MeJA sobre la expresión de *COII* en los genotipos salvaje Col y mutante *phyB*. Cuando el $p < 0.05$ las diferencias fueron consideradas significativas y marcadas en negrita.

Algunos genes *JAZ* responden con una mayor inducción al agregado de MeJA en ambientes suplementados con RL

Las proteínas JAZ1 y JAZ3 actúan como represoras de la transcripción de *MYC2*. Si algunos de los miembros de esa familia, que en *Arabidopsis* tiene 12 miembros, reprimiera la transcripción de *ERF1* y simultáneamente fuera inducido por el RL, entonces los ambientes enriquecidos en esa radiación podrían producir una insensibilidad al JA a través de la vía controlada por *ERF1*. Esto se debería a que, aún en presencia de MeJA exógeno, la elevada transcripción de esos genes *JAZ* determinaría que siempre haya moléculas de *JAZ* reprimiendo a *ERF1* debido a una competencia desbalanceada en esa dirección.

Gen	RL	MeJA	RLxMeJA	Gen	RL	MeJA	RLxMeJA
<i>JAZ1</i>	0370	<0,001	0,788	<i>JAZ7</i>	<0,001	<0,001	0,045
<i>JAZ2</i>	0,449	<0,001	0,887	<i>JAZ8</i>	<0,001	<0,001	0,088
<i>JAZ3</i>	0,863	<0,001	0,368	<i>JAZ9</i>	0,022	<0,001	0,561
<i>JAZ4</i>	0,186	<0,001	0,020	<i>JAZ10</i>	0,002	<0,001	0,089
<i>JAZ5</i>	0,112	<0,001	0,942	<i>JAZ11</i>	0,735	0,138	0,777
<i>JAZ6</i>	0,320	0,029	0,633	<i>JAZ12</i>	0,906	0,016	0,637

Tabla IV: Resumen estadístico para el efecto del RL y MeJA sobre la expresión de los genes *JAZ* en el genotipo salvaje. Cuando el $p < 0.05$ las diferencias fueron consideradas significativas y marcadas en negrita.

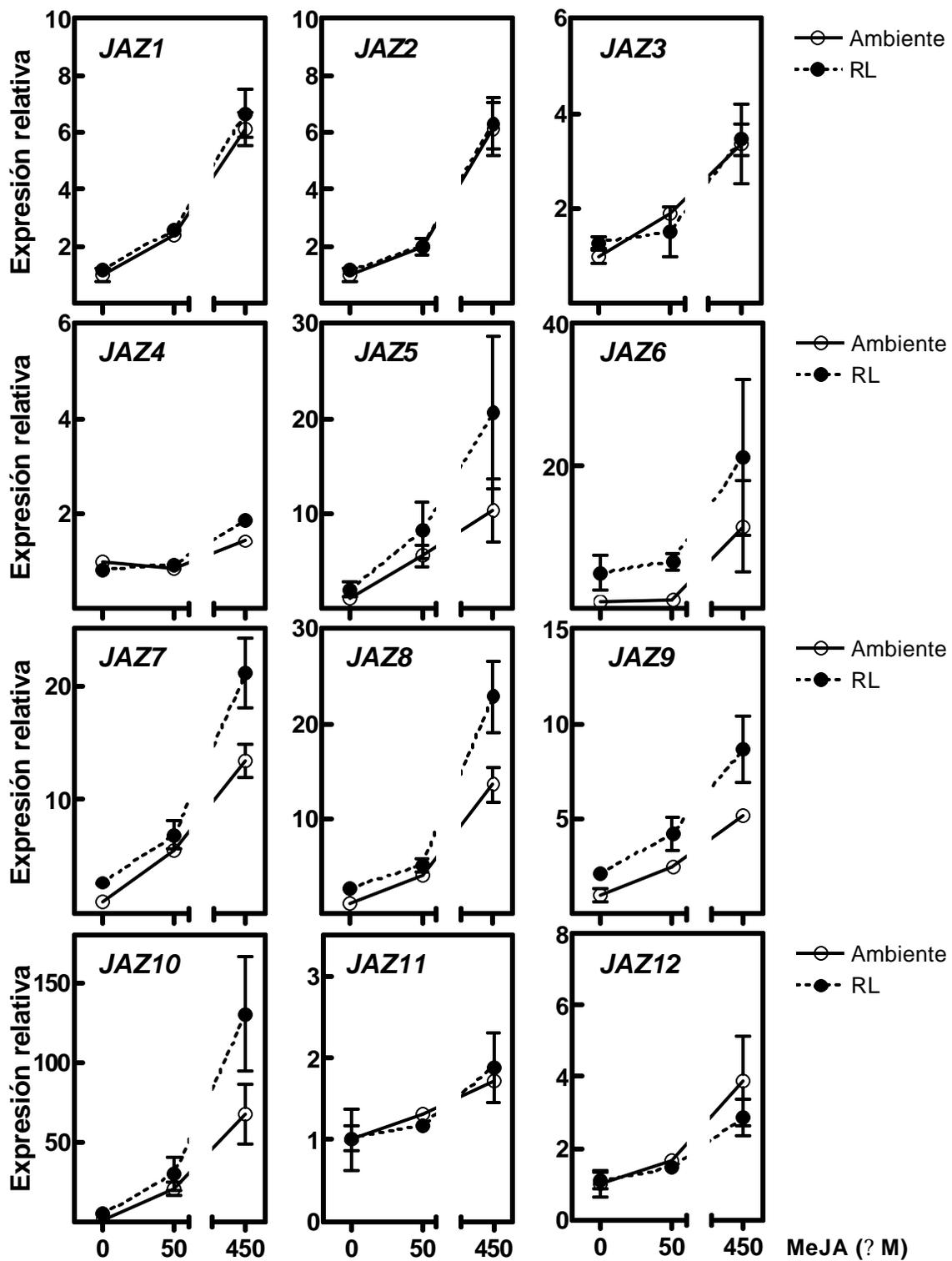


Figura 5: Acumulación relativa de los transcritos de los genes *JAZ 1-12* en el genotipo salvaje.

Es interesante notar que el RL tuvo un efecto pequeño, pero significativo, incrementando la transcripción de los genes *JAZ7*, *JAZ8*, *JAZ9* y *JAZ10*, y la respuesta de *JAZ4* a la estimulación por MeJA (Figura 5 y Tabla IV).

Por el contrario, en el mutante *phyB* la transcripción de todos los genes JAZ respondió de manera inversa a la observada en el genotipo salvaje luego de agregado el MeJA. Los niveles de transcripción fueron menores en respuesta al tratamiento con MeJA en ambientes suplementados con RL (Figura 6 y Tabla V). Este resultado podría ser consecuencia de la ausencia de un PHYB funcional, que como ha sido descrito en otras ocasiones, cuando el PHYA domina el escenario en plantas adultas, ya sea por mutaciones inactivantes del PHYB (Devlin *et al.*, 2003) o sobre-expresión del phyA (Robson *et al.*, 1996), elimina el fenotipo de SAS causando el “enanismo de proximidad-condicional” en el que las plantas se elongan menos aún creciendo en canopeos densos, mostrándose recalcitrantes a cambios en la relación R:RL (McCormac *et al.*, 1991; McCormac *et al.*, 1992; Robson *et al.*, 1996). El rol dominante del phyA sobre el phyB, en ciertos escenarios, tiene su correlato molecular. Casi el 70% de los genes que responden tempranamente a una baja relación R:RL, y que estarían controlados en gran medida por el phyB, fueron atenuados en tiempos de exposición mas prolongados donde la acción del phyA comienza a notarse (Devlin *et al.*, 2003).

Tomando conjuntamente todos estos datos, puedo concluir que la disminución de la forma Pfr del fitocromo B, gatillada por una baja relación R:RL, regula positivamente la expresión de algunos represores JAZ y negativamente la rama controlada por *ERF1*. La atenuación selectiva de esta vía por el RL podría explicar la mejor calidad forrajera del tejido para los insectos herbívoros.

Gen	RL	MeJA	RLxMeJA	Gen	RL	MeJA	RLxMeJA
<i>JAZ1</i>	<0,001	<0,001	0,258	<i>JAZ7</i>	0,013	<0,001	0,410
<i>JAZ2</i>	0,007	<0,001	0,992	<i>JAZ8</i>	0,150	<0,001	0,366
<i>JAZ3</i>	0,017	<0,001	0,847	<i>JAZ9</i>	0,035	0,002	0,679
<i>JAZ4</i>	<0,001	<0,001	0,108	<i>JAZ10</i>	0,033	<0,001	0,508
<i>JAZ5</i>	0,016	<0,001	0,184	<i>JAZ11</i>	0,010	0,006	0,074
<i>JAZ6</i>	0,140	0,028	0,460	<i>JAZ12</i>	0,068	0,016	0,068

Tabla V. Resumen estadístico para el efecto del RL y MeJA sobre la expresión de los genes *JAZ* en el mutante *phyB*. Cuando el $p < 0.05$ las diferencias fueron consideradas significativas y marcadas en negrita.

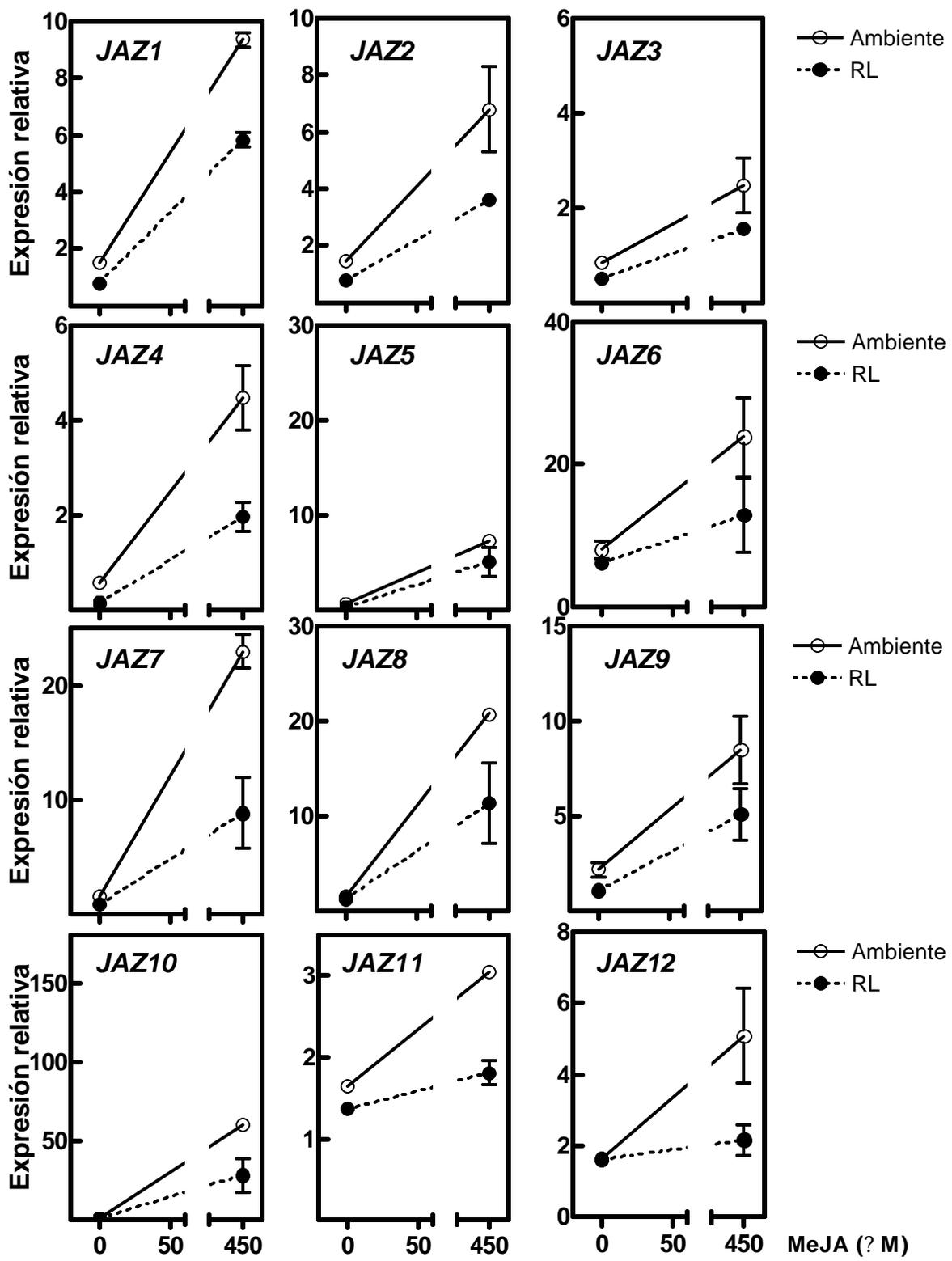


Figura 6 Acumulación relativa de los transcritos de los genes *JAZ* en el mutante *phyB*.

Análisis *in silico* de los elementos regulatorios en *cis* del promotor de *ERF1*

El análisis *in silico* estuvo orientado a encontrar elementos de respuesta a la luz en la región promotora de los genes que mostraron algún grado de control por RL, entre los que se encuentran *ERF1*, *JAZ7*, *8*, *9* y *10* (Tabla I y V).

Como era de esperar, todos los genes poseen algún tipo de elemento de respuesta a la luz o LRE (del inglés *light responsive element*) entre los que se encuentran las G-box y secuencias GATA por ser elementos relativamente cortos y abundantes en el genoma (Tabla VI). Todos estos genes también presentaron uno o varios elementos de unión para MYC2.

Entre los genes JAZ, sólo el promotor de *JAZ8* posee un sitio de unión para ATHB-2. *ATHB-2* es uno de los pocos genes descritos como blanco del fitocromo al inicio de una respuesta de escape al sombreado (Jiao *et al.*, 2007). *ATHB-2* codifica para un factor de transcripción de la familia de las HOMEBOX y es rápidamente inducida en respuesta a una baja proporción R:RL (Steindler *et al.*, 1999; Franklin *et al.*, 2003) promoviendo el SAS a través de la represión de la expresión génica (Steindler *et al.*, 1999). En una primer mirada, este resultado resulta contrario a lo que esperaba dado que su expresión aparece estimulada por RL. Sin embargo, se sabe que la función final de estos elementos regulatorios en *cis* esta condicionada por la presencia y la ubicación relativa de otros elementos formando complejos promotores de respuesta, como sucede para el ácido abscísico (ABA) con el denominado ABRC (del inglés *ABA response promoter complex*). Especulo con que la presencia de este sitio de unión para ATHB-2 junto a otras secuencias regulatorias condicione la expresión de *JAZ8* en la dirección observada.

Lo que resulta sumamente interesante, es que el promotor de *ERF1*, y no el de *MYC2*, posee un sitio de unión a ATHB-2. Si ATHB-2 reprime la transcripción de *ERF1*, esto es consistente con nuestra observación de menores niveles de expresión de *ERF1* en ambientes enriquecidos en RL que, en última instancia, desensibiliza los tejidos contra el JA.

ERF1

At3g23240.1

Chr-3:8295650-8292708

BS Name	BS Genome Start	BS Genome End	Binding Site Sequence	Binding Site Family/TF
EIL1 BS in ERF1	8294510	8294552	ttcaaggggaca	EIL
EIL2 BS in ERF1	8294510	8294552	ttcaaggggaca	EIL
EIL3 BS in ERF1	8294510	8294552	ttcaaggggaca	EIL
EIN3 BS in ERF1	8294507	8294555	ggattcaagggg	EIL
AtMYC2 BS in RD22	8294410	8294415	cacatg	BHLH
AtMYC2 BS in RD22	8295230	8295235	cacatg	BHLH
AtMYC2 BS in RD22	8293876	8293881	cacatg	BHLH
Bellringer/replumless/pennywise BS1 II	8293087	8293094	aaataaa	Homeobox
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in F	8294284	8294289	actcat	bZIP
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in F	8295618	8295623	actcat	bZIP
W-box promoter motif	8293385	8293390	ttgact	WRKY
W-box promoter motif	8294877	8294882	ttgact	WRKY
W-box promoter motif	8293337	8293342	ttgact	WRKY
ARF1 binding site motif	8295572	8295577	ttgtct	ARF
ATHB2 binding site motif	8294589	8294597	taataatta	HB
DPBF1&2 binding site motif	8293785	8293791	acacgtg	bZIP
MYB4 binding site motif	8292793	8292799	aactacc	MYB
MYB4 binding site motif	8295257	8295263	acctaac	MYB
RAV1-A binding site motif	8292825	8292829	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	8293939	8293943	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	8294089	8294093	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	8294543	8294547	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	8295489	8295493	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	8294678	8294682	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	8294497	8294501	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	8294192	8294196	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	8293179	8293183	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	8293003	8293007	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	8292998	8293002	caaca	ABI3VP1
LFY consensus binding site motif	8293464	8293469	ccactg	LFY
ABRE-like binding site motif	8293675	8293682	tacgtgta	...
ARF binding site motif	8295572	8295577	ttgtct	...
BoxII promoter motif	8295113	8295118	ggttaa	...
BoxII promoter motif	8294554	8294559	ggttaa	...
DRE-like promoter motif	8292819	8292827	ggccgacaa	...
EveningElement promoter motif	8294108	8294116	aaaatatct	...
GATA promoter motif [LRE]	8292762	8292767	tgataa	...
GATA promoter motif [LRE]	8292771	8292776	agatag	...
GATA promoter motif [LRE]	8293061	8293066	agatag	...
GATA promoter motif [LRE]	8294130	8294135	agatag	...
GATA promoter motif [LRE]	8294352	8294357	agataa	...
GATA promoter motif [LRE]	8294451	8294456	agataa	...
GATA promoter motif [LRE]	8294961	8294966	tgataa	...
GATA promoter motif [LRE]	8295238	8295243	tgataa	...
GATA promoter motif [LRE]	8294969	8294974	tgataa	...
GATA promoter motif [LRE]	8294860	8294865	agataa	...
GATA promoter motif [LRE]	8294463	8294468	agataa	...
GATA promoter motif [LRE]	8292889	8292894	tgataa	...
G-box promoter motif [LRE]	8293786	8293791	cacgtg	...
G-box promoter motif [LRE]	8293785	8293790	cacgtg	...
lbox promoter motif	8294968	8294973	gataag	...
lbox promoter motif	8292888	8292893	gataag	...
L1-box promoter motif	8293993	8294000	taaatgta	...
T-box promoter motif	8293361	8293366	actttg	...
T-box promoter motif	8293778	8293783	actttg	...
T-box promoter motif	8295057	8295062	actttg	...
SORLIP2	8292818	8292822	ggcc	...
SORLIP2	8292874	8292878	ggcc	...
SORLIP2	8292874	8292878	ggcc	...

BS Name	BS Genome Start	BS Genome End	Binding Site Sequence	Binding Site Family/TF
AtMYC2 BS in RD22	10594113	10594118	cacatg	BHLH
Bellringer/replumless/pennywise BS1 II	10595584	10595591	aaattaaa	Homeobox
Bellringer/replumless/pennywise BS2 II	10594348	10594355	aaattagt	Homeobox
Bellringer/replumless/pennywise BS3 II	10594347	10594354	actaattt	Homeobox
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in	10595672	10595677	actcat	bZIP
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in	10595256	10595261	actcat	bZIP
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in	10594333	10594338	actcat	bZIP
W-box promoter motif	10595664	10595669	ttgact	WRKY
W-box promoter motif	10596253	10596258	ttgacc	WRKY
CArG promoter motif	10594578	10594587	ccatatttgg	MADS
CArG promoter motif	10594577	10594586	ccaaatatgg	MADS
ARF1 binding site motif	10596356	10596361	tgtctc	ARF
ATHB2 binding site motif	10594483	10594491	taataatta	HB
DPBF1&2 binding site motif	10595821	10595827	acacacg	bZIP
DPBF1&2 binding site motif	10596414	10596420	acacggg	bZIP
DPBF1&2 binding site motif	10596389	10596395	acacgag	bZIP
MYB binding site promoter	10595676	10595683	cacctaac	MYB
MYB1 binding site motif	10593939	10593946	atcctacc	MYB
MYB3 binding site motif	10595760	10595767	taactaac	MYB
MYB4 binding site motif	10595761	10595767	aactaac	MYB
MYB4 binding site motif	10595676	10595682	acctaac	MYB
MYB4 binding site motif	10594117	10594123	aactaac	MYB
MYB4 binding site motif	10594037	10594043	aacaacc	MYB
MYB4 binding site motif	10593932	10593938	aacaaac	MYB
MYB4 binding site motif	10593706	10593712	aacaaac	MYB
RAV1-A binding site motif	10595893	10595897	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	10595899	10595903	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	10596453	10596457	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	10595449	10595453	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	10594377	10594381	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	10594040	10594044	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	10593935	10593939	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	10593709	10593713	caaca	ABI3VP1
RAV1-B binding site motif	10593520	10593525	cacctg	ABI3VP1
LFY consensus binding site motif	10594365	10594370	ccaatg	LFY
LFY consensus binding site motif	10595946	10595951	ccattg	LFY
ABRE-like binding site motif	10596323	10596330	cacgtgga	...
ARF binding site motif	10596356	10596361	tgtctc	...
EveningElement promoter motif	10595903	10595911	aaaatatct	...
EveningElement promoter motif	10595420	10595428	aaaatatct	...
GATA promoter motif [LRE]	10593696	10593701	agatag	...
GATA promoter motif [LRE]	10594186	10594191	tgataa	...
GATA promoter motif [LRE]	10594340	10594345	tgataa	...
GATA promoter motif [LRE]	10594950	10594955	tgataa	...
GATA promoter motif [LRE]	10595839	10595844	agataa	...
GATA promoter motif [LRE]	10594756	10594761	agataa	...
GATA promoter motif [LRE]	10594697	10594702	tgataa	...
GATA promoter motif [LRE]	10594562	10594567	agataa	...
GATA promoter motif [LRE]	10593826	10593831	agataa	...
GATA promoter motif [LRE]	10593802	10593807	agataa	...
GATA promoter motif [LRE]	10593492	10593497	agataa	...
G-box promoter motif [LRE]	10596326	10596331	cacgtg	...
G-box promoter motif [LRE]	10596325	10596330	cacgtg	...
GCC-box promoter motif	10595974	10595979	gccqcc	...
lbox promoter motif	10596227	10596232	gataag	...
lbox promoter motif	10593825	10593830	gataag	...
lbox promoter motif	10593801	10593806	gataag	...
L1-box promoter motif	10595795	10595802	taaatgta	...
T-box promoter motif	10596038	10596043	acttgg	...
SORLREP3	10593479	10593487	tgtatatat	...

JAZ9

At1g70700.1

Chr-1:26720311-26718904

BS Name	BS Genome Start	BS Genome End	Binding Site Sequence	Binding Site Family/TF
AtMYB2 BS in RD22	26719538	26719544	ctaacca	MYB
AtMYC2 BS in RD22	26719712	26719717	cacatg	BHLH
Bellringer/replumless/pennywise BS1 IN	26720102	26720109	aaattaa	Homeobox
W-box promoter motif	26719586	26719591	ttgact	WRKY
W-box promoter motif	26720193	26720198	ttgact	WRKY
ARF1 binding site motif	26719755	26719760	tgtctc	ARF
ARF1 binding site motif	26719764	26719769	tgtctc	ARF
ARF1 binding site motif	26720293	26720298	tgtctc	ARF
ARF1 binding site motif	26719686	26719691	tgtctc	ARF
DPBF1&2 binding site motif	26719072	26719078	acacgag	bZIP
DPBF1&2 binding site motif	26719759	26719765	acacttg	bZIP
MYB3 binding site motif	26719540	26719547	taactaac	MYB
MYB4 binding site motif	26719540	26719546	aactaac	MYB
RAV1-A binding site motif	26718959	26718963	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	26718979	26718983	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	26719829	26719833	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	26720273	26720277	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	26719769	26719773	caaca	ABI3VP1
RAV1-B binding site motif	26719935	26719940	cacctg	ABI3VP1
LFY consensus binding site motif	26719202	26719207	ccaatg	LFY
LFY consensus binding site motif	26719896	26719901	ccaatg	LFY
ARF binding site motif	26719755	26719760	tgtctc	...
ARF binding site motif	26719764	26719769	tgtctc	...
ARF binding site motif	26720293	26720298	tgtctc	...
ARF binding site motif	26719686	26719691	tgtctc	...
BoxII promoter motif	26719401	26719406	ggttaa	...
GATA promoter motif [LRE]	26719013	26719018	tgataa	...
GATA promoter motif [LRE]	26719064	26719069	agatag	...
Hexamer promoter motif	26719134	26719139	ccgtcg	...
Ibox promoter motif	26719795	26719800	gataag	...
Nonamer promoter motif	26719807	26719815	agatcgacc	...
T-box promoter motif	26719406	26719411	actttg	...
T-box promoter motif	26720095	26720100	actttg	...
SORLREP3	26719555	26719563	tgtatatat	...
SORLIP1	26719166	26719171	agccac	...
SORLIP1	26720303	26720308	agccac	...
SORLIP2	26719914	26719918	gggcc	...

JAZ10

At5g13220.1

Chr-5:4218919-4216589

BS Name	BS Genome Start	BS Genome End	Binding Site Sequence	Binding Site Family/TF
AtMYC2 BS in RD22	4217985	4217990	cacatg	BHLH
AtMYC2 BS in RD22	4218900	4218905	cacatg	BHLH
AtMYC2 BS in RD22	4218723	4218728	cacatg	BHLH
AtMYC2 BS in RD22	4217986	4217991	cacatg	BHLH
Bellringer/replumless/pennywise BS1 IN	4217713	4217720	aaattaa	Homeobox
Bellringer/replumless/pennywise BS2 IN	4217282	4217289	aaattaqt	Homeobox
Bellringer/replumless/pennywise BS3 IN	4217281	4217288	actaattt	Homeobox
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in F	4216786	4216791	actcat	bZIP
W-box promoter motif	4217390	4217395	ttgact	WRKY
W-box promoter motif	4218111	4218116	ttgacc	WRKY
W-box promoter motif	4218342	4218347	ttgacc	WRKY
W-box promoter motif	4217815	4217820	ttgacc	WRKY
ARF1 binding site motif	4218873	4218878	tgtctc	ARF
DPBF1&2 binding site motif	4217515	4217521	acacqtg	bZIP
DPBF1&2 binding site motif	4218001	4218007	acaccag	bZIP
DPBF1&2 binding site motif	4218723	4218729	acacatg	bZIP
DPBF1&2 binding site motif	4217032	4217038	acactag	bZIP
MYB binding site promoter	4216612	4216619	aaccaaac	MYB
MYB4 binding site motif	4216913	4216919	aacaacc	MYB
MYB4 binding site motif	4218090	4218096	aacaac	MYB
MYB4 binding site motif	4216612	4216618	accaaac	MYB
RAV1-A binding site motif	4216906	4216910	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	4217513	4217517	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	4218223	4218227	caaca	ABI3VP1
LFY consensus binding site motif	4216649	4216654	ccattg	LFY
LFY consensus binding site motif	4216679	4216684	ccattg	LFY
LFY consensus binding site motif	4218562	4218567	ccaatg	LFY
LFY consensus binding site motif	4218635	4218640	ccaatg	LFY
LFY consensus binding site motif	4218133	4218138	ccactg	LFY
ABRE-like binding site motif	4216763	4216770	tacgtgta	...
ARF binding site motif	4218873	4218878	tgtctc	...
EveningElement promoter motif	4218663	4218671	aaaatatct	...
GATA promoter motif [LRE]	4217096	4217101	agataa	...
GATA promoter motif [LRE]	4217341	4217346	tgataa	...
GATA promoter motif [LRE]	4217802	4217807	agatag	...
GATA promoter motif [LRE]	4218751	4218756	agataa	...
G-box promoter motif [LRE]	4217516	4217521	cacqtg	...
G-box promoter motif [LRE]	4217515	4217520	cacqtg	...
lbox promoter motif	4218752	4218757	gataag	...
lbox promoter motif	4217440	4217445	gataag	...
T-box promoter motif	4216854	4216859	actttg	...
SORLIP1	4217943	4217948	agccac	...
SORLIP2	4216675	4216679	gggcc	...

BS Name	BS Genome Start	BS Genome End	Binding Site Sequence	Binding Site Family/TF
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in f	17936353	17936358	actcat	bZIP
CCA1 binding site motif	17936084	17936091	aacaatct	MYB-related
DPBF1&2 binding site motif	17936515	17936521	acactgg	bZIP
DPBF1&2 binding site motif	17935857	17935863	acacttg	bZIP
MYB binding site promoter	17935829	17935836	caccaaac	MYB
MYB4 binding site motif	17935385	17935391	aactaac	MYB
MYB4 binding site motif	17935830	17935836	accaaac	MYB
MYB4 binding site motif	17935896	17935902	aacaaac	MYB
MYB4 binding site motif	17936445	17936451	aactaac	MYB
RAV1-A binding site motif	17935414	17935418	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	17936279	17936283	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	17936548	17936552	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	17936375	17936379	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	17936226	17936230	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	17936029	17936033	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	17935951	17935955	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	17935942	17935946	caaca	ABI3VP1
RAV1-A binding site motif	17935837	17935841	caaca	ABI3VP1
LFY consensus binding site motif	17936516	17936521	ccaatg	LFY
LFY consensus binding site motif	17936127	17936132	ccaatg	LFY
GATA promoter motif [LRE]	17935315	17935320	tgataa	...
GATA promoter motif [LRE]	17936614	17936619	tgataa	...
GATA promoter motif [LRE]	17936193	17936198	tgatag	...
GATA promoter motif [LRE]	17935869	17935874	agataa	...
GATA promoter motif [LRE]	17935358	17935363	agataa	...
lbox promoter motif	17935316	17935321	gataag	...
LTRE promoter motif	17936000	17936006	accgaca	...
T-box promoter motif	17935353	17935358	actttg	...
TELO-box promoter motif	17935608	17935616	aaaccctaa	...

Tabla VI: Elementos regulatorios en *cis* encontrados en las regiones promotoras de los genes *HEL*, *JAZ7*, *8*, *9* y *10*. En rojo están señalados los elementos reconocidos por FTs involucrados en respuestas a la luz y en verde los reconocidos por MYC2. La primera columna indica el nombre del elemento *cis* (BS name); la segunda (BS Genome Start) y tercera (BS Genome End) columna el sitio de inicio y terminación de la secuencia en el cromosoma, respectivamente; la cuarta columna es la secuencia reconocida por el factor de transcripción y la última columna indica el nombre de la familia del factor de transcripción (Binding Site Family/TF) a la que pertenece el sitio.

BIBLIOGRAFIA

Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D. & Shinozaki, K. (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell*, **9**, 1859-1868.

Anderson, J.P., Badruzaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R. & Kazana, K. (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **16**, 3460-3479.

Berger, S., Bell, E. & Mullet, J.E. (1996) Two methyl jasmonate-insensitive mutants show altered expression of AtVsp in response to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiology*, **111**, 525-531.

Berrocal-Lobo, M., Molina, A. & Solano, R. (2002) Constitutive expression of *ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1* in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. *The Plant Journal*, **29**, 23-32.

Berrocal-Lobo, M. & Molina, A. (2004) Ethylene Response Factor 1 mediates Arabidopsis resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**, 763-770.

Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L. & Solano, R. (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, **448**, 666-671.

Devlin, P.F., Yanovsky, M.J. & Kay, S.A. (2003) A genomic analysis of the shade avoidance response in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **133**, 1617-1629.

Franklin, K.A., Praekelt, U., Stoddart, W.M., Billingham, O.E., Halliday, K.J. & Whitelam, G.C. (2003) Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **131**, 1340-1346.

Ganagappa, S.N. & Chattopadhyay, S. (2007) Interplay of negative regulators of photomorphogenesis, MYC2, COP1 and SPA1, in light, abscisic acid and jasmonic acid signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *18th International Conference on Arabidopsis research*.

Jiao, Y., Lau, O.S. & Deng, X.W. (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews Genetics*, **8**, 217- 230.

Katsir, L., Chung, H.S., Koo, A.J.K. & Howe, G.A. (2008) Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**, 428-435.

Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J. & Solano, R. (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell*, **15**, 165–178.

Lorenzo, O., Chico, J.M., Sánchez-Serrano, J.J. & Solano, R. (2004) *JASMONATE-INSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **16**, 1938–1950.

McCormac, A., Whitelam, G. & Smith, H. (1992) Light-grown plants of transgenic tobacco expressing an introduced oat phytochrome A gene under the control of a constitutive viral promoter exhibit persistent growth inhibition by far-red light. *Planta*, **188**, 173-181.

McCormac, A.C., Cherry, J.R., Hershey, H.P., Vierstra, R.D. & Smith, H. (1991) Photoresponses of transgenic tobacco plants expressing an oat phytochrome gene. *Planta*, **185**, 162-170.

Megraw, M., Baev, V., Rusinov, V., Jensen, S.T., Kalantidis, K. & Hatzigeorgiou, A.G. (2006) MicroRNA promoter element discovery in Arabidopsis. *RNA*, **12**, 1612–1619.

Robson, P.R.H., McCormac, A.C., Irvine, A.S. & Smith, H. (1996) Genetic engineering of harvest index in tobacco through overexpression of a phytochrome gene. *Nature Biotechnology*, **14**, 995-998.

Steindler, C., Matteucci, A., Sessa, G., Weimar, T., Ohgishi, M., Aoyama, T., Morelli, G. & Ruberti, I. (1999) Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development*, **126**, 4235-4245.

Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A. & Browse, J. (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature*, **448**, 661-665.

Xie, D.-X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M. & Turner, J.G. (1998) COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*, **280**, 1091-1094.

Yadav, V., Mallappa, C., Gangappa, S.N., Bhatia, S. & Chattopadhyay, S. (2005) A basic helix-loop-helix transcription factor in Arabidopsis, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. *The Plant Cell*, **17**, 1953-1966.

Yan, Y., Stolz, S., Chetelat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L. & Farmer, E.E. (2007) A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *The Plant Cell*, **19**, 2470-2483.

capítulo

7

**discusión general
y conclusiones**

CAPITULO 7

Discusión general

Las plantas son capaces de responder a diferentes estímulos ambientales con rápidos cambios en la asignación de recursos (Coley *et al.*, 1985). Estas reasignaciones energéticas pueden generar un conflicto en la eficacia de la respuesta disparada por la planta cuando hay más de un factor de estrés afectándola simultáneamente (Babst *et al.*, 2005). En la naturaleza, es habitual que una planta esté sometida al mismo tiempo a más de una presión ambiental. Dos estímulos que comúnmente afectan a las plantas de manera simultánea son la competencia y la herbivoría. La respuesta a estas dos presiones selectivas está condicionada por un compromiso en la distribución de recursos a una u otra (Herms & Mattson, 1992; Karban & Baldwin, 1997). En otras palabras, plantas que están compitiendo activamente con otras plantas presentarían una habilidad reducida para responder a la herbivoría por insectos a través de la síntesis *de novo* de metabolitos de defensa (Cipollini, 2004). A esta reasignación de recursos que hace la planta se la conoce como el **“dilema de las plantas”** (“crecer o defenderse”; Herms & Mattson, 1992). Conocer cuáles son los mecanismos por los cuáles la competencia condiciona las defensas de las plantas contra el ataque de insectos herbívoros es de gran importancia para comprender la dinámica de la interacción planta-herbívoro en ambientes naturales y en cultivos.

Arabidopsis como modelo de estudio de la eco-fisiología de las plantas

Arabidopsis se ha consolidado, en los últimos años, como un sistema modelo para el abordaje de preguntas ecológicas que buscan conocer las bases genéticas de una respuesta (Ballaré, 2001; Van Poecke & Dicke, 2003; Kliebenstein *et al.*, 2005). Arabidopsis conserva respuestas al ambiente que están presentes en otras plantas. Esto hace posible la utilización de Arabidopsis para el estudio genético de las vías de señalización de esas respuestas. En cuanto a la interacción de Arabidopsis con otros organismos, ha permitido disectar las vías de defensa directas contra insectos masticadores (Stotz *et al.*, 2000; Kliebenstein *et al.*, 2002; Stotz *et al.*, 2002), contra trips (Abe *et al.*, 2008), contra insectos chupadores de floema (Moran & Thompson, 2001; Moran *et al.*, 2002; Kusnierczyk *et al.*,

2007), contra hongos y bacterias (Stintzi *et al.*, 2001; Traw *et al.*, 2007) y de defensas indirectas (Van Poecke *et al.*, 2001; Van Poecke & Dicke, 2003). Del mismo modo, fue crucial para el conocimiento de las respuestas de la planta a cambios en la intensidad de luz (Ballaré *et al.*, 1997; Nemhauser & Chory, 2002) y la calidad de luz, *i.e.*: luz ultravioleta, A, R, RL y verde (Boccalandro *et al.*, 2001; Kaiserli & Jenkins, 2007); (Liscum, 2002); (Franklin *et al.*, 2005; Franklin *et al.*, 2007) y (Folta & Maruhnich, 2007), respectivamente.

¿Qué sucede con la interacción planta-insecto en ambientes que tendrán competencia?

Recientemente, las señales lumínicas asociadas a la presencia de plantas vecinas, mas específicamente una baja relación R:RL, fueron involucradas directamente en la atenuación de la inducción de las defensas frente al ataque de insectos herbívoros. Con diferentes aproximaciones experimentales, usando mutantes McGuire & Agrawal (2005) o manipulando el ambiente lumínico Izaguirre *et al.* (2006), demostraron que el phyB era en sí mismo capaz de modular la respuesta contra el ataque de insectos herbívoros. Así, en plantas de *N. longiflora*, el tratamiento con RL incrementó la calidad del tejido para orugas (evaluado sobre un bioensayo de crecimiento del insecto), y estos efectos no estuvieron mediados por cambios en la relación C:N inducidos por la luz. En este caso, la mejor calidad del tejido de las plantas tratadas con RL estuvo correlacionada con una menor acumulación de un grupo de compuestos fenólicos (ácido clorogénico y otros compuestos C3-C6) y menor expresión de los genes codificantes para las enzimas de esa vía biosintética (Izaguirre *et al.*, 2006). En experimentos a campo, el mutante *phyB* de tomate sufrió más herbivoría por trips que las plantas del genotipo salvaje (Izaguirre *et al.*, 2006) y el mutante *phyB* de pepino sufrió un 95% más herbivoría que el control, aunque en este caso la relación C:N fue mayor en los mutantes (McGuire & Agrawal, 2005).

Nuestros experimentos en *Arabidopsis* confirman los resultados observados para otras especies. Cuando las orugas de *S. frugiperda* se alimentaron de plantas que están expresando el SAS, ya sea porque fueron cultivadas a alta densidad (Figura 2 Capítulo 3), porque recibieron RL suplementario (Figura 4 Capítulo 3) o porque son deficientes en el phyB (Figura 3 y 4 Capítulo 3), crecieron a una mayor tasa que las del tratamiento control. Estos datos muestran que *Arabidopsis* al detectar señales lumínicas de competencia invierte menos en respuestas de defensas. Y sugieren fuertemente que las plantas “intolerantes a la

sombra”, aún sin llegar a estar propiamente sombreadas o sufriendo la carencia de algún nutriente, pueden modificar la calidad de su tejido cambiando el perfil de acumulación de compuestos químicos inducibles por los insectos.

¿Cómo es la respuesta de defensa inducida por el insecto en otras plantas y en Arabidopsis?

La respuesta de las plantas a las heridas ocasionadas por daño mecánico o por el ataque de insectos herbívoros depende, en gran medida, de la síntesis del JA y la subsiguiente activación de la vía que culmina con la acumulación de compuestos de función repelente, tóxica o anti-nutritiva. La acumulación de PINs en respuesta al tratamiento con MeJA exógeno, al regurgitado de diferentes orugas, o al daño producido por el insecto, es una respuesta conservada en distintas especies como tomate (Li *et al.*, 2005), tabaco (Izaguirre *et al.*, 2003) y también Arabidopsis (Cipollini & Bergelson, 2001). Algo similar ocurre con la acumulación de compuestos fenólicos en respuesta a esos mismos estímulos en tabaco y tomate (Izaguirre *et al.*, 2003) y con la síntesis de glucosinolatos en Arabidopsis (Mewis *et al.*, 2006). Alguno de estos compuestos pueden interferir con la digestión de la comida en el intestino del insecto (Pearce *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2005), reduciendo la cantidad final de tejido removido (Stotz *et al.*, 2000), y aumentando el tiempo generacional del insecto que, en última instancia, eleva las probabilidades de ser atacado por sus predadores carnívoros y parasitoides (Dicke, 1999; Kessler & Baldwin, 2002).

En Arabidopsis, detecté una menor acumulación de metabolitos de defensa cuando el daño simulado con el agregado de regurgitado o el daño inducido por el insecto se daba en ambientes que promovían el SAS, por estar enriquecidos en RL o porque las plantas son deficientes en el phyB. La mejor calidad del tejido de las plantas de Arabidopsis expresando el SAS estaría vinculada a una menor acumulación de compuestos fenólicos (Figura 5a Capítulo 3) y a una menor expresión de los genes controlados por la vía del JA, como lo pone en evidencia el menor nivel de transcripción del gen *HEL* (Figura 5b Capítulo 3). Cabe señalar que la calidad de la luz no influyó en la relación C:N del tejido foliar, descartando la posibilidad de que este factor haya condicionado el bioensayo (Tabla II Capítulo 3).

De esta forma, queda demostrado que la percepción de señales lumínicas asociadas a la presencia de plantas vecinas es suficiente para reducir la capacidad de respuesta de la planta al ataque de insectos. O dicho de otra forma, cuando una planta “intolerante al sombreado” percibe la presencia de otras plantas vecinas parecería priorizar las respuestas de crecimiento asociadas al SAS a expensas de las respuestas de defensa contra insectos herbívoros.

Arabidopsis y mecanismos

La identificación de mutantes involucrados en las vías de señalización de las tres fitohormonas (JA, ET y SA) responsables de las defensas inducibles de *Arabidopsis* permitió la disección molecular de las cascadas de señalización. Los estudios con estos mutantes revelaron una compleja red de interconexiones que ajustan finamente la respuesta final de acuerdo al estímulo realizado por el insecto (Van Poecke, 2002; De Vos *et al.*, 2005).

Entre los mutantes de *Arabidopsis* deficientes en las vías de defensa existen aquellos que simultáneamente tienen algunas respuestas a la luz alteradas y viceversa. Entre los mutantes de la vía del ET, el hipocotilo del mutante *ein2* no se elonga tanto como el de las plántulas del genotipo salvaje luego de ser tratado con ET bajo luz blanca (Smalle *et al.*, 1997). Para el factor de transcripción PIF5 se describió que modula la síntesis del etileno pero también controla la estabilidad del PHYB conectando directamente a la vía del etileno con la del fitocromo (Khanna *et al.*, 2007). La inducción de *PRI*, gen marcador de la vía del SA, estuvo bloqueada en los mutantes *phyA* y *phyB* que mostraron una mayor susceptibilidad al ataque por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Genoud *et al.*, 2002). Para la vía del JA, el mutante *jar1-1* resultó ser hiposensible al RL (Hsieh *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2007) y el mutante *hy1-101* que no sintetiza el cromóforo del fitocromo presentó niveles endógenos de JA superiores a los del genotipo salvaje (Zhai *et al.*, 2007). Sin embargo, para los mutantes *phyA* y *phyB* y el doble mutante *phyAphyB* se reportaron niveles endógenos de JA similares a los del genotipo salvaje (Zhai *et al.*, 2007). Esto coincide con resultados preliminares de nuestro laboratorio que muestran que ni el tratamiento con RL adicional ni la mutación *phyB* parecerían alterar los niveles endógenos de JA en plantas adultas de *Arabidopsis* (Moreno, datos no mostrados). Estos datos sugieren que la relación negativa entre RL y la

inducción de las defensas contra herbívoros podría estar fundamentalmente explicada por una reducción en la sensibilidad al JA y, no tanto, por un efecto sobre la síntesis de esa hormona.

Los resultados expuestos en el Capítulo 4 de esta tesis documentan que el RL desensibiliza a la planta contra el JA y sugieren que esta desensibilización podría ser uno de los mecanismos que explican el cambio en la asignación de recursos desde respuestas de defensa a respuestas de competencia. La aplicación exógena de MeJA sobre plantas cultivadas con luz ambiente disparó la acumulación de compuestos fenólicos y también la expresión del gen *HEL* (Figura 2a Capítulo 4). En cambio, esa inducción por MeJA estuvo ausente en las plantas que expresaban un SAS por estar cultivadas con RL suplementario y, también ausente en plantas del mutante *phyB* (Figura 2a Capítulo 4).

Arabidopsis y los elementos de la cascada del JA regulables por el RL

La vía de señalización del JA se bifurca en una rama controlada por *ERF1* y otra por *MYC2* (Lorenzo *et al.*, 2004) (para más detalle Capítulo 5). En la actualidad, se conocen los elementos moleculares centrales de la cascada de transducción de esta fitohormona (Van Poecke, 2007) que incluyen a la enzima *JAR1* que agrega una Ile al JA haciéndolo biológicamente activo, al receptor del JA-Ile que es una proteína del signalosoma (*COI1*), a las proteínas *JAZ* que son blanco de la ubiquitinación por *COI1* y están reprimiendo a *MYC2* y probablemente también a *ERF1* (Solano R, comunicación personal), y finalmente *ERF1* y *MYC2* que se regulan negativamente en forma cruzada controlando la expresión de genes marcadores de cada rama como *HEL*, *PDF1.2* y *VSP1* (Introducción Capítulo 4).

Sorpresivamente, los resultados de esta tesis señalan al elemento *ERF1* como un punto aparentemente clave en la regulación de la vía del JA por el RL y no, como esperábamos, a *MYC2*. El RL reprimió la inducción de *ERF1* aún en presencia de MeJA exógeno (Figura 2 Capítulo 6). El perfil de expresión de *ERF1* explicaría la regulación negativa observada para *HEL* y *PDF1.2*, que están río abajo de *ERF1* en la cascada (Figura 2 Capítulo 6). Estos dos genes mostraron una fuerte inhibición de la respuesta al MeJA en ambientes suplementados con RL. Paralelamente, el mutante *phyB* perdió prácticamente toda su respuesta al MeJA en la rama controlada por *ERF1* (Figura 3 Capítulo 6), y tampoco acumuló compuestos fenólicos en respuesta al daño o a la inducción con MeJA (Figura 2

Capítulo 4). Tomando conjuntamente todos estos datos, podemos concluir que la disminución de la población de la forma Pfr (activa) del phyB es la causa de la desensibilización de los tejidos de la planta contra el JA, debilitando su respuesta frente al ataque de insectos.

Las señales de competencia aumentan la transcripción de algunos genes *JAZ*

Los mayores niveles de expresión de algunos genes *JAZ* (Figura 5 Capítulo 6) en ambientes enriquecidos en RL resulta sugestiva y promisoria. Recientemente se describió que algunas proteínas *JAZ* actúan reprimiendo las respuestas desencadenadas por el JA. Así las proteínas *JAZ1* y *JAZ3* reprimen las respuestas de defensas inducidas por el JA (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). En este sentido, el crecimiento de larvas de *S. exigua* fue significativamente mayor sobre plantas de *Arabidopsis* que sobre-expresaban una versión dominante negativa de *JAZ1* (*JAZ1?3A*) que conservaba su habilidad para interactuar con *COI1* pero no con *MYC2*, manteniendo la represión de los genes de respuesta al JA de forma constitutiva (Chung *et al.*, 2008). Paralelamente, se demostró que *JAZ10* es un represor del retardo del crecimiento celular promovido por el JA (Yan *et al.*, 2007).

Entre los experimentos reportados en esta tesis evalué la interacción del RL y MeJA sobre la expresión de todos los genes *JAZ* de *Arabidopsis* (Capítulo 6). Por un lado, detecté que el RL podía inducir la expresión de algunos genes *JAZ* sin el agregado de MeJA exógeno. Y por otro, encontré que la inducción de algunos genes *JAZ* promovida por el agregado de MeJA exógeno, era mayor en ambientes suplementados con RL (Figura 5 Capítulo 6). Cabe señalar que uno de los genes sobre-expresados es el *JAZ10*, un represor de la inhibición del crecimiento promovida por el JA (Yan *et al.*, 2007). La sobre-expresión de *JAZ10* en presencia de MeJA en ambientes suplementados con RL es consistente con un modelo donde el RL promueve la elongación y el crecimiento celular para competir más eficientemente con las plantas vecinas, en parte, a través de la represión del efecto inhibitorio del JA sobre el ciclo celular. Especulamos con la posibilidad de que el RL suplementario al aumentar la expresión de algunos genes *JAZ* pueda hacer a las plantas más susceptibles a la herbivoría. Estos resultados nos permitirían predecir algún grado de desensibilización contra el JA en esos tejidos determinando una mayor elongación y

crecimiento celular y, a la vez, una menor inducción de las defensas contra insectos herbívoros.

Esa desensibilización produciría un ahorro de recursos limitando la inversión en metabolitos de defensa, y simultáneamente evitaría el efecto inhibitorio de los jasmonatos sobre el ciclo celular (Yan *et al.*, 2007). Estos efectos inhibitorios podrían ser deletéreos en un ambiente donde la planta requiere elongarse a una alta velocidad para escapar del sombreado derivado de la presencia de plantas vecinas (Figura 1).

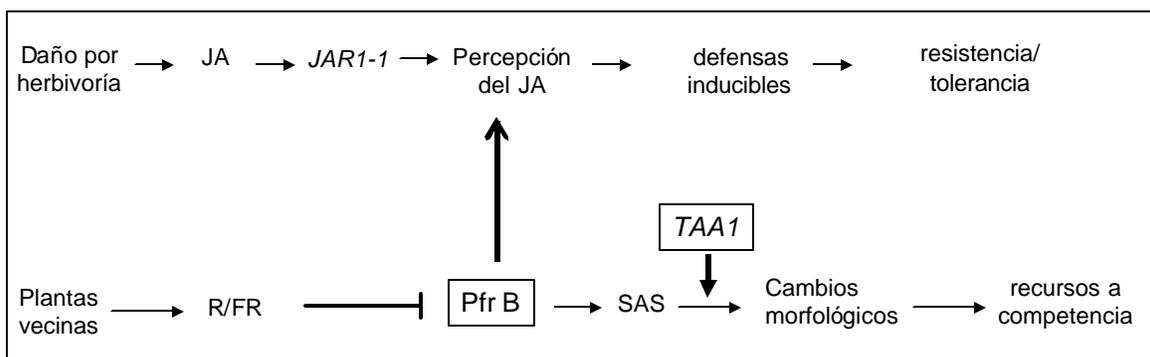


Figura 1: Esquema del mecanismo fisiológico que controlaría el compromiso de las entre las respuestas de crecimiento y defensas de Arabidopsis.

Es necesaria la integridad de la vía del JA para notar el efecto del RL

Para complementar estos datos con una aproximación genética, utilicé al mutante *jar1-1*, deficiente en la enzima encargada de activar al JA conjugándolo con Ile (Staswick *et al.*, 2002; Staswick *et al.*, 2005). Este mutante despliega un SAS normal en ambientes enriquecidos con RL en plantas adultas de Arabidopsis (Figura 3 Capítulo 4). Dado que la enzima JAR1 es necesaria para activar las respuestas de defensas controladas por el JA (Thines *et al.*, 2007), si el efecto del RL sobre la vulnerabilidad a los herbívoros dependiera predominantemente de la desensibilización de la vía del JA, el efecto benéfico del RL sobre el crecimiento de larvas de *S. frugiperda* debería perderse en el mutante *jar1-1*.

Como era esperado, el crecimiento de las larvas de *S. frugiperda* fue significativamente mayor en plantas del genotipo salvaje cultivadas con RL suplementado y mayor sobre el mutante *jar1-1* respecto del genotipo salvaje bajo luz ambiente. Sin embargo, el efecto benéfico del RL sobre el crecimiento de la oruga se perdió en el mutante *jar1-1*. Estos datos nos permiten concluir que el efecto negativo del RL sobre la inducción de las defensas esta

mediado por la vía del JA. O dicho de otra manera, la percepción de plantas vecinas mejora la calidad forrajera del tejido para insectos masticadores a través de la represión de algunos elementos de la cascada del JA, para lo cual necesita de la integridad de esa vía.

Mutante *sav3-2*: desacopla las respuestas de defensa de las morfológicas del SAS

El mutante *sav3-2* no responde con cambios morfológicos a la disminución de la relación R:RL del ambiente (Figura 3 Capítulo 5). El *locus* mutado corresponde a TAA1, una enzima involucrada en una vía rápida de síntesis de auxinas dependiente del Trp, que suplementaría la demanda inmediata de esta fitohormona en los sitios requeridos (Tao *et al.*, 2008). Por tener un fenotipo contrario al de los mutantes *jar1-1* y *phyB*, el mutante *sav3-2* desempeñó un rol central para poder descartar la posibilidad de que la respuesta observada sea simplemente una consecuencia en la asignación de recursos desde respuestas de crecimiento a respuestas de defensa de la planta. Como el crecimiento de las larvas de *S. frugiperda* sobre el mutante *sav3-2* fue similar al del genotipo salvaje, pudimos concluir que el efecto del RL sobre la calidad del tejido no es meramente una consecuencia de la expresión de los componentes morfológicos del SAS, sino que, por el contrario, modificaría la calidad de hoja a través de una vía específica independiente de TAA1 (Figura 6 Capítulo 5). El mutante *sav3-2* es el primer ejemplo en la literatura que permite desacoplar las respuestas de defensa y SAS.

Perspectivas futuras

La plasticidad fenotípica permite a la planta ajustar su fenotipo a las condiciones del ambiente en el que vive (Agrawal, 1998; Baldwin, 1998; Cipollini, 1998; Agrawal, 1999; Baldwin, 1999). Las respuestas de “escape al sombreado” y defensa contra el ataque de insectos son dos tipos de repuestas plásticas de las plantas que están contrabalanceadas. En esta tesis describimos un mecanismo fisiológico que le permite a la planta el control cruzado de estas respuestas, ajustando la asignación de recursos limitantes a respuestas de defensas de acuerdo al grado de competencia que pueda haber en un futuro cercano. En otras palabras, le permite a la planta regular delicadamente la potencia de su respuesta contra los herbívoros dependiendo de las futuras demandas de energías para competir con

otras plantas vecinas. Este es el primer mecanismo descrito hasta la fecha que provee una explicación al conocido “dilema de las plantas” (Herms & Mattson, 1992).

El conocimiento pormenorizado de la regulación cruzada entre estas dos respuestas será importante en el diseño de nuevas estrategias para los programas de mejoramiento genético de especies “intolerantes a la sombra” como el maíz, sorgo, soja, trigo, por citar algunas de relevancia económica. Poder manipular los mecanismos naturales de defensa podría reducir la dependencia del uso de pesticidas sintéticos, limitando el impacto ambiental derivado del uso de agroquímicos.

Hacia un modelo integrador

En esta tesis me propuse estudiar los mecanismos fisiológicos que explican el cambio en la asignación de recursos desde respuestas de defensa a competencia, para lo cual diseñé experimentos aplicando simultáneamente las señales lumínicas de competencia y las de herbivoría.

En estas condiciones ambientales, podría pensar que en la planta se están induciendo ambas cascadas de señalización. Por un lado, la disminución de la relación R:RL promueve una respuesta de crecimiento caracterizada por una elongación de los hipocotilos y una expansión del pecíolo foliar. A nivel molecular, la forma Pfr del fitocromo B, al fotoconvertirse a la forma inactiva Pr, se disocia de los factores de transcripción PIF. Las proteínas PIFs promueven la transcripción de genes que controlan las respuestas fenotípicas de elongación. En períodos prolongados de exposición al RL existe, además, síntesis de GAs. Las GAs se unen a su receptor *GID1* y luego a *SLEEPY* (una E3 ligasa) que interactúan con las proteínas *DELLAs* marcándolas para degradación. La degradación de las *DELLAs*, que reprimían las respuestas de crecimiento y elongación a través del secuestro de *PIF3* y *PIF4*, termina acentuando las respuestas fenotípicas promovidas por el RL (de Lucas *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008).

Por otro lado, la herbivoría induce la activación del JA a través del agregado de Ile. El JA_{Ile} se une a su receptor *COI1* (una E3 ligasa). El complejo JA_{Ile} -*COI1* interactúa específicamente con las proteínas represoras *JAZ1* y *JAZ3* enviándolas a degradación. De esta manera, se promueve la transcripción del gen *MYC2* y la respuesta de defensa.

Un estudio reciente conectó, por primera vez, la estabilidad de las DELLAs con la sensibilidad de *Arabidopsis* al JA modulando la respuesta de defensa a patógenos biótrofos y necrótrofos (Navarro *et al.*, 2008). Paralelamente, se reportó un rol determinante del fitocromo en la efectividad de una respuesta de defensa sistémica contra patógenos en *Arabidopsis* (Griebel & Zeier, 2008). Estos estudios podrían sugerir un modelo donde la degradación de las DELLAs, inducida por la disminución de la forma Pfr B y la posterior síntesis de GAs, pueda modular la inducción de las defensas de la planta. Un modelo simple sería que ATHB-2, un gen de respuesta al RL controlado por las proteínas PIFs, reprima la transcripción de *ERF1* uniéndose a su promotor. Entonces, la disminución de la forma Pfr B conllevaría a la represión de *ERF1*. Otra posibilidad sería que las proteínas PIFs, a través de la disminución de Pfr B, promuevan la transcripción de algún gen *JAZ* que, en última instancia, reprimiría selectivamente la rama de la vía del JA controlada por *ERF1*.

Síntesis de aportes originales

En esta tesis de doctorado me propuse estudiar el antagonismo descrito para las respuestas de crecimiento y defensa de las plantas, identificando las bases fisiológicas que lo fundamentan. Las respuestas de crecimiento de la planta fueron promovidas por la presencia natural o simulada de plantas vecinas. El RL reflejado por las plantas vecinas inicia la respuesta SAS, que involucra procesos de diferenciación, elongación y crecimiento celular. Por otro lado, la herbivoría por larvas de *S. frugiperda* o simulada con su regurgitado indujo la acumulación de defensas. Estudiando el compromiso entre las respuestas de crecimiento y las de defensas pudimos documentar que:

- i) La competencia con plantas vecinas, o el RL reflejado por ellas, torna a las plantas mas susceptibles al ataque de insectos, favoreciendo el crecimiento de los herbívoros.
- ii) El RL inhibe parcial o totalmente la acumulación de compuestos fenólicos y también reprime la expresión de *HEL* gatillada por la herbivoría o por el MeJA.
- iii) El RL inhibe selectivamente la rama de la vía del JA controlada por *ERF1*.

- iv) El RL aumenta la expresión de algunos miembros de la familia de proteínas represoras JAZ.
- v) El efecto del RL sobre la calidad del tejido requiere la vía del JA activa. Ese efecto desaparece en el mutante *jar1-1*.
- vi) El efecto del RL no requiere de la expresión de la componente morfológica del SAS para cambiar la calidad del tejido.
- vii) El mutante *phyB* confirmó la importancia del phyB en los bioensayos como en la expresión de genes de defensa, validando los datos obtenidos con el genotipo salvaje.

Las bases fisiológicas de estas observaciones radicarían en que:

- i) El RL desensibiliza a la planta contra el JA inducido por la herbivoría. Este podría ser uno de los mecanismos que explican el cambio en la reasignación de recursos desde las defensas a la competencia.
- ii) El RL induce la expresión de algunos genes *JAZ* que podrían estar reprimiendo la rama controlada por ERF1. También podría haber un control negativo directo del Pfr sobre ERF1 a través de ATHB-2.
- iii) El efecto del RL sobre la calidad del tejido estaría, en parte, mediado por una disminución en los niveles de Pfr del fitocromo B.
- iv) El compromiso descrito no es una mera consecuencia de la reasignación de recursos entre dos respuestas. El RL estaría afectando alguna vía específica que termina modificando la calidad del tejido.

BIBLIOGRAFIA

- Abe, H., Ohnishi, J., Narusaka, M., Seo, S., Narusaka, Y., Tsuda, S. & Kobayashi, M.** (2008) Function of jasmonate in response and tolerance of *Arabidopsis* to thrips feeding. *Plant Cell Physiology*, **49**, 68-80.
- Agrawal, A.** (1999) Induced responses to herbivory in wild radish: effects on several herbivores and plant fitness. *Ecology*, **80**, 1713–1723.
- Agrawal, A.A.** (1998) Induced responses to herbivory and increased plant performance. *Science*, **279**, 1201-1202.
- Babst, B.A., Ferrieri, R.A., Gray, D.W., Lerdau, M., Schlyer, D.J., Schueller, M., Thorpe, M.R. & Orians, C.M.** (2005) Jasmonic acid induces rapid changes in carbon transport and partitioning in *Populus*. *New Phytologist*, **167**, 63-72.
- Baldwin, I.T.** (1998) Jasmonate induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *PNAS*, **95**, 8113-8118.
- Baldwin, I.T.** (1999) Inducible nicotine production in native *Nicotiana* as an example of adaptive phenotypic plasticity. *Journal of Chemical Ecology*, **25**, 3-30.
- Ballaré, C.L., Scopel, A.L. & Sánchez, R.A.** (1997) Foraging for light: photosensory ecology and agricultural implications. *Plant, Cell and Environment*, **20**, 820-825.
- Ballaré, C.L.** (2001) *Arabidopsis* mutants and other model systems in plant physiological ecology. *Trends in Plant Science*, **6**, 99-99.
- Boccalandro, H.E., Mazza, C.A., Mazzella, M.A., Casal, J.J. & Ballaré, C.L.** (2001) Ultraviolet B radiation enhances a phytochrome-B mediated photomorphogenic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **126**, 780-788.
- Cipollini, D.F.** (1998) Induced defenses and phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution*, **13**, 200.
- Cipollini, D.F. & Bergelson, J.** (2001) Plant density and nutrient availability constrain constitutive and wound-induced expression of trypsin inhibitors in *Brassica napus*. *Journal of Chemical Ecology*, **27**, 593-610.
- Cipollini, D.F.** (2004) Stretching the limits of plasticity: can a plant defend against both competitors and herbivore? *Ecology*, **85**, 28-37.
- Coley, P., Bryant, D. & Chapin, F.S.** (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, **230**, 895-899.

Chen, H., Wilkerson, C., Kuchar, J., Phinney, B. & Howe, G. (2005) Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *PNAS*, **102**, 19237-19242.

Chen, I.-C., Huang, I.C., Liu, M.-J., Wang, Z.-G., Chung, S.-S. & Hsieh, H.-L. (2007) Glutathione S-transferase interacting with FIN219 is involved in phytochrome A-mediated signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **143**, 1189-1202.

Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L. & Solano, R. (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, **448**, 666-671.

Chung, H.S., Koo, A.J.K., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A.D. & Howe, G.A. (2008) Regulation and function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology*, **146**, 952-964.

de Lucas, M., Davière, J.-M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M.A., Titarenko, E. & Prat, S. (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature*, **451**, 480-484.

De Vos, M., Van Oosten, V.R., Van Poecke, R.M.P., Van Pelt, J.A., Pozo, M.J., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.-P., Van Loon, L.C., Dicke, M. & Pieterse, C.M.J. (2005) Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. *MPMI*, **18**, 923-937.

Dicke, M. (1999) Evolution of induced defense of plants. In *The Ecology And Evolution Of Inducible Defenses*, (R. Tollrian and C.D. Harvell, eds.). *Princeton University Press, Princeton, New Jersey*, 62-68.

Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J.M., Kircher, S., Schäfer, E., Fu, X., Fan, L.-M. & Deng, X.W. (2008) Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature*, **451**, 475-479.

Folta, K.M. & Maruhnich, S.A. (2007) Green light: a signal to slow down or stop. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 3099-3111.

Franklin, K.A., Lerner, V.S. & Whitelam, G.C. (2005) The signal transducing photoreceptors of plants. *Int. J. Dev. Biol.*, **49**, 653-664.

Franklin, K.A., Allen, T. & Whitelam, G.C. (2007) Phytochrome A is an irradiance-dependent red light sensor. *The Plant Journal*, **50**, 108-117.

Genoud, T., Buchala, A.J., Chua, N.-H. & Metraux, J.-P. (2002) Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **31**, 87-95.

Griebel, T. & Zeier, J. (2008) Light regulation and daytime dependency of inducible plant defenses in Arabidopsis: phytochrome signaling controls systemic acquired resistance rather than local defense. *Plant Physiology*, **147**, 790-801.

Herms, D.A. & Mattson, W.J. (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology*, **67**, 283-335.

Hsieh, H.-L., Okamoto, H., Wang, M., Ang, L.-H., Matsui, M., Goodman, H. & Deng, X.W. (2000) FIN219, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of Arabidopsis development. *Genes & Development*, **14**, 1958-1970.

Izaguirre, M.M., Scopel, A.L., Baldwin, I.T. & Ballaré, C.L. (2003) Convergent responses to stress. Solar ultraviolet-B radiation and *Manduca sexta* herbivory elicit overlapping transcriptional responses in field-grown plants of *Nicotiana longiflora*. *Plant Physiology*, **132**, 1755-1767.

Izaguirre, M.M., Mazza, C.A., Biondini, M., Baldwin, I.T. & Ballaré, C.L. (2006) Remote sensing of future competitors: impacts on plant defenses. *PNAS*, **103**, 7170-7174.

Kaiserli, E. & Jenkins, G.I. (2007) UV-B promotes rapid nuclear translocation of the Arabidopsis UV-B specific signaling component UVR8 and activates its function in the nucleus. *The Plant Cell*, **19**, 2662-2673.

Karban, R. & Baldwin, I. (1997) Induced responses to herbivory. *Chicago University Press, Chicago, Illinois, USA*.

Kessler, A. & Baldwin, I.T. (2002) Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Reviews Plant Biology*, **53**, 299-328.

Khanna, R., Shen, Y., Marion, C.M., Tsuchisaka, A., Theologis, A., Schafer, E. & Quail, P.H. (2007) The basic helix-loop-helix transcription factor PIF5 acts on ethylene biosynthesis and phytochrome signaling by distinct mechanisms. *The Plant Cell*, **19**, 3915-3929.

Kliebenstein, D., Pedersen, D., Barker, B. & Mitchell-Olds, T. (2002) Comparative analysis of quantitative trait loci controlling glucosinolates, myrosinase and insect resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **161**, 325-332.

Kliebenstein, D.J., Kroymann, J. & Mitchell-Olds, T. (2005) The glucosinolate-myrosinase system in an ecological and evolutionary context. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 264-271.

Kusnierczyk, A., Winge, P., Midelfart, H., Armbruster, W.S., Rossiter, J.T. & Bones, A.M. (2007) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with different glucosinolate profiles after attack by polyphagous *Myzus persicae* and oligophagous *Brevicoryne brassicae*. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 2537-2552.

Li, C., Schilmiller, A.L., Liu, G., Lee, G.I., Jayanty, S., Sageman, C., Vrebalov, J., Giovannoni, J.J., Yagi, K., Kobayashi, Y. & Howe, G.A. (2005) Role of ω -oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *The Plant Cell*, **17**, 971-986.

Liscum, E. (2002) Phototropism: mechanisms and outcomes. *The Arabidopsis Book*.

Lorenzo, O., Chico, J.M., Sánchez-Serrano, J.J. & Solano, R. (2004) *JASMONATE-INSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **16**, 1938-1950.

McGuire, R. & Agrawal, A.A. (2005) Trade-offs between the shade-avoidance response and plant resistance to herbivores? Tests with mutant *Cucumis sativus*. *Functional Ecology*, **19**, 1025-1031.

Mewis, I., Tokuhsa, J.G., Schultz, J.C., Appel, H.M., Ulrichs, C. & Gershenzon, J. (2006) Gene expression and glucosinolate accumulation in Arabidopsis thaliana in response to generalist and specialist herbivores of different feeding guilds and the role of defense signaling pathways. *Phytochemistry*, **67**, 2450-2462.

Moran, P.J. & Thompson, G.A. (2001) Molecular responses to aphid feeding in Arabidopsis in relation to plant defense pathways. *Plant Physiology*, **125**, 1074-1085.

Moran, P.J., Cheng, Y., Cassell, J.L. & Thompson, G.A. (2002) Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in compatible plant-aphid interactions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **51**, 182-203.

Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N.P. & Jones, J.D.G. (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current Biology*, **18**, 650-655.

Nemhauser, J. & Chory, J. (2002) Photomorphogenesis. *The Arabidopsis Book*.

Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S. & Ryan, C.A. (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*, **253**, 895-898.

Smalle, J., Haegman, M., Kurepa, J., Van Montagu, M. & Straeten, D.V.D. (1997) Ethylene can stimulate Arabidopsis hypocotyl elongation in the light. *PNAS*, **94**, 2756-2761.

Staswick, P.E., Tiriyaki, I. & Rowe, M.L. (2002) Jasmonate response locus JAR1 and several related Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *The Plant Cell*, **14**, 1405-1415.

Staswick, P.E., Serban, B., Rowe, M., Tiriyaki, I., Maldonado, M.T., Maldonado, M.C. & Suza, W. (2005) Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *The Plant Cell*, **17**, 616-627.

Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J. & Farmer, E.E. (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *PNAS*, **98**, 12837-12842.

Stotz, H., Pittendrigh, B., Kroymann, J., Weniger, K., Fritsche, J., Bauke, A. & Mitchell-Olds, T. (2000) Induced plant defense responses against chewing insects. Ethylene signaling reduces resistance of Arabidopsis against Egyptian cotton worm but not diamondback moth. *Plant Physiology*, **124**, 1007-1018.

Stotz, H.U., Koch, T., Biedermann, A., Weniger, K., Boland, W. & Mitchell-Olds, T. (2002) Evidence for regulation of resistance in Arabidopsis to Egyptian cotton worm by salicylic and jasmonic acid signaling pathways. *Planta*, **214**, 648-652.

Tao, Y., Ferrer, J.-L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J.A., Li, L., Moreno, J.E., Bowman, M.E., Ivans, L.J., Cheng, Y., Lim, J., Zhao, Y., Ballaré, C.L., Sandberg, G., Noel, J.P. & Chory, J. (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, **133**, 164-176.

Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A. & Browse, J. (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature*, **448**, 661-665.

Traw, M.B., Kniskern, J.M. & Bergelson, J. (2007) SAR increases fitness of *Arabidopsis thaliana* in the presence of natural bacterial pathogens. *Evolution*, **61**, 2444-2449.

Van Poecke, R.M.P., Posthumus, M.A. & Dicke, M. (2001) Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid *Cotesia rubecula*: chemical, behavioral, and gene-expression analysis. *Journal of Chemical Ecology*, **27**, 1911-1928.

Van Poecke, R.M.P. (2002) Indirect defence of Arabidopsis against herbivores insects. Combining parasitoid behaviour and chemical analysis with a molecular genetic approach. *PhD Thesis*.

Van Poecke, R.M.P. & Dicke, M. (2003) Signal transduction downstream of salicylic and jasmonic acid in herbivory-induced parasitoid attraction by Arabidopsis is independent of JAR1 and NPR1. *Plant, Cell & Environment*, **26**, 1541-1548.

Van Poecke, R.M.P. (2007) Arabidopsis-insect interactions. *The Arabidopsis Book*.

Yan, Y., Stolz, S., Chetelat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L. & Farmer, E.E. (2007) A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *The Plant Cell*, **19**, 2470-2483.

Zhai, Q., Li, C.-B., Zheng, W., Wu, X., Zhao, J., Zhou, G., Jiang, H., Sun, J., Lou, Y. & Li, C. (2007) Phytochrome chromophore deficiency leads to overproduction of jasmonic acid and elevated expression of jasmonate-responsive genes in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology*, **48**, 1061-1071.